

**UFRRJ**  
**INSTITUTO DE AGRONOMIA**  
**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA**

**DISSERTAÇÃO**

**Otimização de protocolos para a propagação *in vitro* de gérbera (*Gerbera jamesonii*).**

**Cleiton Mateus Sousa**

2005



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE AGRONOMIA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA**

**Otimização de protocolos para a propagação *in vitro* de gérbera (*Gerbera jamesonii*).**

Cleiton Mateus Sousa

Sob a Orientação do Professor  
Ricardo Motta Miranda

Dissertação submetida como  
requisito parcial para  
obtenção do grau de Mestre  
em Fitotecnia

Seropédica, RJ  
Março de 2005

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO**  
**INSTITUTO DE AGRONOMIA**  
**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA**

CLEITON MATEUS SOUSA

Dissertação submetida ao Curso de Pós-Graduação em Fitotecnia, área de Concentração em Cultura de Tecidos Vegetais, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre, em Fitotecnia

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 20 DE JANEIRO DE 2005.

---

Dr. Ricardo Motta Miranda  
(Orientador)

---

Dra. Ana Cristina P. P. Carvalho  
EMBRAPA - Agroindústria Tropical - CE

---

Dra. Nidia Majerowicz  
UFRuralRJ

Aos meus pais, Valdivino Mateus de Sousa e Aparecida  
Helena Mateus

pelo amor, confiança, motivação e esforços durante a  
minha formação

Dedico



## AGRADECIMENTOS

A Deus por ter concedido-me a vida;

À população brasileira, a qual mantém as instituições de educação pública onde tive a oportunidade de realizar minha formação;

Aos meus pais por sempre ter acreditado na minha pessoa e motivado para estudar;

Ao Magnífico Reitor, Ricardo Motta Miranda, o qual fez papel de pai, amigo e orientador durante o período de permanência na Rural, agradeço pela confiança, incentivo e a oportunidade de ingressar no meio acadêmico sob a sua orientação desde o primeiro período da graduação, sendo de grande importância na minha formação;

Aos professores e funcionários do Departamento de Fitotecnia;

Aos funcionários da secretaria do CPGF, Jairo, Gisele e Rose pela simpatia e amizade;

À equipe do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, Renata, Roni, José Fausto, Waltinho, Bruno, Alcemar pela amizade e colaboração na execução deste trabalho;

À Roseli pelo amor e companheirismo;

Aos colegas do Curso, Ariane, Arison, Chico, Cris, Eusínia, Gustavo, Luciana, Madelon, Mariluci, Mariella, Zé Dias, José Milton pela amizade, auxílios e companheirismo;

À João Paulo pela amizade, e a MERISTEM biotecnologia vegetal por ter cedido os materiais vegetais utilizados nos experimentos propostos nesta dissertação;

Aos moradores do 3º andar do M-6, em especial a Deusimar, Henrique, Márcio, Raphael e Jair, pela amizade e companheirismo nos momentos de alegria em que passamos juntos;

Aos membros da banca examinadora que aceitaram o convite para contribuir na elaboração desta dissertação, em especial a Dra. Ana Cristina pelos esforços para a participação na banca;

Por fim, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram na realização desta dissertação.

## **BIOGRAFIA**

Cleiton Mateus Sousa, filho de Valdivino Mateus de Sousa e Aparecida Helena Mateus, nasceu no primeiro dia do mês de agosto de 1981 na cidade de Rubiataba - GO.

Em 1996 ingressou no Curso técnico em Agropecuária na Escola Agrotécnica Federal de Ceres, GO, concluindo em 1998. Ingressou na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro em Março de 1999 e em Março de 2003 graduou-se em Licenciatura em Ciências Agrícolas. Neste período foi estagiário e bolsista de Iniciação Científica (PIBIC-CNPq) no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais sob a orientação do prof. Ricardo Motta Miranda.

Ingressou no Curso de Pós-Graduação em Fitotecnia ao nível de Mestrado em 2003 na mesma Universidade desenvolvendo a dissertação na área de concentração em Cultura de Tecidos Vegetais.



# SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>3</b>
2.1	BIOTECNOLOGIA.....	3
2.2	PROPAGAÇÃO DE PLANTAS.....	3
2.3	REGENERAÇÃO DE PLANTAS <i>IN VITRO</i> .....	4
2.4	MULTIPLICAÇÃO DE PLANTAS <i>IN VITRO</i> .....	9
2.5	DIFERENCIAÇÃO DE RAÍZES.....	11
2.6	APLICAÇÃO DE FITORREGULADORES.....	12
2.7	NUTRIÇÃO DE PLANTAS <i>IN VITRO</i> .....	16
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>18</b>
3.1	IMPLANTAÇÃO DE CULTURAS <i>IN VITRO</i> A PARTIR DE INFLORESCÊNCIAS.....	19
3.2	EFEITOS DE DIFERENTES BALANÇOS ENTRE AUXINA E CITOCININA NO DESENVOLVIMENTO DE BROTO DE GÉRBERA VARIEDADE ORNELA <i>IN VITRO</i> ....	22
3.3	OTIMIZAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DOS SAIS DO MEIO MS NA PROPAGAÇÃO <i>IN</i> <i>VITRO</i> DE GÉRBERA, VARIEDADE ORNELA.....	23
3.4	AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO DE BROTO E ENRAIZAMENTO EM TRÊS VARIEDADES DE GÉRBERA.....	24
3.5	ACLIMATAÇÃO DE TRÊS VARIEDADES DE GÉRBERAS.....	25
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>26</b>
4.1	IMPLANTAÇÃO DE CULTURAS <i>IN VITRO</i> A PARTIR DE INFLORESCÊNCIAS.....	26
4.2	EFEITOS DE DIFERENTES BALANÇOS ENTRE AUXINA E CITOCININA NO DESENVOLVIMENTO DE BROTO <i>IN VITRO</i> DE GÉRBERA, VARIEDADE ORNELA....	32
4.3	OTIMIZAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DOS SAIS DO MEIO MS NA PROPAGAÇÃO <i>IN</i> <i>VITRO</i> DE GÉRBERA, VARIEDADE ORNELA.....	41
4.4	AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO DE BROTO E ENRAIZAMENTO EM TRÊS VARIEDADES DE GÉRBERA.....	48
4.5	ACLIMATAÇÃO DE TRÊS VARIEDADES DE GÉRBERAS.....	52
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>54</b>
<b>6</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>55</b>

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Efeito dos níveis de AIB e BAP na significância dos valores do teste F nas variáveis avaliadas em plântulas <i>in vitro</i> de gérbera, variedade Ornela, avaliadas após oito semanas da implantação do experimento.....	32
Tabela 2. Efeito dos níveis de AIB e kinetina na significância dos valores do teste F nas variáveis avaliadas em plântulas <i>in vitro</i> de gérbera, variedade Ornela, avaliadas após oito semanas da implantação do experimento.....	32
Tabela 3. Efeito do balanço de fitorreguladores e da concentração dos sais do meio MS na significância dos valores do teste F nas variáveis avaliadas em plântulas <i>in vitro</i> de gérbera, variedade Ornela, avaliadas após oito semanas da implantação do experimento.....	41
Tabela 4. Efeito de variedades e do meio de cultura na significância dos valores do teste F nas variáveis avaliadas em plântulas <i>in vitro</i> de gérbera, oito semanas após a implantação do experimento.....	48

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Reinterpretação por PERES (2002) da hipótese proposta por CHRISTIANSON & WARNICK (1988) para o entendimento da competência organogenética.....	7
Figura 2. Modelo para a regeneração de raízes e brotos a partir de explantes de segmentos de raízes de <i>Arabidopsis</i> conforme CARY et al. (2001) e HOWELL et al. (2003).....	8
Figura 3. Estrutura das moléculas de 6-furfurilaminopurina (KIN) e 6-benzilaminopurina (BAP).....	10
Figura 4. Modelo de dois sistemas de sinalização de citocinina em <i>Arabidopsis</i> , conforme HUTCHISON & KIEBER (2002); TAIZ & ZEIGER (2004). (Hpt - Histidina de transferência de Fósforo; H - Histidina; D - Aspartato; P - Fósforo).....	15
Figura 5. Etapas da preparação de explantes de inflorescências de gérbera, variedade Phanter. A - Capítulo após a retirada das pétalas; B - Explantes preparados a partir de inflorescências abertas, divididas em quatro partes e prontos para serem inoculados <i>in vitro</i> .....	19
Figura 6. Classificação dos explantes quanto ao estágio de desenvolvimento das inflorescências.....	20
Figura 7. Efeito do estágio de desenvolvimento das inflorescências nas perdas (%) por contaminação e oxidação de explantes de gérbera variedade Phanter implantadas <i>in vitro</i> . (barra na vertical mostra o desvio padrão).....	26
Figura 8. Contaminação de explantes de gérbera, variedade Phanter, durante a implantação <i>in vitro</i> .....	27
Figura 9. Formação de calo em explante preparado a partir de capítulo médio, variedade Phanter, em meio MS + 10 mg.L <sup>-1</sup> de BAP + 0,5 mg.L <sup>-1</sup> de AIB, após oito semanas da implantação <i>in vitro</i> .....	28
Figura 10. Proliferação de brotos em explantes de gérbera variedade Phanter, preparados a partir de capítulos médios, 30 dias após o segundo subcultivo.....	29
Figura 11. Proliferação de brotos em explantes de gérbera variedade Phanter preparados a partir de inflorescências, 30 dias após a inoculação. 11 A - capítulos jovens; 11 B - capítulos médios.....	29
Figura 12. Regeneração de explantes preparados a partir de inflorescências de gérbera, variedade Phanter, em três estágios de desenvolvimento e em três meios de cultura (M1: 10 mg.L <sup>-1</sup> de BAP; M2: 15 mg.L <sup>-1</sup> de BAP e M3: 20 mg.L <sup>-1</sup> de BAP).....	30
Figura 13. Efeitos de diferentes balanços entre AIB e BAP na proliferação, no desenvolvimento de brotos e na diferenciação de raízes em explantes de gérbera variedade Ornela, oito semanas após a implantação do experimento.....	33
Figura 14. Efeito do nível e do tipo de citocinina na proliferação de brotos em explante de gérbera, variedade Ornela, independente do nível de AIB, oito semanas após a implantação do experimento.....	34
Figura 15. Efeito do nível e do tipo de citocinina no comprimento dos brotos de gérbera, variedade Ornela, independente do nível de AIB, oito semanas após a implantação do experimento (barra na vertical das médias com KIN mostra o desvio padrão).....	37

Figura 16. Efeito do nível de kinetina no acúmulo de massa fresca (MF) em cada broto de gérbera, variedade Ornela, independente do nível de AIB, oito semanas após a implantação do experimento. (barra na vertical das médias mostra o desvio padrão).....	38
Figura 17. Efeito do nível de kinetina no acúmulo de massa seca (MS) em cada broto de gérbera, variedade Ornela, independente do nível de AIB após oito semanas da implantação do experimento. (barra na vertical das médias mostra o desvio padrão).....	38
Figura 18. Efeito da interação de AIB e BAP no acúmulo de massa fresca (MF) em explantes de gérbera, variedade Ornela.....	39
Figura 19. Efeito da interação de AIB e BAP no acúmulo de massa seca (MS) em explantes de gérbera, variedade Ornela.....	40
Figura 20. Efeitos da concentração dos sais do meio MS e dois tratamentos de fitorreguladores na proliferação de brotos na variedade Ornela de gérbera, após oito semanas da implantação do experimento. (z= MS +0,5 mg.L <sup>-1</sup> de AIB + 0,5 mg.L <sup>-1</sup> de BAP; y= MS +0,5 mg.L <sup>-1</sup> de AIB).....	42
Figura 21. Efeito da concentração dos sais do meio MS e dois tratamentos de fitorreguladores no padrão de desenvolvimento de plântulas <i>in vitro</i> de gérbera variedade Ornela. A - MS +0,5 mg.L <sup>-1</sup> de AIB + 0,5 mg.L <sup>-1</sup> de BAP; B-MS + 0,5 mg.L <sup>-1</sup> de AIB.....	43
Figura 22. Efeitos da concentração dos sais do meio MS em duas combinações entre AIB e BAP na massa fresca (MF) dos brotos de gérbera, variedade Ornela, após oito semanas da implantação do experimento. (z= MS +0,5 mg.L <sup>-1</sup> de AIB + 0,5 mg.L <sup>-1</sup> de BAP; y= MS + 0,5 mg.L <sup>-1</sup> de AIB).....	44
Figura 23. Efeitos da concentração dos sais do meio MS em duas combinações entre AIB e BAP no acúmulo de massa seca (MS) em brotos de gérbera, variedade Ornela, após oito semanas da implantação do experimento.....	45
Figura 24. Efeitos da concentração dos sais do meio MS em duas combinações entre AIB e BAP no comprimento médio de brotos (CB) de gérbera, variedade Ornela, após oito semanas da implantação do experimento. (z= MS +0,5 mg.L <sup>-1</sup> de AIB + 0,5 mg.L <sup>-1</sup> de BAP; y= MS +0,5 mg.L <sup>-1</sup> de AIB).....	46
Figura 25. Efeitos da concentração dos sais do meio MS no enraizamento de brotos de gérbera, variedade Ornela, em meio suplementado com 0,5 mg L <sup>-1</sup> de AIB + 0,5 mg L <sup>-1</sup> de BAP, após oito semanas da implantação do experimento.....	47
Figura 26. Número médio de brotos (NMB) de três variedades de gérbera mantidas em meio de cultura favorável à multiplicação (MS + 0,5 mg.L <sup>-1</sup> de AIB + 0,5 mg.L <sup>-1</sup> de BAP) e enraizamento (MS + 0,5 mg.L <sup>-1</sup> de AIB).....	49
Figura 27. Comprimento médio de brotos (CB), em cm, de três variedades de gérbera <i>in vitro</i> , independente do meio de cultura utilizado.....	50
Figura 28. Comprimento médio de brotos (CB) de gérbera <i>in vitro</i> em dois meios de cultura, independente das variedades utilizadas.....	50
Figura 29. Enraizamento de brotos de gérbera <i>in vitro</i> , em dois meios de cultura, independente das variedades utilizadas.....	51
Figura 30. Número médio de folhas (NMF) em três variedades de gérbera durante aclimatização.....	53

## RESUMO

SOUSA, Cleiton Mateus. **Otimização de protocolos para a propagação *in vitro* de gérbera (*Gerbera jamesonii*)**. Seropédica, RJ, UFRRJ, 2005. 74p. (Dissertação, Mestrado em Fitotecnia).

As gérberas são flores de corte que apresentam diversidade na coloração e boa durabilidade. O uso de fitorreguladores na propagação de plantas *in vitro* esta relacionado com a capacidade de induzir a proliferação de brotos e a diferenciação de raízes. No entanto, citocininas em excesso podem induzir a formação de plântulas anormais e com baixo potencial para serem aclimatadas. Além disso, a composição mineral e orgânica do meio de cultura apresenta importante papel durante o processo. O objetivo deste trabalho foi ajustar protocolos para a propagação massal *in vitro* de variedades de *Gerbera jamesonii*. Avaliou-se: o efeito do estágio de desenvolvimento de inflorescências na implantação de culturas *in vitro* a partir de capítulos; variedades; balanços de fitorreguladores; concentração dos sais do meio MS na proliferação de brotos e enraizamento *in vitro* e a aclimatização de três variedades de gérbera. A regeneração de explantes preparados a partir de inflorescências depende do estágio de desenvolvimento das mesmas. Explantes preparados a partir de capítulos jovens apresentaram melhores resultados. A proliferação de brotos em explantes de gérbera, variedade Ornela foi influenciada tanto pela concentração quanto pela fonte de citocinina, assim como pela concentração dos sais do meio MS. A molécula BAP mostrou ser mais eficiente que kinetina para induzir a proliferação de brotos. BAP acima de  $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$  induziu a formação de plantas com características indesejáveis durante a multiplicação *in vitro*, enquanto isto não foi observado mesmo na maior concentração de kinetina ( $4,0 \text{ mg.L}^{-1}$ ). As combinações de  $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$  de BAP com os diferentes níveis de AIB (0; 0,05 e  $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ ) apresentaram os melhores resultados para a multiplicação e produção de brotos *in vitro* com potencial para serem aclimatados da variedade Ornela. Somente o BAP inibiu a diferenciação de raízes. A concentração dos sais abaixo de 50% limitou a proliferação de brotos na variedade Ornela. As variedades Capuccino Mirage e Ornela, quando mantidas no mesmo balanço de BAP e AIB apresentaram resultados divergentes quanto à proliferação de brotos, e na aclimatização apresentaram alta taxa de sobrevivência. Na propagação *in vitro* de gérbera, somente na fase de implantação das culturas *in vitro* que verificou-se dificuldade de regeneração e na formação de brotos em explantes preparados a partir de capítulos. Nas demais fases, as variedades estudadas apresentaram facilidade e resultados bastante promissores.

**Palavras chave:** gérbera, regeneração, multiplicação *in vitro*, auxina, citocinina.

## ABSTRACT

SOUSA, Cleiton Mateus. **Optimization of protocols for *in vitro* propagation in gerbera (*Gerbera jamesonii*)**. Seropédica, RJ, UFRRJ. 2005. 74p. (Dissertation, Mestrado in Fitotecnia).

Gerberas are cut flowers with large color diversity and good durability. The use of growth regulators on *in vitro* propagation is related to the capacity to induce proliferation of sprouts and differentiation of roots. However, cytokinins in excess can induce the formation of abnormal plant, with reduced acclimatization potential. The mineral and organic composition of media culture plays an important role during the process. The objective of this dissertation was to adjust protocols for *in vitro* propagation of *Gerbera jamesonii*. The following aspects were evaluated: (i) the effect of the inflorescence developmental stage on the performance of *in vitro* culture initiated from chapters (ii) gerbera varieties (iii) growth regulator balance and (iv) the effect of salt concentration of MS medium on the proliferation of *in vitro* sprouting and rooting and acclimatization of three varieties of gerbera. For variety Phanter, the regeneration of explants prepared from inflorescences depended on its stage of development. Explants prepared from young chapters showed better results. The concentration and source of cytokinin, and the concentration of salts in MS medium influenced the proliferation of sprouts in explants of variety Ornela. BAP was more efficient than kinetin on proliferation of sprouts. Concentrations above 2.0 mg.L<sup>-1</sup> of BAP induced the formation of plants with undesirable characteristics during *in vitro* multiplication, while this was not observed in the presence of the same kinetin in larger concentration (4.0 mg.L<sup>-1</sup>). The combinations of 0.5 mg.L<sup>-1</sup> BAP with the different levels of IBA showed the best results for multiplication and production of sprouts, with potential for acclimatizing variety Ornela. The presence of BAP inhibited the differentiation of roots, while the same was not observed in largest concentration of kinetin. The concentration of salts below 50% limited the proliferation of sprouts in variety Ornela. The varieties Capuccino, Mirage and Ornela, when maintained in the same balance of BAP and IBA, showed divergences in results for number of sprouts; when acclimatized, they presented high survival rates. Difficulties on *in vitro* gerbera propagation were mostly found on the regeneration phase and on the formation of sprouts in explants prepared from chapters. For the other phases, no major difficulties were detected.

**Key-words:** gerbera, regeneration, multiplication *in vitro*, auxin, cytokinin.

# 1 INTRODUÇÃO

No Brasil, só recentemente a floricultura passou a ser reconhecida nas políticas públicas como atividade agrícola, pois, para os órgãos de fomento, a definição de agricultura girava somente em torno da produção de alimentos, não envolvendo a produção de flores, plantas ornamentais e produtos florestais (CARVALHO & CHIANCA, 2002). No entanto, a floricultura é uma atividade agrícola que apresenta uma considerável importância do ponto de vista social, pois gera emprego, para, em média, 3,7 pessoas por ha de área explorada (KAMPF, 1997), sendo que destes, 38% são mão-de-obra familiar, gerando empregos em minifúndios (GRAÇA & SILVA, 2003). Estes índices são superiores a outras atividades agrícolas (MOREIRA, 2000), e, atualmente, representa uma das formas mais especializadas da agricultura, uma vez que exige alta tecnologia, e um sistema eficiente e rápido na distribuição e comercialização de seus produtos (SATO et al. 1999).

Em anos recentes, o setor de flores e plantas ornamentais adquiriu visibilidade no *agribusiness* nacional, até então voltado quase exclusivamente para produção de alimentos direcionados para os mercados interno e externo (CASTAN, 2003).

Nos países europeus e nos Estados Unidos da América, entre alguns outros, a produção de flores e plantas ornamentais é considerada como atividade agrícola de grande importância há muitos anos. Entretanto, as condições ambientais destes países limitam a produção vegetal durante algumas estações do ano, sendo necessário o cultivo em ambientes controlados, o que gera um elevado custo na produção. Diante disso, o Brasil apresenta grande potencial para a produção de plantas e flores destinada à exportação a estes países.

O mercado brasileiro de flores no triênio 1995-1998 cresceu 23% ao ano, passando de US\$ 700 milhões em 1995, a valor de varejo, para US\$ 1,3 bilhões em 1998. Desse último valor, estima-se que a floricultura paulista contribuiu com cerca de 60%, ou seja, em torno de US\$ 800 milhões. Com base no ano de 1998, estimou-se que o gasto *per capita* ao ano no Brasil seja de US\$ 6.00, o dobro relativamente ao ano de 1994, que era de US\$ 3.00, valor muito baixo quando comparado com o dos países desenvolvidos (EUA: US\$ 36.00; Alemanha: US\$ 137.00; Noruega: US\$ 143.00), e baixo em relação a países emergentes como a Argentina que tem um consumo na ordem de US\$ 25.00 anuais (KIYUNA, 1999 citado por GRAÇA & SILVA, 2003).

No período de 2000 à 2003 houve um salto em torno de 37% na exportação de produtos da floricultura, passando de R\$ 21.692,39 para R\$ 59.010,33. Isto ocorreu principalmente devido o aumento na qualidade da produção, suprimindo às exigências do mercado internacional. Em 2004, até o mês de agosto, as exportações atingiram cerca de R\$ 49.740,54, e que provavelmente no decorrer do ano, os valores seria superior aos valores dos anos anteriores (IBRAFLOR, 2005). Segundo o Instituto Brasileiro de Floricultura as exportações, neste período, não chegam a 5% da produção nacional.

O Estado do Rio de Janeiro, apesar de ser um dos pioneiros na implantação da floricultura no Brasil, não tem apresentado evolução neste setor, ao contrário de outros Estados, principalmente São Paulo (CARVALHO & CHIANCA, 2002) e mais recentemente em alguns estados do Nordeste, que tem apresentado substancial crescimento. Um dos motivos desta diferença na evolução, provavelmente, se deve às poucas pesquisas direcionadas à produção de flores e plantas ornamentais e a inexistência de interesses de órgãos governamentais do Estado do Rio de Janeiro, ao longo das últimas décadas.

Desde o final da década de 80 a floricultura brasileira vem sendo objeto de mudanças visando um re-arranjo de sua estrutura produtiva, de modo a atender ao crescimento da demanda dos mercados interno e externo. Além disso, esse movimento não se restringe à retomada da produção de estados tradicionais, incluindo também a formação de pólos de flores e plantas ornamentais, em unidades federativas de pouca tradição no setor. Desta forma, a floricultura vem se tornando uma das atividades agrícolas caracterizadas pelo uso intensivo de tecnologia avançada, derivada, sobretudo, do estreitamento das relações entre produção e pesquisa agrícola, com repercussões em toda a cadeia produtiva (CASTAN, 2003).

O Estado do Rio de Janeiro, reconhecido como o segundo maior mercado consumidor de flores de corte e plantas ornamentais no Brasil, com cerca de 14,7 % do mercado nacional, importa de outros Estados, principalmente de São Paulo, grande parte dos produtos ornamentais comercializados (BONGERS, 1999), uma vez que no ano 2000 a produção no Estado representou apenas 2,7% da produção nacional (CASTAN, 2003).

Apesar da região serrana, tradicionalmente, explorar algumas espécies de flores de corte, a quantidade e a qualidade desses produtos são inferiores às necessidades e exigências do mercado, conforme diagnosticado no Programa de Desenvolvimento da Floricultura no Estado do Rio de Janeiro, organizado pela Superintendência de Agronegócios da Secretaria de Estado de Agricultura, Abastecimento, Pesca e Desenvolvimento do Interior - SEAAPI (NACIF et al. 2002).

Entre os diversos fatores limitantes ao desenvolvimento do setor de floricultura e de plantas ornamentais no Estado do Rio de Janeiro, destaca-se a inexistência de oferta de mudas e propágulos de boa qualidade, alto custo e baixa diversidade genética de espécies de grande demanda ou com elevado potencial de consumo no mercado carioca e fluminense.

Até alguns anos atrás, a propagação de plantas no Brasil era feita basicamente por estacas, divisão de touceiras, bulbos, sementes etc. Com a crescente competitividade de mercado, que vem exigindo cada vez mais plantas padronizadas, com ciclo homogêneo e isentas de pragas e doenças, a propagação de plantas *in vitro* vem ampliando seu espaço, sendo empregada principalmente para propagação de espécies com maior interesse de mercado (MOTOS, 1998)

A propagação de plantas *in vitro* constitui-se em uma aplicação da cultura de tecidos vegetais de maior importância na produção massal de plantas saudáveis e geneticamente certificadas, ou seja, é um método que possibilita a oferta contínua e em grande quantidade de mudas clonais, podendo ser produzidas em curto espaço de tempo e a baixo custo, dependendo da eficiência do protocolo e da otimização das técnicas de propagação *in vitro* utilizadas.

No diagnóstico realizado no censo da floricultura do Estado do Rio de Janeiro (CASTAN, 2003), levando em consideração as condições edafoclimáticas presentes nas diversas regiões do Estado, a tradição no cultivo e a existência de mercados promissores, entre outros fatores, a cultura da Gérbera foi incluída entre as três espécies mais promissoras para o Estado do Rio de Janeiro, apresentando expressiva expansão no mercado consumidor nacional. Além disso, as gérbereas apresentam alta sensibilidade no transporte, dificultando desta forma, a comercialização do produto em mercados distantes dos centros de produção.



## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Biotecnologia

A biotecnologia, envolvendo diversas técnicas, utiliza organismos vivos ou partes destes para produzir ou modificar produtos, melhorar geneticamente plantas e animais, ou desenvolver microrganismos para fins específicos (TORRES et al. 2000).

A cultura de tecidos vegetais, uma ferramenta da biotecnologia, apresenta importância econômica tanto na área de produção de mudas de espécies hortícolas, florestais e ornamentais, quanto na pesquisa científica. Esta técnica vem sendo utilizada, principalmente, para a propagação massal de plantas *in vitro*, limpeza clonal, conservação e intercâmbio de germoplasma de muitas espécies vegetais (ROCA et al. 1991).

Os EUA foi o país pioneiro na propagação de plantas em escala comercial com o uso da cultura de tecidos. Nos últimos 30 anos o uso da cultura de tecidos na propagação de plantas tem sido uma das mais importantes ferramentas da biotecnologia agrícola no mundo inteiro. Entre as demais ferramentas, apresenta grande sucesso nas aplicações práticas e resultados promissores para a produção de mudas com alta qualidade e em escala que supri as exigências do mercado de mudas de genótipos de interesse. Entre 1986 e 1993 a produção mundial de plantas propagadas *in vitro* aumentou cerca de 50%. Em 1993 a produção estava em torno de 663 milhões de plantas e em 1997 atingiu 800 milhões de plantas (FAO/IAEA, 2002).

### 2.2 Propagação de Plantas

A demanda em mudas de plantas de interesse econômico, quer sejam ornamentais, olerícolas, frutíferas ou florestais, incentivou o surgimento de produtores especializados na propagação de plantas em escala industrial (KÄMPF, 2000). Atualmente, e acredita-se que a tendência é de aumentar, os consumidores vem exigindo mudas com excelente qualidade fitossanitária, certificadas geneticamente e que possam ser adquiridas durante todo o ano, independente das condições ambientais, para implantação ou reposição de matrizes.

Para muitas espécies vegetais, incluindo as gérberras, a propagação por sementes, apesar de ser possível, gera algumas segregações genéticas, o que aumenta a variabilidade entre as mudas e dificulta a obtenção de progênies com as características da planta mãe. Diante disso, a propagação vegetativa torna-se uma alternativa que permite a obtenção de mudas com maior fidelidade genética à planta mãe.

O método de propagação pode ser um fator que influencia no crescimento e desenvolvimento da nova planta obtida. LEWANDOWSKI (1998) observou que plantas de *Miscanthus x giganteus* propagadas por rizomas apresentaram menor número de brotos vigorosos, rizomas menos espessos e ramificados do que plantas propagadas *in vitro*. No campo, o desenvolvimento de plantas obtidas da proliferação direta de brotos *in vitro* foi mais lento que plantas obtidas a partir de embriões somáticos.

A propagação de gérberras por sementes não preserva as características da matriz, originando progênies desuniformes, enquanto que a propagação por divisão de touceiras é demorada, apresenta baixo rendimento, além de manter e disseminar agentes patogênicos, comprometendo a qualidade das matrizes para produção de flores nas sucessivas gerações (MURASHIGE et al. 1974).

A propagação de plantas *in vitro*, também denominada como micropropagação, é uma técnica que utiliza a cultura de tecidos vegetais para a propagação de plantas a partir de fragmentos, denominados explantes, sob condições ambientais controladas, meio nutritivo e condições de plena assepsia.

A teoria da totipotencialidade das células vegetais formulada por Matthias Schleiden & Theodor Schwann, em 1838, pode ser dita que constitui um dos primeiros fundamentos da cultura *in vitro*, embora seus formuladores nem tenham imaginado uma metodologia como esta. A teoria afirma que a célula é autônoma, portanto, que contém o potencial necessário para originar um organismo completo; nesse caso, uma planta. É claro que essa capacidade deve manifestar-se sob especiais condições de estímulo. Em decorrência desta teoria, células com diferentes fenótipos dentro da planta têm idêntico genótipo. Haberlandt, um fisiologista vegetal austro-húngaro, por volta de 1902, imbuído dessa teoria, foi o primeiro a manipular um sistema de cultura *in vitro* de plantas, procurando estabelecer e consolidar um sistema de micropropagação. Infelizmente, por limitações técnicas da época, seus esforços falharam (CID, 2001).

Conforme BARBOSA et al. (1992) para o sucesso da propagação de plantas *in vitro* em grande escala, três etapas devem ser definidas. Primeira, o estabelecimento dos explantes em meio de cultura, segunda, a otimização do meio para a multiplicação, bem como das condições externas, para obter-se altas taxas de multiplicação e por fim a aclimação das mudas. No entanto, GRATTAPAGLIA & MACHADO (1998) afirmam que estas etapas não precisam necessariamente ser seguidas, permitindo alterações conforme as peculiaridades de cada espécie. De acordo com as características das espécies vegetais, estes autores sugerem que uma etapa de alongamento das partes aéreas antes da aclimatização pode ser inserida. Para cada genótipo, de acordo com as suas peculiaridades, deve-se definir metodologia específica para cada uma destas fases.

### **2.3 Regeneração de Plantas *in vitro***

Com base no fenômeno da totipotência das células vegetais, isto é, na capacidade de uma única célula dividir-se, diferenciar-se e formar uma planta completa, a cultura de tecidos possibilita a regeneração de clones idênticos à planta mãe, contendo todas as informações genéticas, num processo caracterizado como clonagem, a partir de fragmentos de órgãos (AMARAL, 2003).

A diferenciação celular é um processo que depende da interação de no mínimo três fatores principais. O primeiro diz respeito ao fator genético, o "estoque" das potencialidades do genótipo que pode ser expresso durante o processo. O segundo representa as características obtidas durante a ontogênese, inicialmente em resposta aos estímulos ambientais, que uma vez estabelecidas, tendem a se manter de forma estável ou permanente. Por último, não menos importante, são as características que dependem apenas do ambiente para expressarem-se (KERBAUY, 1999).

Conforme HANDRO & FLOH (1990) a morfogênese é consequência dos processos de divisão e diferenciação celular integrados, conduzindo a um nível de organização supracelular. Tais processos dependem de certos sinais (fitormônios e luz principalmente) que agindo direta ou indiretamente ao nível gênico, desencadeiam processos específicos de síntese, e como consequência, alterações bioquímicas e metabólicas diversas. Para ALMEIDA (2002) o processo morfogenético depende basicamente da atividade e expressão de determinados genes.

A organogênese *in vitro* em tecidos vegetais normalmente ocorre em resposta a adição de fitoreguladores exógenos ao meio de cultura, na maioria das vezes auxina e citocinina. Alta relação auxina/citocinina no meio de cultura induz a formação de raízes,

baixa relação auxina/citocinina promove a proliferação de brotos e quando a relação auxina/citocinina no meio está balanceada promove a proliferação de células de forma desorganizada e a formação de calo (YAMAGUCHI et al. 2003). Entretanto, a formação de órgão em explantes *in vitro* parece depender principalmente do balanço endógeno destas moléculas, uma vez que estas respostas não ocorrem em todas as espécies vegetais quando mantidas nas condições acima citadas (SOUSA & MIRANDA, 2002; REIS, 2001).

Apesar da cultura de tecidos vegetais contribuir significativamente nos estudos direcionados à morfogênese, ainda há dificuldades em relação à composição do meio de cultura, balanço de fitorreguladores, tipo de explante e idade fisiológica dos explantes, para que possa obter condições ideais para a divisão e diferenciação celular. CARVALHO (2003), YASATOSHI et al. (2003) ressaltam que os mecanismos moleculares que governam a capacidade de regeneração de plantas *in vitro* ainda são pouco compreendidos.

Mesmo com a dependência de vários fatores para o sucesso da propagação *in vitro* de plantas, GRATTAPAGLIA & MACHADO (1998) acreditam que, por exemplo, a composição do meio não seja uma das variáveis determinantes no sucesso da propagação *in vitro* ou o segredo de um protocolo comercial, uma vez que as funções dos componentes utilizados nos meios de culturas, na maioria das vezes, já são bem conhecidas e podem ser repetidas em muitos casos.

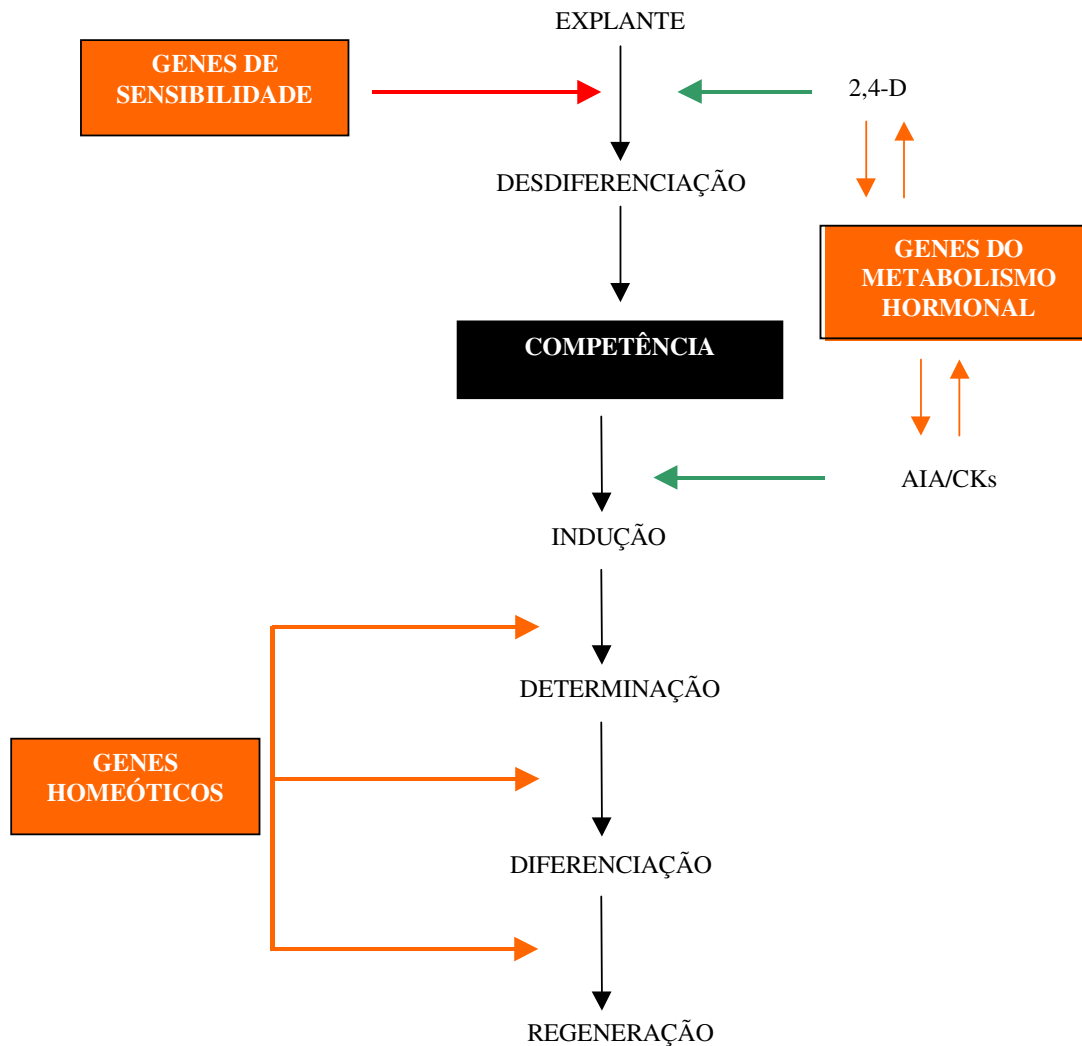
Considerando que cada genótipo apresenta características únicas, determinadas por fatores genéticos, as necessidades para o cultivo *in vitro* também tendem a ser específicas (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998). A capacidade de regeneração e crescimento parece estar associada não apenas ao genótipo, mas também à atividade fisiológica na planta matriz, sob o controle de diversos fatores endógenos e exógenos. Os mesmos autores ainda afirmam que o maior desafio para o sucesso de um protocolo para a propagação *in vitro* de plantas em escala comercial está no material vegetal e na sua manipulação antes de excisar o explante inicial, e em todas as etapas do processo, incluindo o transplante da planta produzida.

O uso de órgãos já diferenciados e desenvolvidos como inflorescências, segmentos de raízes e folhas apresentam potencial para a implantação de culturas *in vitro*. Estes, atualmente vêm despertando o interesse para serem utilizados para a propagação de plantas *in vitro*, principalmente por evitar o sacrifício da planta matriz, e além disso, quando utiliza explantes que não permanecem em contato com o solo (inflorescências e folhas por exemplo) apresentam maior facilidade de desinfestação.

Diversos fatores estão associados com o sucesso da regeneração de culturas *in vitro*. Tais fatores são variados e interagem de diversas formas, sendo quase que impossível caracterizar um único fator específico para cada fenômeno morfogenético. Os efeitos isolados ou sinérgicos desses fatores variam de acordo com as condições de cada tipo de célula, que podem ser mais ou menos definidos de acordo com o tecido, órgão, espécie, variedade ou cultivar, e peculiar para uma determinada condição fisiológica de momento (HANDRO & FLOH, 1990).

Na reinterpretação da hipótese proposta por CHRISTIANSON & WARNICK (1988), PERES (2002) dividiu o processo de organogênese *in vitro* nas seguintes etapas: 1) desdiferenciação; 2) aquisição da competência; 3) indução; 4) determinação; 5) diferenciação e 6) formação de órgãos (FIGURA 1). No entanto, entre estas etapas alguns genes (indicados na FIGURA 1) podem estar envolvidos na sensibilidade celular (genes de sensibilidade), no metabolismo hormonal (que codificam enzimas de biossíntese e/ou degradação de hormônios) e na formação de órgãos (genes homeóticos). A expressão desfavorável de qualquer uma dessas classes de genes seria

suficiente para impedir a regeneração do tecido, confirmando a proposta de ALMEIDA (2002) citada anteriormente. A divisão do processo organogênico em etapas permitiu a esses autores postularem que, a falha na organogênese *in vitro* ocorre principalmente durante a etapa de aquisição de competência (PERES, 2002). Contudo, pouco se conhece, até o momento, sobre os mecanismos envolvidos na aquisição de competência para organogênese (KERBAUY, 1999).



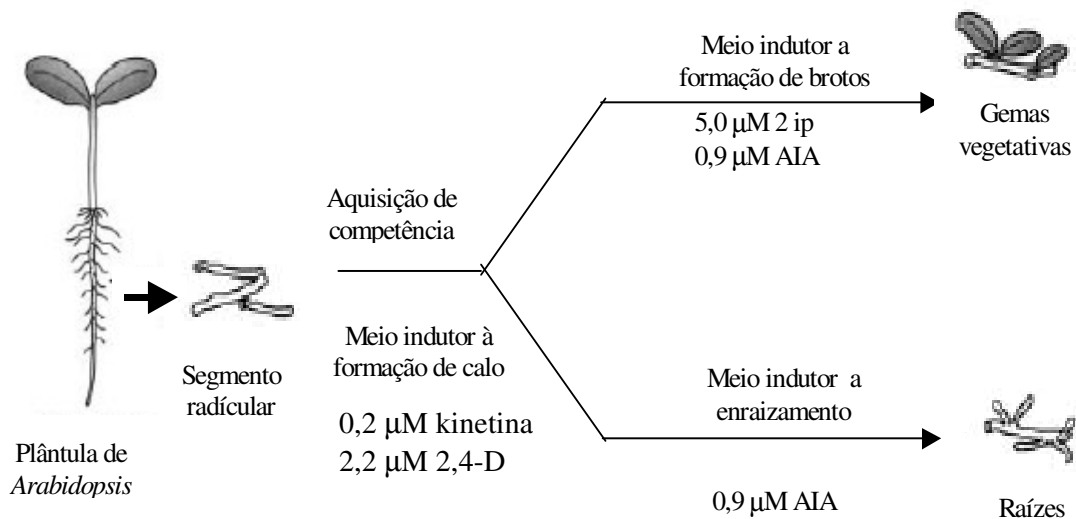
**Figura 1.** Reinterpretação por PERES (2002) da hipótese proposta por CHRISTIANSON & WARNICK (1988) para o entendimento da competência organogênica.

A competência celular refere-se a capacidade do tecido vegetal responder à estímulos específicos (hormônios, luz, temperatura etc.) necessários para induzir a formação de órgãos ou alterar o desenvolvimento do vegetal. CARY et al. (2001) sugerem que a falta de receptores para as moléculas hormonais utilizadas na indução do processo organogênico pode refletir na falha da competência do tecido.

PERES (2002) relata que, de modo geral, quanto maior a determinação do tecido para uma via de desenvolvimento (por exemplo, a formação de raízes) menor será a

competência para estes tecidos formarem outro tipo de órgão (por exemplo, gemas caulinares). CENTENO et al. (1997) verificaram que a capacidade de formar embriões somáticos em explantes de avelã (*Corylus avellana* L.) decresce com o grau de maturidade dos embriões zigóticos. No entanto a regeneração de brotos a partir de explantes de segmentos de raízes de *Arabidopsis* foi esquematizada nos trabalhos de CARY et al. (2001) e HOWELL et al. (2003).

De acordo com o modelo proposto na FIGURA 2, para haver a regeneração de órgãos, os tecidos têm que haver competência. Em tecidos já diferenciados, acredita-se que a aquisição da competência celular pode ser obtida pela permanência destes em meio de cultura que induz à formação de calo, ocorrendo a desdiferenciação, a perda da especialidade das células, e conseqüentemente estas células adquirem a competência celular, tornando-se possível a diferenciação em outro órgão. Neste caso, as células apresentam capacidade de responder aos estímulos sinalizados pelos fitoreguladores. Posteriormente, quando mantidos em meio contendo balanço favorável à citocinina, ocorre a formação de brotos e quando favorável à auxina, a formação de raízes (CARY et al. 2001).



**Figura 2.** Modelo para a regeneração de raízes e brotos a partir de explantes de segmentos de raízes de *Arabidopsis* conforme CARY et al. (2001) e HOWELL et al. (2003).

REYNOIRD et al. (1993) estudaram a regeneração de plantas a partir de folhas inteiras com diferentes estádios de desenvolvimento em dois clones de gérbera e verificaram que a capacidade regenerativa decresce progressivamente com o incremento do estágio de desenvolvimento das mesmas, não havendo regeneração em folhas totalmente expandidas. Conforme os mesmos autores, após o enraizamento e

aclimatização das plântulas não detectou-se variações fenotípicas durante as fases vegetativa e reprodutiva.

Na literatura encontram-se protocolos para a implantação de gérbera *in vitro* principalmente a partir de ápices caulinares ou capítulos florais em diferentes estádios de desenvolvimento (MURASHIGE et al. 1974; PIERIK et al. 1975; LALIBERTÉ, et al. 1985; ARELLO et al. 1991; BARBOSA et al. 1994; RADICE & MARCONI, 1998; SEVERIN et al. 2000). Conforme alguns destes autores, a implantação da cultura *in vitro* a partir de capítulos florais apresenta as vantagens de estar presentes em maior números na planta matriz, apresenta maior facilidade na desinfestação e, sobretudo, por utilizar uma técnica que mantém a matriz intacta, uma vez que os explantes são excisados das inflorescências, sem sacrificar as plantas. No entanto, MURASHIGE et al. (1974) verificaram que explantes de ápices caulinares, apesar de apresentar maior dificuldade de desinfestação, apresentaram maior número de brotos quando comparados com explantes de capítulos florais. Já SEVERIN et al. (2000) estudando a propagação *in vitro* de gérbera a partir de diferentes tipos de explantes, verificaram que explantes de primórdios de capítulos apresentaram maior taxa de proliferação do que ápices de rizomas, além de apresentarem maior percentual de sobrevivência e menor contaminação.

A regeneração de plântulas de gérbera a partir de capítulos florais necessita de uma seleção cuidadosa do material a ser utilizado, uma vez que a resposta morfogênica depende do grau de desenvolvimento da inflorescência (RADICE & MARCONI, 1998). Os mesmos verificaram que o tamanho ideal do capítulo, para as respostas morfogênicas estudadas, está entre 0,5 e 1,0 cm de diâmetro.

## 2.4 Multiplicação de Plantas *in vitro*

Embora, desde o início da década de 70, alguns pesquisadores já terem definidos protocolos para a multiplicação *in vitro* de gérbera (MURASHIGE et al. 1974; PIERIK et al. 1975; PIERIK et al. 1982; LALIBERTÉ, et al. 1985; BARBOSA, et al. 1993 a), estes protocolos nem sempre são eficientes e viáveis para a multiplicação *in vitro* de outras variedades desta espécie. Conforme PERES (2002), mesmo com os avanços da biotecnologia a organogênese *in vitro* ainda continua sendo controlada de maneira empírica, sendo necessário, portanto, definir protocolos para cada genótipo, uma vez que a indução para a diferenciação celular é principalmente controlada pelo balanço hormonal endógeno e a sensibilidade celular dos tecidos, os quais são de difícil determinação e estão em função do genótipo e do estado fisiológico da planta.

Quanto ao balanço de fitorreguladores, na década de 50, SKOOG & MILLER (1957) sugeriram que as concentrações relativas entre auxina e citocinina são mais importantes do que as concentrações absolutas das mesmas para o controle da organogênese *in vitro*, sendo aceito até os dias atuais (MERCIER et al. 2003). No entanto, CENTENO et al. (1997) verificaram que além do balanço hormonal endógeno ser um importante fator na formação de embriões em culturas de avelã (*Corylus avellana* L.), este evento também depende da competência celular das culturas *in vitro*.

As auxinas, embora estejam relacionadas com a indução de formação de calos e enraizamento (MATHUR et al. 1995), podem ser utilizadas para estimular o crescimento das partes aéreas (EAPEN et al. 1998; SUDHA, et al. 1998).

As citocininas estão envolvidas no controle de diversos e importantes processos associados com o crescimento e desenvolvimento vegetal. Elas fazem parte do controle da divisão celular, desenvolvimento de cloroplastos, diferenciação de gemas, iniciação e desenvolvimento de brotos, crescimento e senescência de folhas (BRAULT &

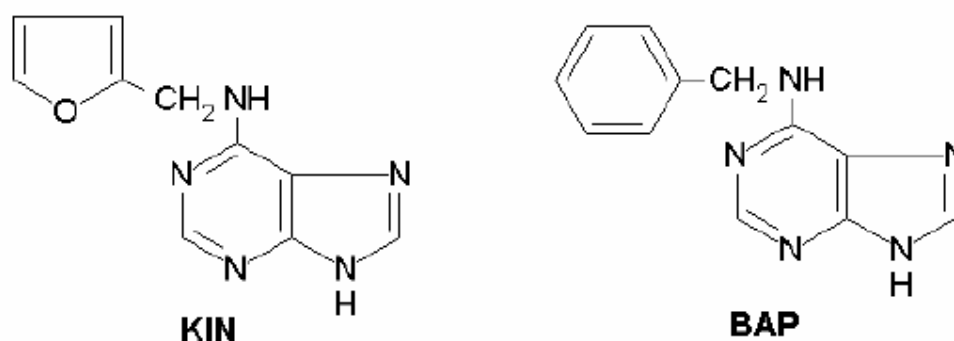
MALDINEY, 1999). Diante disso, é comum o uso de citocininas para induzir a diferenciação e o desenvolvimento de gemas vegetativas em culturas *in vitro* (OHKI & SAWAKI, 1999).

Segundo TOPOONYANONT et al. (1999), o incremento de citocinina tem sido utilizado para aumentar a proliferação de brotos em culturas de gérbera *in vitro*. No entanto, as citocininas em excesso podem induzir a formação de tufos, plântulas anormais, e com baixo potencial para serem aclimatadas.

A ação de uma substância reguladora do crescimento começa logo após a percepção da molécula por receptores presentes na membrana celular, desencadeando uma série de eventos fisiológicos. BLAKESLEY et al. (1991), trabalhando com gérbera, observaram que a maioria da citocinina, BAP, adicionado ao meio de cultura foi acumulado nas culturas nos primeiros 20 dias, mostrando que, caso as células em estudo apresentem competência para diferenciação, este período é suficiente para induzir determinados processos fisiológicos.

O ajuste do processo da propagação *in vitro* para obter grande quantidade de plântulas e com alta qualidade permite obter material propagativo com preços competitivos (TOPOONYANONT & DEBERGH, 2001). No entanto, vários problemas têm sido responsáveis pelas perdas em relação a quantidade e qualidade das plântulas produzidas, entre os quais a formação de tufos. Estes são caracterizados pela formação de plântulas com grande número de folhas, pecíolos curtos e pequenas laminas foliares, o que causa anomalias em culturas *in vitro*. Este fator causa perda na produção de mudas de gérbera de até 30% durante o processo de multiplicação *in vitro* e na aclimação (TOPOONYANONT et al. 1999).

Além da concentração, as diferentes moléculas utilizadas como reguladoras do crescimento vegetal adicionadas no meio de cultura, em grande parte, determinam o sucesso dos trabalhos com cultura de tecidos (ROUT, 2000). As divergências dos resultados com diferentes fontes de citocinina podem estar associadas à sensibilidade dos receptores presentes nos tecidos e às estruturas das moléculas (FIGURA 3).



**Figura 3.** Estrutura das moléculas de 6-furfurilaminopurina (KIN) e 6-benzilaminopurina (BAP).

As moléculas BAP, Zeatina, Kinetina e 2 ip são as principais fontes de citocinina utilizadas em cultura de tecidos. Conforme GRATTAPAGLIA & MACHADO (1998) entre as citocininas comercialmente disponíveis o BAP, em geral, é a que apresenta



melhores resultados para a maioria dos trabalhos com cultura de tecidos, além de apresentar menor custo na aquisição.

Na literatura encontram-se trabalhos utilizando tanto BAP quanto kinetina como fonte de citocinina durante a fase de multiplicação de gérbera *in vitro*, e em alguns casos a associação destas duas moléculas (ARELLO et al. 1991). Estes autores verificaram que o uso de kinetina junto com BAP não interferiu na regeneração de duas variedades de gérbera *in vitro*. ARELLO (1998) recomenda o uso de  $6,0 \text{ mg.L}^{-1}$  de BAP +  $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$  de AIA durante a fase de multiplicação das culturas *in vitro*. No entanto, BARBOSA et al. (1993 a) mostraram que o número de folhas novas, formadas em cada explante de gérbera, aumentou até a concentração de  $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$  de BAP, independente do nível de AIA estudado, em seguida havendo tendência de redução desta variável. Diante disso, o uso de níveis de citocinina acima deste, provavelmente podem estar acima do nível que induz melhores resultados quanto ao número de folhas formadas em cada explante, podendo causar algumas características indesejáveis durante a fase de multiplicação. Deve-se ressaltar que as variedades em estudo não foram as mesmas, podendo haver comportamento diferente entre estas, uma vez que LALIBERTÉ et al. (1985) verificou-se que cada variedade em estudo apresentou exigência específica do balanço de fitorreguladores para a produção de maior número de brotos.

A concentração e a forma molecular de cada substância para induzir melhores resultados quanto a proliferação de brotos pode variar entre cada genótipo estudado. ROUT & DAS (1997) citam que a kinetina foi menos eficiente para induzir a regeneração de brotos, comparando-se com BAP, em crisântemo.

Apesar que na comparação de moléculas com ação hormonal deve se levar em consideração o peso molecular de cada uma e não a concentração expressa em massa/volume, neste caso a comparação em massa inserida no meio de cultura não varia tanto, uma vez que os pesos moleculares destas moléculas são bem próximos.

## 2.5 Diferenciação de Raízes

Algumas pesquisas sugerem que a diferenciação de raízes adventícias está associada com a quantidade de moléculas de auxinas presentes na zona de regeneração. Em algumas espécies, verificou-se incremento no conteúdo de auxina endógena na zona de enraizamento durante o processo. Desta forma o uso de auxina exógena tem sido utilizado para aumentar o nível endógeno e promover o enraizamento, sugerindo que a ocorrência da formação de raízes requer um nível ótimo destas moléculas. Para algumas espécies, baixa quantidade de auxina endógena implica na falha de enraizamento. Entretanto, em outras espécies, o nível endógeno de auxina não demonstrou ser fator limitante (GASPAR & HOFINGER 1988.). Por exemplo, STOLTZ (1968) citado por GASPAR & HOFINGER (1988) observou que a formação de raízes em crisântemo não foi correlacionada positivamente com o nível endógeno de auxina. Em contraste, o número de primórdios radiculares laterais em *Pisum sativum* (ervilha) aumentou após a decapitação, no entanto o nível de AIA não foi alterado.

A formação de raízes em algumas espécies pode ocorrer espontaneamente. Este fato, provavelmente deve estar associado com a presença de primórdios radiculares já existentes nos explantes e, quando mantidos em condições favoráveis, ocorre apenas o crescimento (VAN STADEN & HARTY 1988).

LALIBERTÉ et al. (1985) verificaram que cada uma das variedades estudadas exige um balanço hormonal específico para determinado evento fisiológico. No trabalho de RADICE & MARCONI (1998) não houve diferenças significativas entre os

tratamentos utilizados para induzir o enraizamento em brotos de seis variedades de gérbera *in vitro*. No entanto, estes autores não compararam o percentual de enraizamento entre as variedades. Enquanto a cultivar "Leca" apresentou 98,25% de enraizamento, a cultivar "Garlenda" apresentou 78,75%. Em meio com carvão ativo, apesar de não verificar diferença significativa, a cultivar "Garlenda" apresentou a menor média de enraizamento (67%) enquanto na cultivar "Leca" apresentou maior média (100%). Diante destes resultados, verifica-se que as variedades em estudo apresentam comportamentos distintos, mesmo quando mantidas nas mesmas condições.

## 2.6 Aplicação de Fitorreguladores

Os fitorreguladores são moléculas com ação hormonal e que, em baixas concentrações, promovem, inibem ou modificam processos morfológicos e fisiológicos nos vegetais. Estas moléculas possuem grandes potenciais em aplicações práticas na agricultura. Atualmente, já existem algumas aplicações de fitorreguladores no manejo e no controle do desenvolvimento vegetal. No entanto, pouco ainda se sabe sobre o modo de ação dos fitorreguladores, restando um campo de estudo para o uso consciente de fitorreguladores no controle do desenvolvimento vegetal.

A aplicação prática de fitorreguladores na agricultura consiste, principalmente, no controle de plantas invasoras, indução à formação de raízes adventícias em estacas e de brotos, indução à floração, raleio de frutos, controle do amadurecimento de frutos e como retardadores do crescimento (DAVIES, 1995).

A propagação de plantas *in vitro*, com o uso da cultura de tecidos vegetais, sem dúvida representa uma das mais importantes aplicações dos fitorreguladores, uma vez que os tecidos utilizados como explantes nem sempre apresentam balanços hormonais endógenos suficientes para induzir uma resposta fisiológica desejada. Entretanto, a adição de fitorreguladores em meio de cultura tem o principal objetivo em suprir as possíveis deficiências dos níveis hormonais endógenos nos tecidos que se encontram isolados da planta matriz (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998). Na maioria dos sistemas de cultura de tecidos, tanto a concentração quanto o tipo da molécula utilizada são fatores determinantes no controle do crescimento e no padrão de desenvolvimento de culturas *in vitro* (CALDAS et al. 1998).

Geralmente, quando o balanço exógeno de fitorreguladores está favorável à citocinina ocorre a diferenciação e o desenvolvimento de gemas vegetativas, e quando favorável à auxina, ocorre a diferenciação e o desenvolvimento de raízes (TAIZ & ZEIGER, 1998). Entretanto, em alguns casos, mesmo com o balanço exógeno favorável a uma classe desses fitorreguladores, pode haver a diferenciação de órgãos que são induzidos pela outra classe. SOUSA & MIRANDA (2002) verificaram que culturas de vinca (*Catharanthus roseus*) *in vitro*, não apresentaram padrão regenerativo esperado com os balanços exógenos de AIB e BAP utilizados. Quando o balanço era altamente favorável ao AIB observou os melhores resultados quanto à formação de tecido caloso, e os maiores níveis de AIB apresentaram melhores resultados em relação ao número e o desenvolvimento de brotos formados. Estes fatos devem ser associados com o balanço hormonal endógeno presente nos tecidos e a sensibilidade celular às moléculas utilizadas, os quais irão variar entre cada genótipo e até mesmo nas condições em que a planta matriz está mantida.

Na maioria das vezes, explantes utilizados em culturas de tecidos possuem baixas ou não tem a capacidade de síntese de moléculas com ação hormonal. Assim, certos tecidos apresentam dependência total do suplemento de fitorreguladores exógenos no meio de cultura, enquanto outros sintetizam as quantidades necessárias

para induzir determinada resposta fisiológica (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

A adição de fitorreguladores em meio de cultura parece estar associada às alterações que ocorrem no balanço hormonal endógeno nos tecidos após o tratamento.

O uso de um fitorregulador pode incrementar ou inibir a síntese de moléculas com ação hormonal, assim como de moléculas responsáveis por outros eventos, como as peroxidases, alterando desta forma o balanço hormonal endógeno e até mesmo de moléculas responsáveis pela sensibilidade, degradação da molécula com ação hormonal, os quais podem induzir ou inibir uma determinada resposta fisiológica. SUZUKI et al. (2004) verificaram que a presença de paclobutrazol no meio de cultura provocou a inibição da síntese de giberelina e, embora não tenham sido observados efeitos na atividade do meristema apical, inibiu fortemente o crescimento dos brotos.

A aplicação de auxina em brotos de noz *in vitro*, aumentou rapidamente o conteúdo de AIA livre e, simultaneamente, reduziu a atividade da peroxidase, estes eventos foram destacados como de grande importância na indução do enraizamento observado (BISBIS et al. 2003).

A ação de uma determinada classe hormonal envolve três etapas principais: a percepção; a transdução e a resposta (LIBBENGA & MENNES, 1995). A percepção é feita através da ligação do hormônio a um receptor, geralmente uma proteína.

Os mecanismos de ação apresentam especificidade para cada classe hormonal. No entanto, de maneira geral, PERES & KERBAUY (2004) descrevem este mecanismo da seguinte forma:

- Após a ligação, o receptor pode sofrer mudanças conformacionais indo para um estágio ativado que por sua vez inicia um programa molecular que leva a uma resposta específica, desse modo, as proteínas receptoras atuam tanto na detecção como na transdução do sinal;

- Outras moléculas, mensageiros secundários, podem estar envolvidas na transdução do sinal, amplificando-o;

- Por fim, o sinal percebido e amplificado deve agir sobre mecanismos celulares básicos como a expansão, divisão ou diferenciação, os quais são alvos primários, e cuja somatória de efeitos se traduz na modificação do vegetal como um todo.

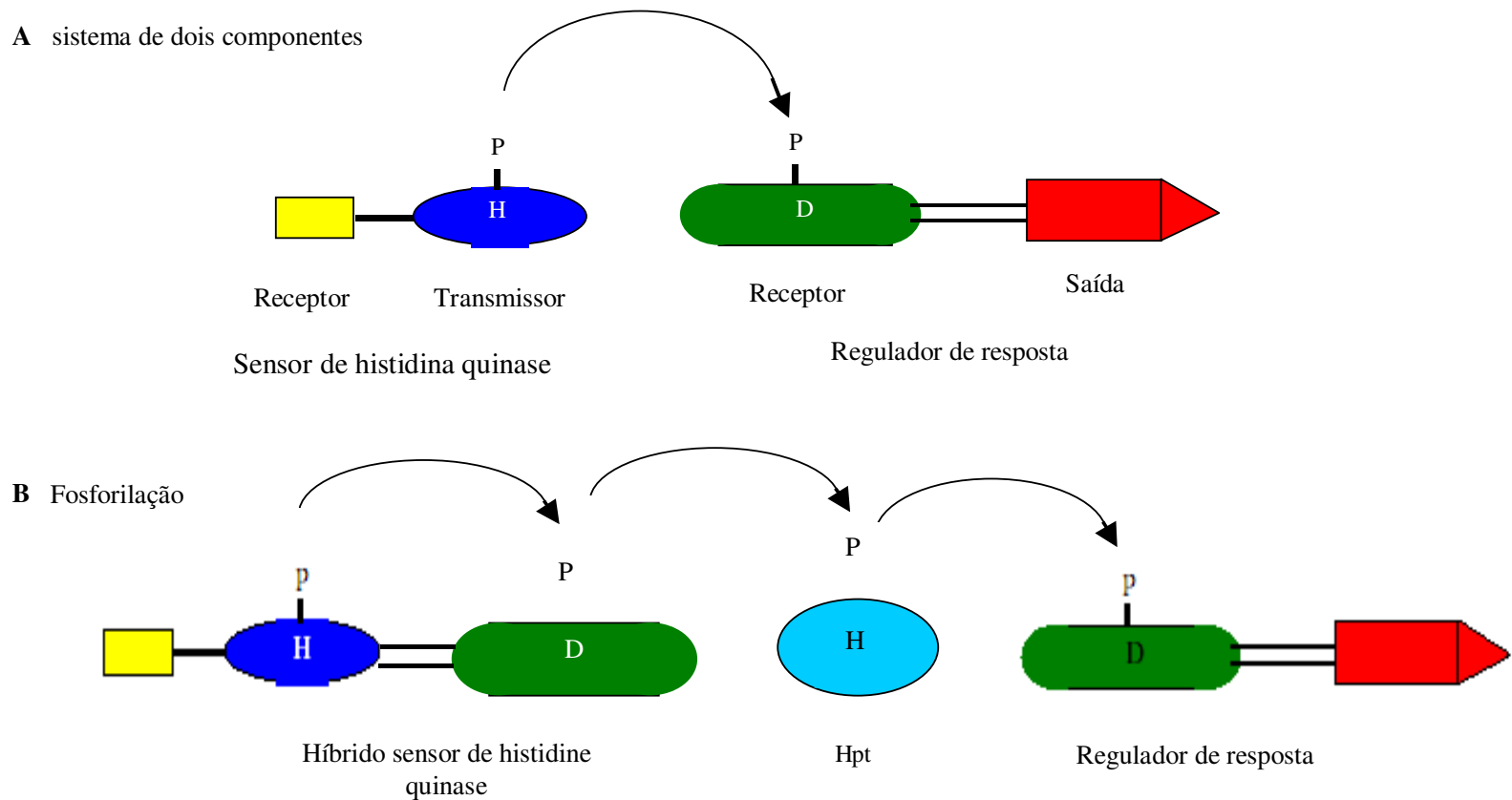
Nos últimos 25 anos o efeito das auxinas no alongamento celular foi determinado pela teoria do crescimento ácido. De acordo com esta teoria, as auxinas acidificam os espaços livres na parede celular, possivelmente pela ativação de bombas de prótons nas membranas. O aumento da concentração de prótons provoca um aumento na plasticidade da parede celular e causa um rápido aumento na taxa de alongamento dos tecidos (LIBBENGA & MENNES, 1995).

De maneira geral, a ação das auxinas consiste na ligação da molécula com um receptor (proteína específica) formando um complexo hormônio-receptor. Em seguida, este complexo libera um mensageiro secundário que migra até o núcleo e provoca a expressão gênica. A formação de mRNA a partir do DNA induz a síntese de enzimas que quebram as ligações polissacarídicas da parede celular (TAIZ & ZEIGER, 1998).

Já em relação as citocininas, até poucos anos atrás, era a classe dos hormônios vegetais menos compreendidos em relação a biossíntese, metabolismo, percepção e transdução. No entanto, os avanços da biologia molecular, possibilitaram o progresso muito rápido na identificação de moléculas na compressão da biossíntese, metabolismo, receptores de moléculas com ação hormonal (MOK & MOK, 2001).

O modo de ação das citocininas no desenvolvimento vegetal envolve rotas de transdução de sinais que geram respostas específicas. Atualmente, acredita-se que a ação das citocininas envolve o chamado sistema de dois componentes, descrito

anteriormente em bactérias. Fica evidente que as citocininas são percebidas por proteínas histidina quinase e transferidas para um sistema de sinalização de dois componentes (FIGURA 4).



**Figura 4.** Modelo de dois sistemas de sinalização de citocinina em *Arabidopsis*, conforme HUTCHISON & KIEBER (2002); TAIZ & ZEIGER (2004). (Hpt- Histidina de transferência de Fósforo; H - Histidina; D - Aspartato; P - Fósforo)

A: Sistema simples de dois componentes com um sensor de Histidina quinase, onde o sinal é percebido, o qual controla a atividade do domínio da Histidina quinase, e, quando ativado, auto-fosforila um resíduo conservado de Histidina. O fosfato é transferido para o resíduo Aspartato no receptor de um regulador de resposta. A fosforilação do Aspartato regula a atividade da saída do regulador de resposta, e em muitos casos, é um fator de transcrição.

B: Sistema de sinalização de dois componentes com revezamento de Fósforo, uma posição extra de transferência de Fósforo é mediada por uma Hpt.

## 2.7 Nutrição de Plantas *in vitro*

Atualmente a maioria dos trabalhos com propagação de plantas *in vitro* referem-se aos balanços de fitorreguladores mais eficientes para induzir a proliferação de brotos e a diferenciação de raízes. No entanto, para o sucesso da propagação *in vitro*, além do balanço entre fitorreguladores, torna-se necessário definir a composição mineral e orgânica do meio de cultura para cada fase do processo e para cada genótipo em estudo, uma vez que as exigências por tais fatores podem variar entre os diversos materiais genéticos utilizados.

Para o crescimento e diferenciação as células requerem vários elementos, sejam orgânicos ou minerais. Estes requerimentos demonstram facilmente em culturas de células, tecidos ou órgãos *in vitro*, uma vez que a disponibilidade destes elementos depende do fornecimento no meio de cultura. Os elementos são requeridos em dois níveis, parte classificados como macro outros como microelementos.

Geralmente, as células apresentam potencialidade de sintetizar moléculas orgânicas complexas, como proteínas e hormônios por exemplo, a partir de fontes de nitrogênio e carbono disponíveis no meio de cultura (KRIKORIAN, 1991).

Desde 1940, diversos trabalhos vêm sendo realizados em relação ao requerimento de nutrientes em plantas cultivadas *in vitro*, sob meios de cultura definidos. Em termos gerais, quando as culturas *in vitro* são mantidas em meios nutritivos contendo uma mistura de sais minerais obtêm-se resultados eficazes para a manutenção do crescimento celular, de tecidos e de órgãos (KRIKORIAN, 1991).

Atualmente, além dos estudos fisiológicos, bioquímicos e anatômicos, a propagação de plantas *in vitro* passou a ser uma ferramenta de grande importância na produção de mudas de diversas espécies para os produtores. Apesar da nutrição mineral e orgânica estar ligada diretamente com o desenvolvimento e crescimento de plântulas *in vitro*, a maioria dos estudos nesta direção tem sido realizada somente em condições de campo ou em casa de vegetação. Sendo assim, poucas informações estão disponíveis na literatura sobre o comportamento nutricional de plantas cultivadas *in vitro* (DINIZ, 1999). Neste contexto, são necessárias pesquisas no sentido de quantificar a utilização dos nutrientes durante o crescimento e multiplicação de plantas *in vitro*, de forma que a quantidade fornecida ao meio não seja um fator limitante ao seu desenvolvimento.

Apesar de se encontrar diversas formulações de meios nutritivos na literatura para cultura de células, tecidos e órgãos *in vitro*, para diversas espécies, o meio definido por MURASHIGE & SKOOG (1962), meio MS, geralmente é o mais utilizado, podendo alterar as concentrações dos sais deste meio. Basicamente a composição do meio consiste em macro e microelementos essenciais às plantas, vitaminas, substâncias reguladoras do crescimento e carboidratos como fonte de carbono, além de outras substâncias aditivas (ROUT et al. 2000).

As dificuldades de aprimorar o meio de cultura para cada espécie e para cada fase do processo da cultura *in vitro*, devido às interações entre os diferentes componentes do meio, assim como a interação destes com os fatores relacionados ao explante, ocasionou o fracasso do emprego da cultura de tecidos para algumas espécies, não apresentando resultados satisfatórios e as vezes, podendo, desestimular parte de produtores.

NAS & READ (2004) relatam que a composição química do meio de cultura tem um papel importante no sucesso da propagação de plantas *in vitro*. Quando a composição

do meio de cultura não está adequada, podem ocorrer desordens fisiológicas ou, até, a morte do tecido vegetal.

A concentração dos sais do meio MS influenciou na proliferação de brotos, assim como no desenvolvimento vegetativo, em explantes de samambaias *in vitro* (PASQUAL et al. 1994). Para a multiplicação de gérbera *in vitro*, BARBOSA et al. (1993 b) observaram que o maior número de brotos para a cv Appelbloesem ocorreu no meio contendo 50 % dos sais do meio MS, abaixo desta concentração o número de brotos reduziu drasticamente.

A proposta desta dissertação foi otimizar protocolos para a implantação, multiplicação e enraizamento de culturas de gérberas *in vitro*, além de avaliar o comportamento das mudas produzidas *in vitro* durante o processo de aclimatização.

Desta forma, foram realizados experimentos para a implantação de culturas *in vitro* a partir de inflorescências em diferentes estádios de desenvolvimento, para ajustar o balanço entre auxina e citocinina mais eficiente na indução à proliferação de brotos e a diferenciação de raízes, comparar o efeito da concentração dos sais do meio MS durante a fase de multiplicação e enraizamento de culturas *in vitro*, bem como avaliar o comportamento de três variedades durante a aclimatação.

Diante disso, o presente trabalho propõe ajustar protocolos mais eficientes para a propagação massal de variedades de *Gerbera jamesonii*.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

Nos experimentos realizados, utilizou-se as variedades Cappucino, Mirage, Ornela, Phanter e Tili de *Gerbera jamesonii*. A escolha das variedades foi baseada nas exigências do mercado de gérbera no Estado do Rio de Janeiro, sendo possível, desta forma, ajustar protocolos para a propagação massal de variedades desta espécie com alto potencial para a comercialização no Estado.

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais (LCTV) e na casa de vegetação do Setor de Horticultura, ambos do Departamento de Fitotecnia do Instituto de Agronomia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

As análises estatísticas dos dados foram realizadas utilizando os programas SAEG 5.0 e SISVAR 4.3 e os gráficos foram preparados utilizando o Excel.



### 3.1 Implantação de culturas *in vitro* a partir de inflorescências

Nesta fase, foram realizados vários ensaios para a implantação *in vitro*, tanto a partir de inflorescência quanto a partir de ápices caulinares, de várias variedades de gérbera durante o período de março de 2003 à outubro de 2004.

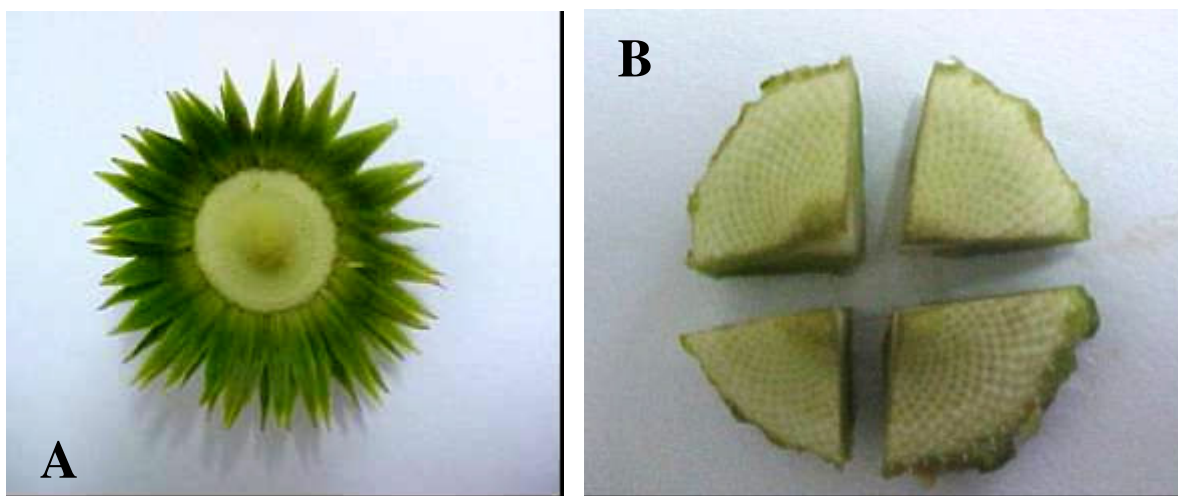
Nos primeiros ensaios, utilizando as variedades Ornela, Tilli, Vitória e Phanter, houve perdas das culturas principalmente devido às contaminações e problemas de oxidação. Diante disso, estes ensaios foram direcionados a ajustar a metodologia de desinfestação de explantes de *Gerbera jamesonii*, caracterizados como ensaios preliminares e não sendo apresentados nesta dissertação. Os melhores resultados obtidos foram utilizados para a implantação do experimento utilizando a variedade Phanter.

Os explantes utilizados para a implantação de culturas *in vitro* foram preparados a partir de inflorescências de plantas matrizes, variedade Phanter, em plena produção, cultivadas em local protegido com cobertura de polietileno com 100 µm de espessura, no Sítio Luz do Céu, Município de Nova Friburgo, RJ.

Neste trabalho utilizou-se inflorescências, uma vez que estas apresentaram resultados bastante promissores nos ensaios preliminares para a implantação da cultura *in vitro*.

Os capítulos eram coletados no período da tarde, e no dia seguinte, já no LCTV, submetidos a desinfestação e inoculados em tubos de ensaio com 25 x 150 mm contendo 10 mL de meio de cultura e de acordo com os tratamentos propostos.

As pétalas dos capítulos eram retiradas (FIGURA 5) e em seguida os capítulos lavados em água corrente durante 10 minutos, posteriormente, lavados com escova dental e detergente em água corrente e mantidos durante 50 minutos em solução de ácido cítrico (200 mg L<sup>-1</sup>).



**Figura 5.** Etapas da preparação de explantes de inflorescências de gérbera, variedade Phanter. A - Capitulum após a retirada das pétalas; B - Explantes preparados a partir de inflorescências abertas, divididas em quatro partes e prontos para serem inoculados *in vitro*.

Durante a desinfestação, os explantes foram mantidos durante 20 minutos em solução com o antibiótico cefalexina ( $200 \text{ mg L}^{-1}$ ), e na capela de fluxo laminar, foram mantidos durante um minuto em solução alcoólica (70%), 20 minutos em solução de NaOCl (2,0%), posteriormente enxaguados três vezes em água destilada esterilizada e mantidos em placa de petri contendo uma lamina de água até o momento da inoculação em tubos de ensaio. Antes da inoculação, os explantes permaneceram sob papel toalha esterilizado para retirar o excesso de água.

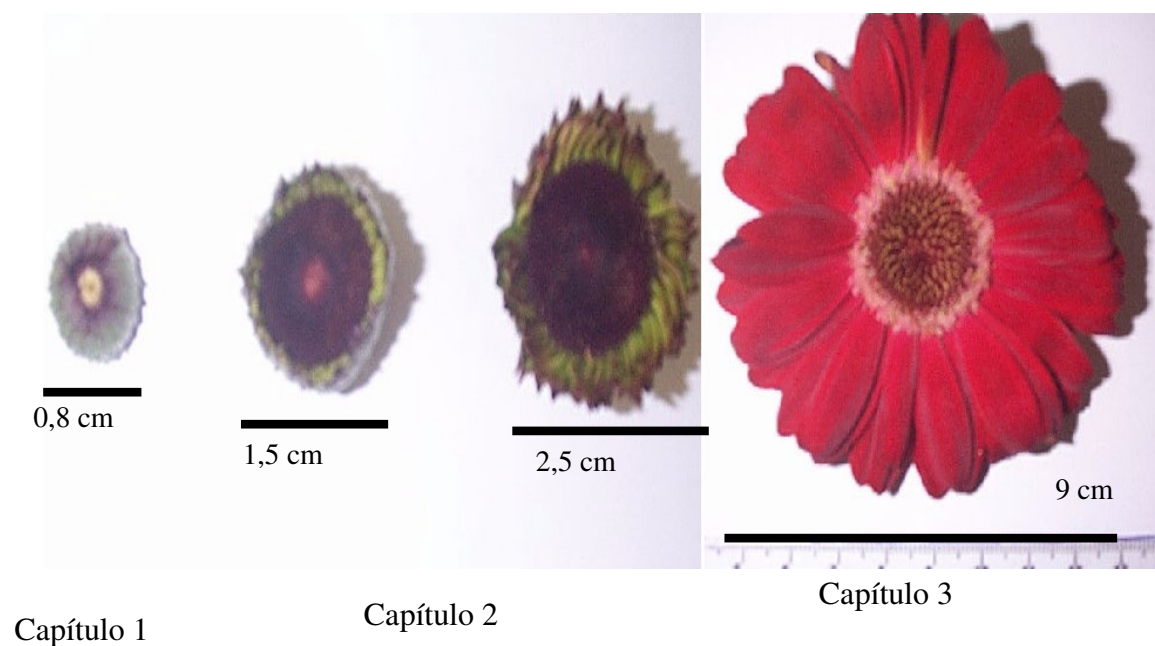
O experimento foi implantado no delineamento de blocos ao acaso, do tipo fatorial  $3 \times 3$ , sendo três níveis de BAP (10,0 15,0 e  $20,0 \text{ mg.L}^{-1}$ ) e três estádios de desenvolvimento das inflorescências, com três repetições e 15 explantes por unidade experimental, sendo inoculados individualmente em tubos de ensaio.

Os estádios de desenvolvimento das inflorescências foram classificados em três categorias (FIGURA 6), sendo:

Capítulo 1: capítulos jovens (com até 1,0 cm de diâmetro);

Capítulo 2: capítulos médios (entre 1,5 - 2,5 cm de diâmetro) e

Capítulo 3: inflorescências completamente abertas.



**Figura 6.** Classificação dos explantes quanto ao estágio de desenvolvimento das inflorescências.

O meio de cultura utilizado continha a metade da concentração dos sais do meio MS, vitaminas (2 mg.L<sup>-1</sup> de glicina; 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de ácido nicotínico; 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de piridoxina e 0,1 mg.L<sup>-1</sup> de tiamina), 100 mg.L<sup>-1</sup> de Inositol, 10 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, na consistência semi-sólida com 7 g.L<sup>-1</sup> de agar, pH ajustado a 5,7 antes do processo de autoclavagem e suplementado com 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de AIB e os níveis de BAP propostos.

Os explantes do tipo dois e três foram divididos em quatro partes (FIGURA 5 B) antes de serem inoculados *in vitro*, enquanto os do tipo um foram inoculados inteiros.

Após a inoculação dos explantes, os tubos de ensaio foram vedados com filme de polietileno, transferidos à sala de crescimento com temperatura de 25±3 °C e mantidos até o final da condução do experimento na ausência de luz.

Seis semanas após da implantação do experimento, avaliou-se a regeneração, perdas por contaminação e oxidação dos explantes. Os dados foram submetidos a ANOVA (5% de probabilidade de erro) e em caso de diferenças significativas, as médias foram comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade de erro.

As culturas que regeneraram foram transferidas para outro meio de cultura, não sendo possível implantar um experimento devido a quantidade de material, e avaliado a proliferação de brotos.

### 3.2 Efeitos de diferentes balanços entre auxina e citocinina no desenvolvimento de brotos de gérbera variedade Ornela *in vitro*.

Utilizou-se plântulas da variedade Ornela implantadas *in vitro*, enraizadas, com altura em torno de 3,5 cm, e repicadas por duas vezes seguidas, com intervalo de 30 dias cada, para meio de cultura MS sem substâncias reguladoras de crescimento, afim de uniformizar as plântulas e eliminar resíduos de fitoreguladores utilizados nas fases anteriores.

Foram implantados dois experimentos, ambos no delineamento experimental de blocos ao acaso, no esquema fatorial 5 x 3, sendo cinco níveis de citocinina (0; 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 mg.L<sup>-1</sup> de BAP ou kinetina) e três níveis de auxina (0; 0,05 e 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de AIB), com quatro repetições e um frasco contendo seis explantes por unidade experimental.

O meio de cultura utilizado continha os sais do meio MS, vitaminas (2 mg.L<sup>-1</sup> de glicina; 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de ácido nicotínico; 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de piridoxina e 0,1 mg.L<sup>-1</sup> de tiamina), 100 mg.L<sup>-1</sup> de inositol, 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, suplementado com as diferentes combinações dos níveis de auxina e de citocinina, na consistência semi-sólida com 7 g.L<sup>-1</sup> de ágar, e o pH ajustado a 5,7 antes do processo de autoclavagem.

Para o preparo dos explantes, as folhas mais velhas foram removidas de forma que cada explante ficasse com duas a três folhas. Inoculou-se seis explantes em frascos de vidro, com capacidade de 600 mL, contendo 50 mL de meio de cultura, com as combinações de auxina e citocinina propostas para cada tratamento e posteriormente vedados com filme de polietileno, em seguida os frascos foram transferidos à sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas de luz ao dia com luminosidade em torno de 45  $\mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , e temperatura de 25±3°C, permanecendo até o final do experimento.

Em ensaios realizados anteriormente no LCTV-DFITO-IA-UFRRJ, foi observado que em avaliações com intervalos de até seis semanas após a repicagem, em alguns casos, havia alta variação em relação ao comprimento dos brotos, demonstrando que provavelmente, neste período ainda estava ocorrendo a diferenciação e o desenvolvimento de gemas vegetativas. Neste sentido, decidiu-se avaliar o experimento oito semanas após a implantação.

Desta forma, oito semanas após a implantação do experimento coletou-se dados referente a: taxa de sobrevivência; número de brotos formados por cada explante; comprimento médio dos brotos; % de explantes enraizados; massas fresca e seca da parte aérea produzida. A massa seca foi determinada após a secagem do material em estufa durante 48 horas a 60 °C, em balança analítica digital com três casas decimais.

Os dados foram submetidos a ANOVA (5% de probabilidade) e realizada análise de regressão para mostrar tendência de resposta nos níveis de citocinina estudados.

### 3.3 Otimização da concentração dos sais do meio MS na propagação *in vitro* de gébera, variedade Ornela

Utilizou-se plântulas da variedade Ornela já implantadas *in vitro*, enraizadas, com altura em torno de 3,5 cm, e repicadas por duas vezes seguidas, com intervalo de 30 dias cada, para o meio de cultura MS sem substâncias reguladoras de crescimento, afim de uniformizar as plântulas e eliminar os resíduos dos fitorreguladores utilizados nas fases anteriores.

Implantou-se o experimento no delineamento experimental de blocos ao acaso, com quatro repetições, no esquema fatorial 4 x 2, sendo quatro níveis dos sais recomendado no meio MS (25; 50; 75 e 100%), dois tratamentos de fitorreguladores (0,5 mg.L<sup>-1</sup> de AIB + 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de BAP e 0,5 mg.L<sup>-1</sup> AIB), quatro repetições e um frasco contendo seis explantes por unidade experimental.

Além dos sais do meio MS, acrescentou-se vitaminas (2 mg.L<sup>-1</sup> de glicina; 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de ácido nicotínico; 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de piridoxina e 0,1 mg.L<sup>-1</sup> de tiamina), 100 mg.L<sup>-1</sup> de inositol, 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, 7 g.L<sup>-1</sup> de ágar, e o pH ajustado a 5,7 antes do processo de autoclavagem.

Inoculou-se seis explantes em frascos de vidro, com capacidade de 600 mL, contendo 50 mL de meio de cultura com a concentração dos sais do meio MS e os tratamentos de fitorregulador propostos, em seguida vedados com filme de polietileno e posteriormente transferidos à sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas de luz ao dia a 45 μmol.m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, com temperatura de 25±3°C, permanecendo até o final do experimento.

Oito semanas após a implantação do experimento coletou-se dados referentes à taxa de sobrevivência, ao número de brotos formados por cada explante, a altura média das brotações, a % de explantes enraizados, as massas fresca e seca da parte aérea produzida. A massa seca foi determinada após a secagem do material em estufa durante 48 horas a 60 °C, em balança analítica digital com três casas decimais.

Os dados foram submetidos a ANOVA (5% de probabilidade) e realizada análise de regressão para mostrar as tendências de resposta nas concentrações dos sais do meio MS.

### **3.4 Avaliação da proliferação de brotos e enraizamento em três variedades de gérbera.**

Para a implantação deste experimento foram utilizadas plântulas de três variedades, mantidas em meio de cultura sem a presença de fitorreguladores.

Os balanços utilizados neste experimento foram definidos a partir dos diferentes balanços formados com as duas fontes de citocinina, utilizadas no experimento 3.2 com a variedade Ornela.

O experimento foi implantado no delineamento de blocos ao acaso, com quatro repetições, no esquema fatorial 2 x 3, sendo dois tratamentos com fitorreguladores ( $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$  de BAP +  $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$  de AIB e  $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$  de AIB) e três variedades de gérbera (Cappucino, Mirage e Ornela), com quatro repetições e um frasco contendo seis explantes por unidade experimental.

Inoculou-se seis explantes em cada frasco com capacidade de 600 mL contendo 50 mL de meio, representando cada unidade experimental.

Oito semanas após a implantação do experimento coletou-se dados referentes à taxa de sobrevivência, ao número de brotos formados por cada explante, a altura média das brotações e a percentagem de enraizamento.

Os dados foram submetidos a ANOVA (5% de probabilidade) e para a comparação das médias, utilizou-se o teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro.

### 3.5 Aclimação de três variedades de gérberras

O experimento foi conduzido em casa de vegetação do Setor de Horticultura do Departamento de Fitotecnia do Instituto de Agronomia da UFRRJ, localizado em Seropédica, RJ. A área onde foi realizado o experimento está situada a 22° 45' S de latitude, 43° 41' W de longitude e entre 35-40 m de altitude.

As plântulas utilizadas foram obtidas no Laboratório de Cultura de Tecidos do Departamento de Fitotecnia. Utilizou-se plântulas mantidas em meio MS, enraizadas, altura em torno de 3,5 cm e com 3 - 4 folhas. Foram mantidas em frascos de vidro com capacidade de 250 mL, vedados com filme de PVC transparente. As condições ambientais da sala de crescimento foram: fotoperíodo de 16 horas, temperatura de  $25\pm 3^{\circ}\text{C}$  e luminosidade em torno de  $45 \text{ mmol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ .

Após seis semanas da transferência dos explantes para meio MS sem fitorregulador as plântulas, já enraizadas foram utilizadas para a implantação do experimento.

Para a aclimação, as plântulas foram retiradas dos frascos e, após lavagem das raízes em água corrente para retirar o meio de cultura aderido às mesmas, foram repicadas para bandeja de isopor de 128 células contendo substrato comercial Mecplant® e mantidas em canteiro com nebulização intermitente de um minuto por 30 minutos de intervalo, durante o dia, no interior de uma casa de vegetação.

O experimento foi realizado no período de setembro a outubro de 2004. Neste período a temperatura média ficou entre 20,6 a 23,8, a máxima entre 26,7 a 30,2 e a mínima entre 16,0 e 19,2. A Umidade Relativa variou entre 66 a 69,7%. Os dados de temperatura e umidade foram obtidos da PESAGRO, Estação Experimental de Seropédica - RJ.

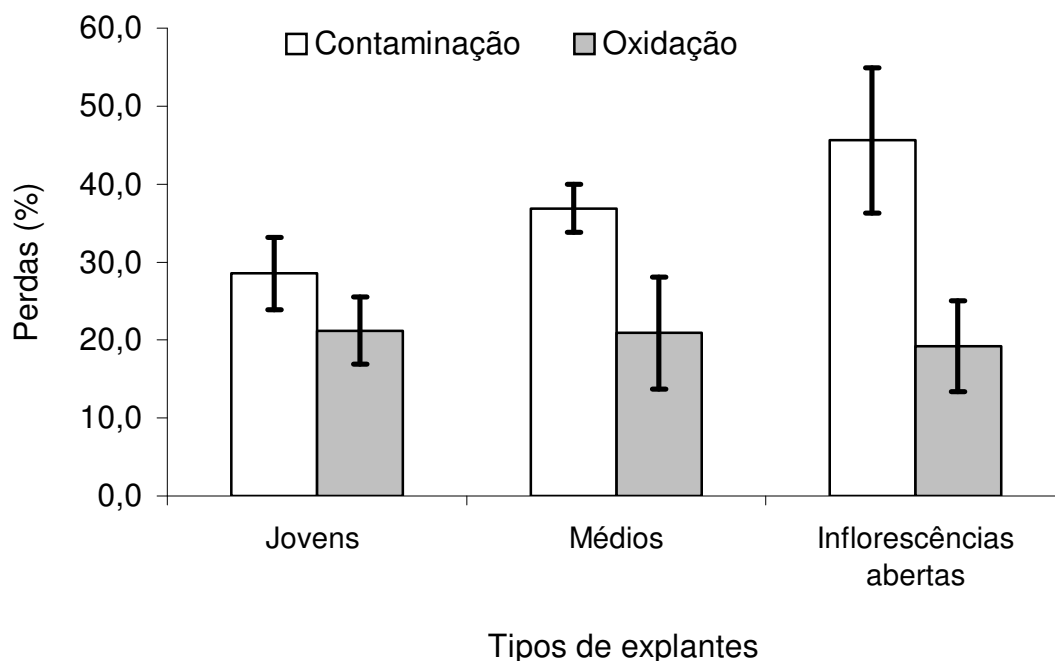
Durante o período de aclimatização, 40 dias, foram realizadas quatro avaliações, com intervalos de 10 dias entre cada, considerando a taxa de sobrevivência, o número de folhas e o comprimento da maior folha.

O delineamento experimental utilizado foi o de bloco inteiramente casualizado, com três tratamentos (as variedades Capuccino Mirage e Ornela), três repetições e 10 plântulas por repetição. Os dados foram submetidos à análise de variância, a significância dos tratamentos foi determinada através do teste F, as médias entre as variedades foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade e realizou-se análise de regressão para mostrar o comportamento de desenvolvimento das plântulas no decorrer do período de avaliação.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

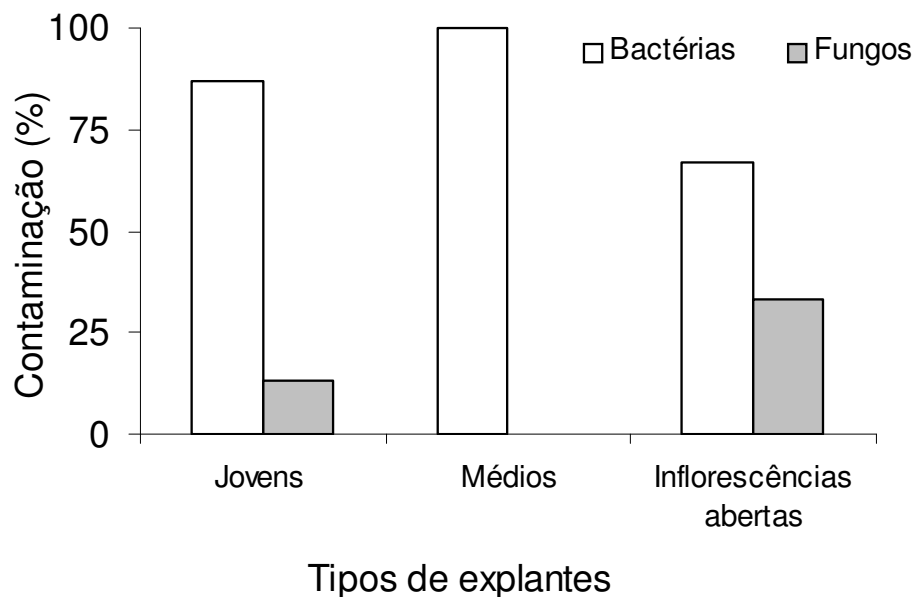
### 4.1 Implantação de culturas *in vitro* a partir de inflorescências.

O processo de desinfestação utilizado não demonstrou ser eficiente na eliminação de microorganismos presentes nos tecidos durante a implantação da cultura *in vitro*, uma vez que se verificou cerca de 40% de contaminação (FIGURA 7). A maioria das contaminações observadas foi por bactérias (FIGURA 8). Mesmo não verificando diferenças significativas na taxa de contaminação entre os tipos de explantes, os preparados a partir de inflorescências abertas apresentaram resultados superiores (45,6%) aos demais tipos de explantes (FIGURA 7). Além da contaminação, cerca de 20% das culturas apresentaram problemas com oxidação (FIGURA 7).



**Figura 7.** Efeito do estágio de desenvolvimento das inflorescências nas perdas (%) por contaminação e oxidação de explantes de gerbera variedade Phanter implantadas *in vitro*. (barra na vertical mostra o desvio padrão).



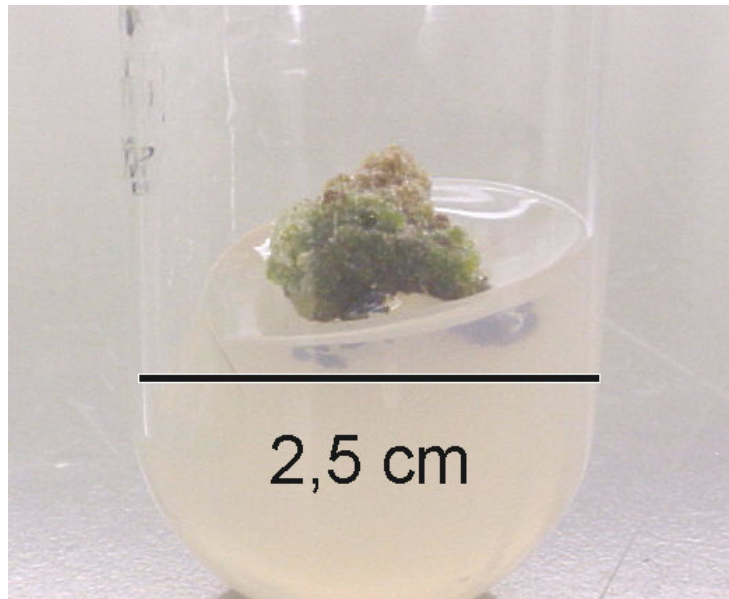


**Figura 8.** Contaminação de explantes de gérbera, variedade Phanter, durante a implantação *in vitro*.

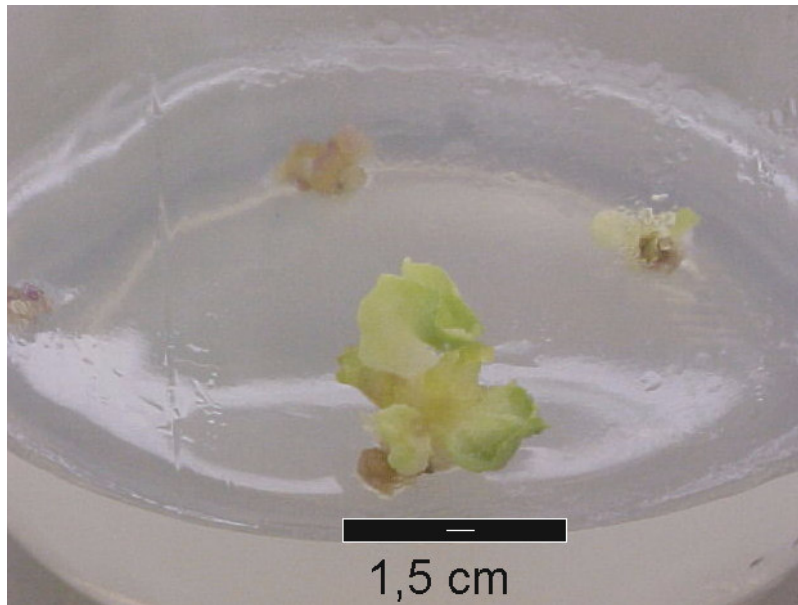
Conforme MONTARROYOS (2000), os procedimentos e métodos adotados de desinfestação de tecidos vegetais como rotina de laboratório nem sempre consegue eliminar os microorganismos presentes nos tecidos, uma vez que parte destes podem encontrar-se latentes no interior dos tecidos, espaços intracelulares ou ainda nos vasos condutores e, desta forma, estarem protegidos dos produtos químicos utilizados na desinfestação. Afirma-se ainda que a eficiência do processo varia principalmente em função do tipo de explante utilizado e das condições em que as plantas doadoras de explantes foram mantidas.

No trabalho desenvolvido por ARELLO et al. (1991), com capítulos ainda fechados, houve perda de 40 a 50% dos explantes devido as contaminações, seja por fungo ou bactérias. A alta taxa de contaminação microbiana foi atribuída à proximidade dos capítulos com o solo no momento da coletas dos explantes. Neste trabalho, explantes preparados a partir de inflorescências ainda fechadas apresentaram menor taxa de contaminação, o que pode ser atribuído ao fato de que tecidos de órgãos recém formados ficam menos tempo expostos aos microorganismos, podendo apresentar maior facilidade na desinfestação.

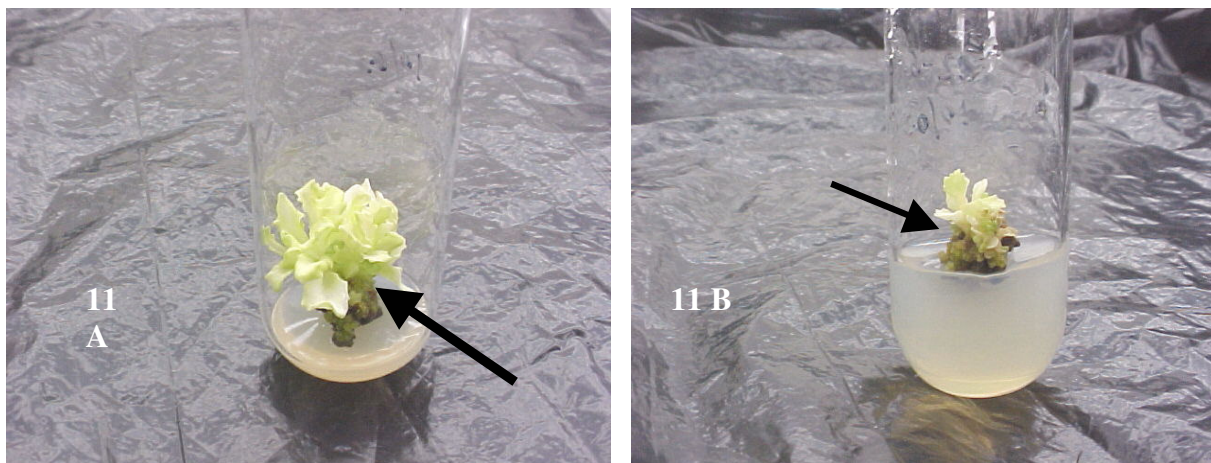
A regeneração obtida foi de forma indireta (FIGURA 9), sendo necessário, portanto, a transferência das culturas para meio de cultura com citocinina, BAP, para induzir a proliferação de brotos (FIGURA 10). Observou-se que a proliferação de brotos foi predominante em alguns pontos localizados na superfície do corte do capítulo (FIGURA 11).



**Figura 9.** Formação de calo em explante preparado a partir de capítulo médio, variedade Phanter, em meio MS +  $10 \text{ mg.L}^{-1}$  de BAP +  $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$  de AIB, após oito semanas da implantação *in vitro*.

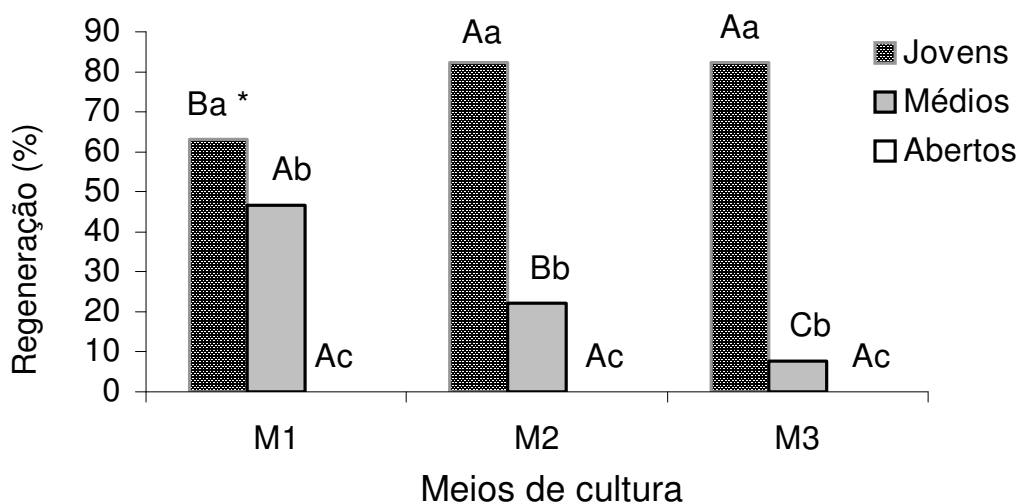


**Figura 10.** Proliferação de brotos em explantes de gérbera variedade Phanter, preparados a partir de capítulos médios, 30 dias após o segundo subcultivo.



**Figura 11.** Proliferação de brotos em explantes de gérbera variedade Phanter preparados a partir de inflorescências, 30 dias após a inoculação. 11 A - capítulos jovens; 11 B - capítulos médios.

Explantos preparados a partir de capítulos jovens apresentaram as melhores taxas de regeneração, sendo que os maiores níveis de BAP proporcionaram resultados superiores ao nível mais baixo. Já para os explantes preparados a partir de capítulos médios, o incremento do nível de BAP resultou em redução na regeneração. Por outro lado, explantes preparados a partir de capítulos abertos não apresentaram regeneração (FIGURA 12). Sendo assim, capítulos jovens apresentaram maior potencial para a implantação de culturas de gérbera, variedade Phanter, *in vitro*.



**Figura 12.** Regeneração de explantes preparados a partir de inflorescências de gérbera, variedade Phanter, em três estádios de desenvolvimento e em três meios de cultura (M1: 10 mg.L<sup>-1</sup> de BAP; M2: 15 mg.L<sup>-1</sup> de BAP e M3: 20 mg.L<sup>-1</sup> de BAP).

\*Médias seguidas de mesma letra maiúscula, entre meios de cultura em cada tipo de explante, e de mesma letra minúscula, entre tipos de explantes em cada meio de cultura, não diferenciam entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade de erro.

As diferenças observadas na regeneração de explantes preparados a partir de inflorescências, demonstram que provavelmente, em cada estágio de desenvolvimento, os tecidos apresentam um balanço hormonal endógeno específico, diferenças na sensibilidade aos estímulos causados com o uso dos fitorreguladores utilizados, assim como mudanças na competência celular no decorrer do desenvolvimento.

A redução da regeneração dos explantes com o avanço do estágio de desenvolvimento das inflorescências, independente do nível de BAP utilizado, pode estar associado com o grau de determinação celular dos tecidos. Conforme PERES (2002), quanto maior o grau de determinação, compromisso em seguir determinada rota organogênica, menor a capacidade do tecido regenerar outro órgão.

CENTENO et al. (1997), estudando a capacidade de formar embriões a partir de explantes de cotilédones de avelã em diferentes estádios de desenvolvimento, verificaram

correlação inversa entre o potencial embriogênico com o grau de maturidade, isto sendo associado com o tipo e a quantidade de citocinina endógena presente nos tecidos.

A dependência de transferir as culturas para outro meio, indutor à regeneração de brotos, pode estar associada com o modelo proposto por CARY et al. (2001), em que, quando ocorre a formação de calo, os tecidos adquirem competência celular, ocorrendo a proliferação de brotos se forem mantidos em balanços favoráveis à citocinina, ou ocorrendo a diferenciação de raízes, se forem mantidos em balanços favoráveis à auxina.

#### 4.2 Efeitos de diferentes balanços entre auxina e citocinina no desenvolvimento de brotos *in vitro* de gérbera, variedade Ornela.

Todas as combinações entre os níveis de auxina e de citocinina estudadas, resultaram na manutenção das culturas *in vitro* e apresentaram 100% de sobrevivência.

Nos dois tipos de citocinina, BAP ou kinetina, o número de brotos, comprimento dos brotos e percentagem de enraizamento, não apresentou diferenças significativas na interação dos níveis destes com os de auxina (TABELAS 1 e 2). Já em relação as massas fresca e seca da parte aérea a interação de AIB com BAP foi significativa (TABELAS 1 e 2), enquanto utilizou kinetina, esta não foi significativa.

Na presença de kinetina como fonte de citocinina, todas as plântulas enraizaram, não sendo portanto apresentados os dados observados.

**Tabela 1.** Efeito dos níveis de AIB e BAP na significância dos valores do teste F nas variáveis avaliadas em plântulas *in vitro* de gérbera, variedade Ornela, avaliadas após oito semanas da implantação do experimento.

Tratamentos	nº brotos	Altura	Massa fresca	Massa seca	Enraizamento
AIB	ns	ns	ns	ns	ns
BAP	*	*	*	*	*
Interação	ns	ns	*	*	ns
CV (%)	21,04	24,07	34,62	34,61	66,97

\* Valor do F significativo a 5% de probabilidade de erro.

ns Valor do F não significativo a 5% de probabilidade de erro.

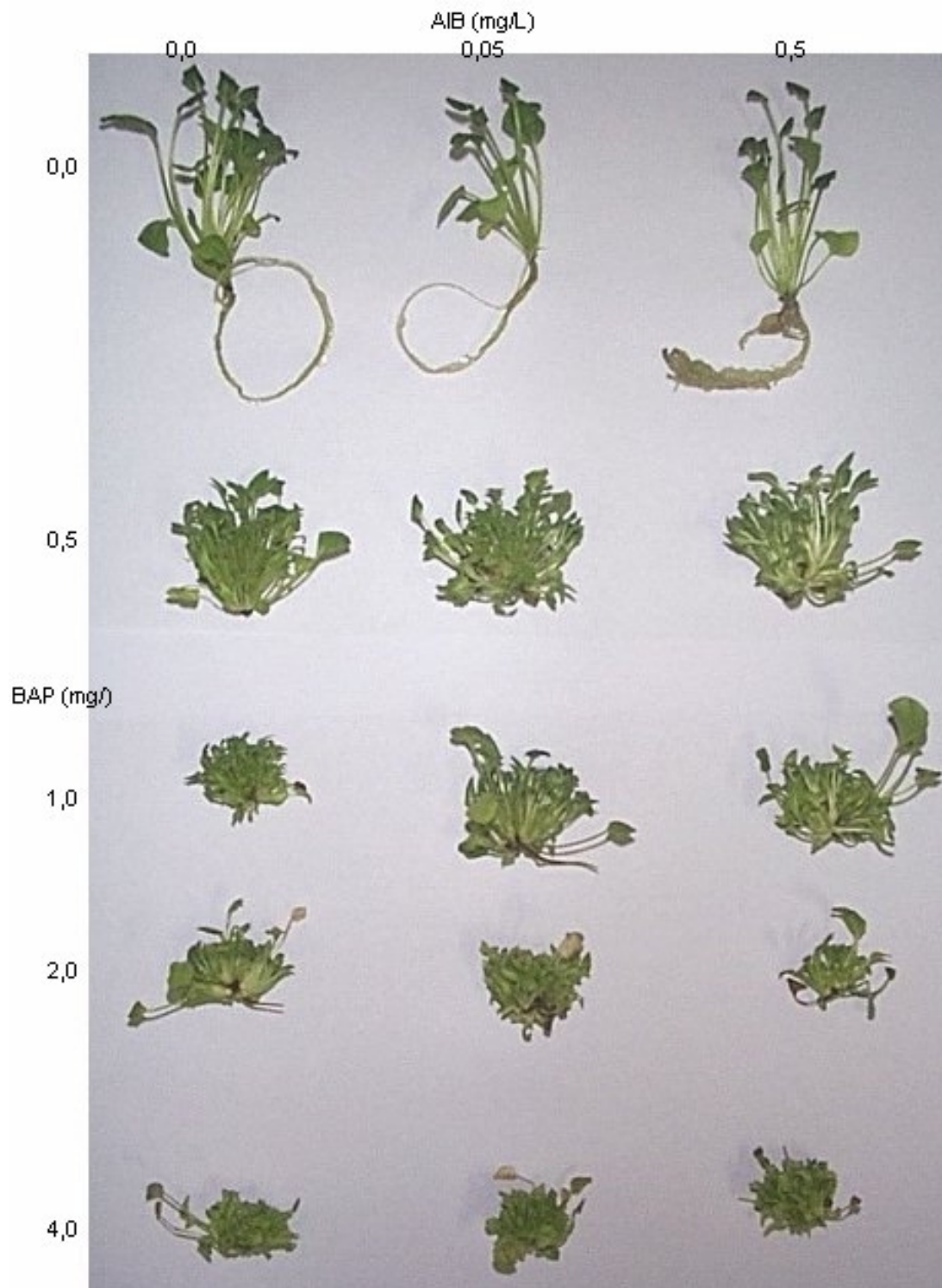
**Tabela 2.** Efeito dos níveis de AIB e kinetina na significância dos valores do teste F nas variáveis avaliadas em plântulas *in vitro* de gérbera, variedade Ornela, avaliadas após oito semanas da implantação do experimento.

Tratamentos	nº brotos	Altura	Massa fresca	Massa seca
AIB	ns	ns	ns	ns
KIN	*	ns	*	*
Interação	ns	ns	ns	ns
CV (%)	16,8	7,38	17,08	17,09

\* Valor do F significativo a 5% de probabilidade de erro.

ns Valores do F não significativo a 5% de probabilidade de erro

A figura 13 representa o desenvolvimento de explantes de gérbera, variedade Ornela, mantidos em diferentes níveis de fitoreguladores, utilizando BAP como fonte de citocinina e AIB como auxina, demonstrando que a ocorrência da proliferação de brotos, formação de raízes ou de ambos os processos regenerativos, depende do balanço entre auxina e citocinina.

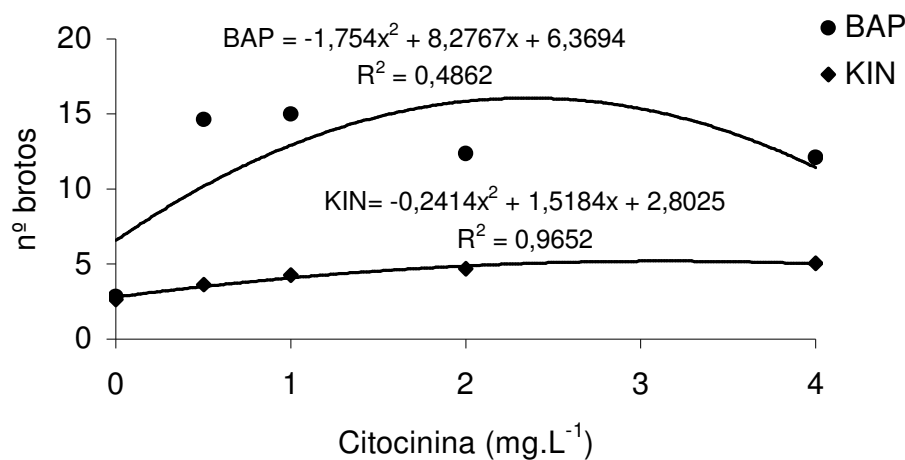


**Figura 13.** Efeitos de diferentes balanços entre AIB e BAP na proliferação, no desenvolvimento de brotos e na diferenciação de raízes em explantes de gérbera variedade Ornella, oito semanas após a implantação do experimento.

Na presença de BAP o número médio de brotos obtidos foi significativamente maior, cerca de cinco vezes mais, que na ausência deste fitorregulador e nos níveis de kinetina estudados (FIGURA 14). O aumento do nível de BAP até 1,0 mg.L<sup>-1</sup> correspondeu ao incremento do número médio de brotos, apresentando tendência de redução na concentração de 2 mg.L<sup>-1</sup>, permanecendo estável até 4 mg.L<sup>-1</sup> (FIGURA 14). Isso mostra que os balanços formados com 0,5 ou 1,0 mg.L<sup>-1</sup> de BAP foram suficientes para induzir a diferenciação de gemas vegetativas, acima destes valores há uma ligeira tendência de redução no número de gemas diferenciadas, o que pode ser um efeito inibitório dos dois maiores níveis de BAP estudados.

Os níveis de AIB estudados não influenciaram na proliferação de brotos (TABELA 1). BARBOSA et al. (1993 a), também verificaram que a presença de auxina (AIA) no meio de cultura não influenciou no número total médio de folhas novas com comprimento maior que 1,0 cm por explante inicial.

No experimento com kinetina como fonte de citocinina, o número médio de brotos obtidos em cada explante foi inferior aos números obtidos na presença de BAP. Com o incremento da concentração de kinetina também houve um ligeiro aumento no número de brotos, apesar de todos serem inferiores aos obtidos com BAP como fonte de citocinina (FIGURA 14).



**Figura 14.** Efeito do nível e do tipo de citocinina na proliferação de brotos em explante de gérbera, variedade Ornela, independente do nível de AIB, oito semanas após a implantação do experimento.

O uso de auxina durante a fase de multiplicação de gérbera *in vitro* nem sempre é necessário, entretanto, o uso de AIA na concentração de 0,5 mg.L<sup>-1</sup> tem sido adotado, uma vez que parece aumentar o vigor das plântulas (MURASHIGE et al. 1974).

PIERIK et al. (1982) e BARBOSA et al. (1993 a) citam que é fundamental o uso de citocinina no meio de cultura para obter ótimas taxas de multiplicação. No entanto,



TOPOONYANONT et al. (1999) citam que apesar da adição de citocinina ao meio de cultura ser utilizado para aumentar a proliferação de brotos em culturas de gérbera *in vitro*, em excesso pode induzir a formação de tufos, plântulas anormais e com baixo potencial para serem aclimatadas. No presente trabalho características semelhantes a estas foram observadas nos maiores níveis de BAP (2,0 e 4,0 mg.L<sup>-1</sup>), demonstrando que estes níveis estão acima do nível ótimo para produzir plântulas com alto potencial para ser aclimatadas. O menor nível de BAP estudado (0,5 mg.L<sup>-1</sup>) foi suficiente para induzir os melhores resultados quanto a proliferação de brotos (FIGURA 14).

Para a multiplicação de banana *in vitro* utilizando diversas fontes de citocinina, ARINAITWE et al. (2000) verificaram que, apesar do número de brotos ser diferente, as concentrações de BAP e KIN para obter maior número de brotos foram equivalentes (20,9 µM). No entanto, quando consideraram o custo de aquisição do meio de cultura com as diferentes citocininas para produzir um broto, mostraram que o BAP foi mais econômico (US\$ 0.79 centavos) que KIN (US\$ 1.12 centavos). Desta forma, os resultados apresentados neste trabalho confirmam que o uso de BAP torna-se o tratamento mais eficiente e econômico para a obtenção dos melhores resultados na multiplicação de gérbera *in vitro*.

Comparando-se o número de brotos por explante obtidos no experimento utilizando BAP como fonte de citocinina, com resultados encontrados na literatura, verifica-se que o rendimento, através da taxa de multiplicação obtida, foi superior aos valores apresentados nos trabalhos de MURASHIGE et al. (1974), PIERIK et al. (1975), PIERIK et al. (1982), LALIBERTÉ et al. (1985), BARBOSA et al. (1993 a) utilizando outras variedades. Deve-se ressaltar, ainda, que os níveis de citocinina, na maioria das vezes kinetina, utilizados na literatura é superior a 0,5 mg L<sup>-1</sup>, concentração que apresentou os melhores resultados, no presente estudo.

De acordo com a espécie, estágio de desenvolvimento da cultura e condições ambientais, dentre outros fatores, cada fitorregulador apresenta uma concentração ótima para induzir determinada resposta fisiológica. SOUZA (2003) verificou que o incremento da concentração de BAP até uma concentração ótima, incrementou também o número de brotos obtidos em explantes de arnica (*Lychnophora pinaster*), acima desta concentração, houve ligeira tendência de redução no número de brotos. No trabalho de REIS (2001) com *Catharanthus roseus*, também foi relatado que o incremento de fitorreguladores até uma determinada concentração, favoreceu determinadas respostas, acima destas, ocorreram efeitos inibitórios.

A diferenciação de raízes foi predominante na ausência de citocinina, ocorrendo acima de 90% de enraizamento das brotações. Já na presença de BAP, o menor nível (0,5 mg L<sup>-1</sup>) reduziu para abaixo de 10% e o maior nível (4,0 mg L<sup>-1</sup>) inibiu completamente a diferenciação de raízes, o que resultou em diferenças significativas em relação ao controle (Tabela 1) . Não foi encontrado modelos de regressão significativos para mostrar as tendências de respostas do percentual de enraizamento. Na presença de kinetina não verificou-se diferenças significativas entre os diferentes níveis, ocorrendo enraizamento em todas as plântulas.

No trabalho de BARBOSA et al. (1993 a) com a cv. Appelbloesem, foi observado que na ausência de BAP as culturas apresentaram 100% de enraizamento, nos diferentes níveis de AIA utilizados.

Na presença de BAP o início da diferenciação de raízes somente foi observado, cerca de três semanas após da implantação do experimento, enquanto que na ausência de BAP, bem como nos diferentes níveis de kinetina, logo após a implantação do experimento.

Desta forma, no presente trabalho, a kinetina como fonte de citocinina demonstrou menos eficiência na indução da proliferação de brotos assim como na inibição da diferenciação de raízes em explantes de gérbera, variedade Ornella.

O fato que as culturas mantidas na presença de BAP ter iniciado a diferenciação de raízes algumas semanas após a implantação do experimento pode estar associado com o acúmulo da citocinina inserida no meio de cultura, conforme BLAKESLEY et al. (1991) a maioria ocorre nos primeiros 20 dias, posteriormente ocorre a diferenciação e o desenvolvimento de brotos, os quais passam a ser novos sítios de síntese de auxina (DAVIES, 1995), podendo alterar o balanço hormonal endógeno e em seguida disparar uma série de eventos fisiológicos, incluindo a diferenciação de raízes.

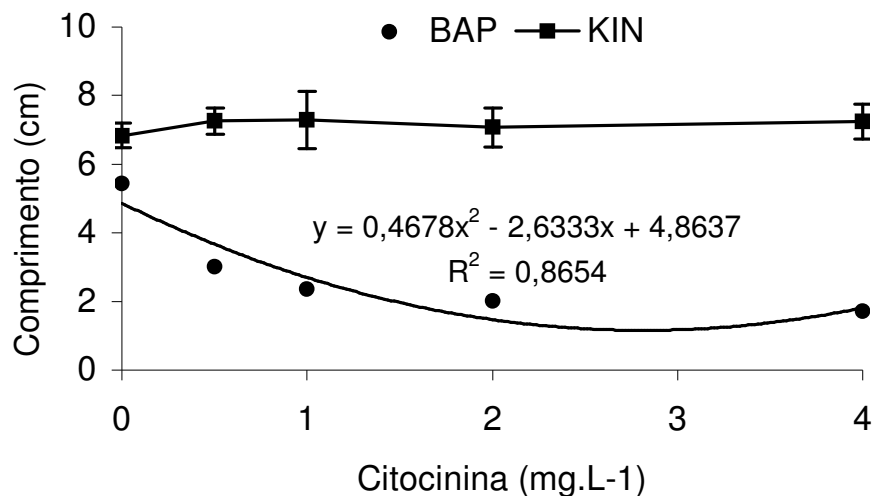
Em relação à diferenciação de raízes, GRATTAPAGLIA & MACHADO (1998) citam que entre as diversas variáveis que interferem no enraizamento, o tipo e a concentração das auxinas são as que, em geral, mais influenciam nesta resposta.

O fato de não verificar diferença significativa para a diferenciação de raízes nos níveis de AIB e na interação destes com os de BAP e kinetina, pode estar relacionado com a hipótese de que esta espécie apresenta elevado nível endógeno de auxina e apresenta facilidade de enraizamento, uma vez que este evento ocorreu mesmo na ausência de auxina exógena. SRISKANDARAJAH et al. (1982), com experimentos *in vitro*, verificaram que gemas de maçã (*Malus pumila*) após várias subculturas em meio suplementado com benziladenina aumentaram a capacidade de enraizamento. Considerando que os explantes utilizados foram repicados várias vezes, na maioria para meio com citocinina, este mesmo evento pode ter ocorrido. Por outro lado, em algumas espécies a formação de raízes ocorre espontaneamente. A ocorrência deste fato, provavelmente deve estar associada com a presença de primórdios radiculares já existentes nos explantes e, quando mantidos em condições favoráveis, somente ocorre o desenvolvimento destes (VAN STADEN & HARTY, 1988)

Em relação ao comprimento médio das brotações, somente no experimento utilizando BAP como fonte de citocinina, foram observadas diferenças significativas entre as concentrações utilizadas. Com o incremento do nível de BAP, também aumentou a tendência de redução na altura das brotações, sendo que os maiores brotos foram observados na ausência de BAP (FIGURA 15). No experimento com kinetina não foram verificadas diferenças significativas no comprimento médio dos brotos (altura das plântulas), apresentando comprimento médio maior que o observado nos níveis de BAP (FIGURA 15).

As citocininas inibem a dominância apical (DAVIES, 1995), reduzindo o comprimento das plântulas. Em trabalhos com cultura de tecidos vegetais, as auxinas, em alguns casos, podem ser utilizadas para estimular o crescimento da parte aérea (EAPEN et al. 1998; SUDHA et al. 1998). No entanto, na presença dos maiores níveis de BAP, os níveis de AIB utilizados não induziram tal característica. Isso possivelmente ocorreu devido aos níveis exógenos de auxina utilizados não terem sido suficientes para alterar os níveis endógenos, ou a presença de BAP inibiu o efeito da auxina. A aplicação de auxina em brotos de noz causou incremento rápido na quantidade de AIA livre e ainda reduziu a atividade da peroxidase, destacando estes eventos de grande importância na indução do enraizamento observado (BISBIS et al. 2003).

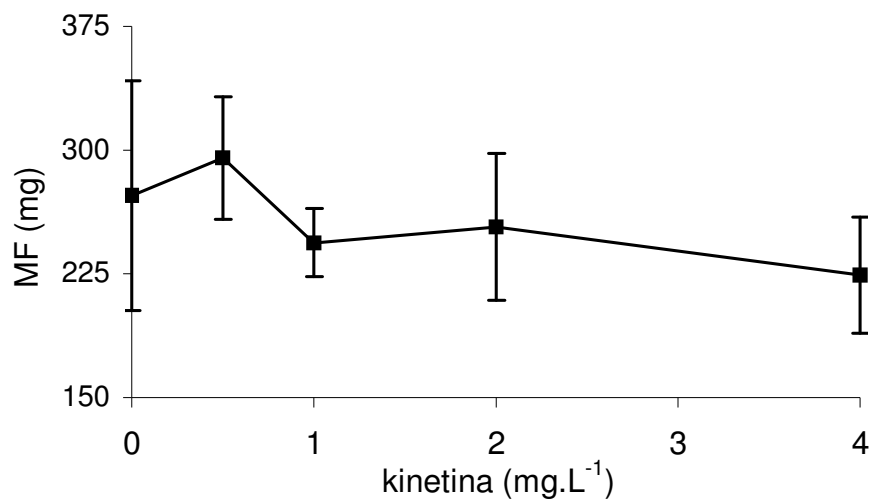
TOPOONYANONT et al. (1999) citam que o alongamento de brotos de gérbera *in vitro* pode ser estimulado ou inibido com o uso de giberelinas, dependendo da forma utilizada.



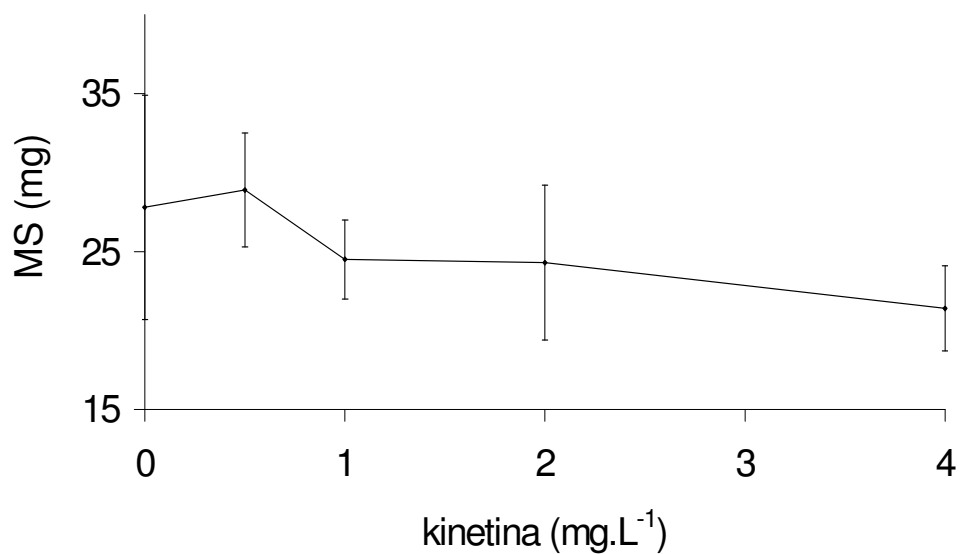
**Figura 15.** Efeito do nível e do tipo de citocinina no comprimento dos brotos de gérbera, variedade Ornela, independente do nível de AIB, oito semanas após a implantação do experimento (barra na vertical das médias com KIN mostra o desvio padrão).

Na maioria dos trabalhos disponíveis na literatura com a propagação *in vitro* de gérbera o acúmulo de massa fresca e seca não é avaliado, uma vez que os objetivos destes trabalhos são de otimizar a taxa de multiplicação e a produção de mudas, uma vez que estas variáveis requerem análises destrutivas, inviabilizando o uso dos materiais em seguida.

Utilizando kinetina como fonte de citocinina somente houve diferença no acúmulo de massas fresca e seca nos brotos entre os níveis de kinetina (FIGURAS 16 e 17). No entanto, não foi encontrado nenhum modelo estatístico de regressão que fosse significativo para mostrar a tendência de resposta, sendo mostrado apenas as médias com o desvio padrão. O acúmulo de massa fresca e seca nos maiores níveis de kinetina foi inferior, tendo sido observado maiores valores no nível de 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de kinetina.



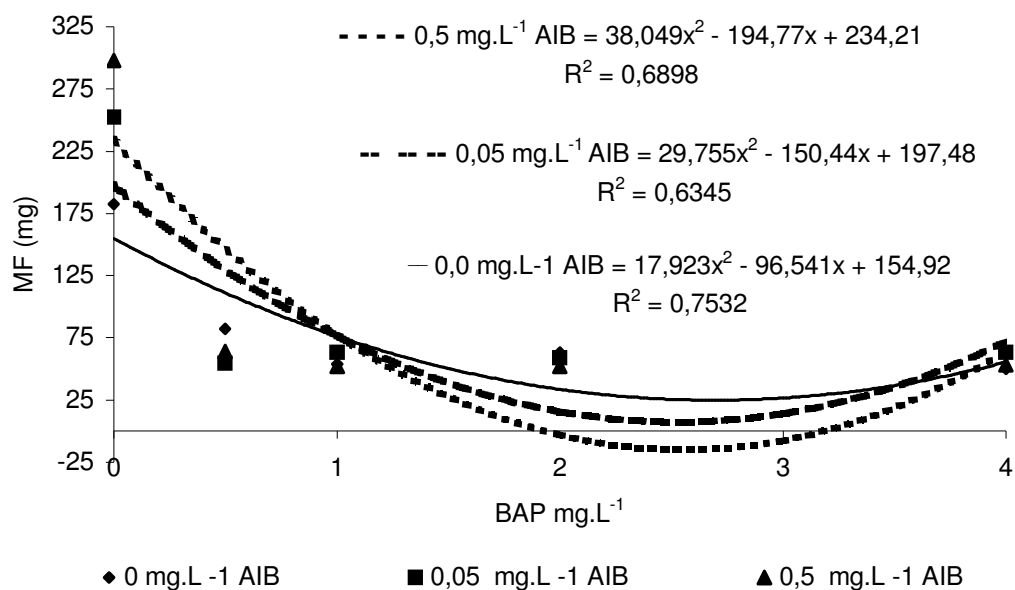
**Figura 16.** Efeito do nível de kinetina no acúmulo de massa fresca (MF) em cada broto de gérbera, variedade Ornela, independente do nível de AIB, oito semanas após a implantação do experimento. (barra na vertical das médias mostra o desvio padrão).



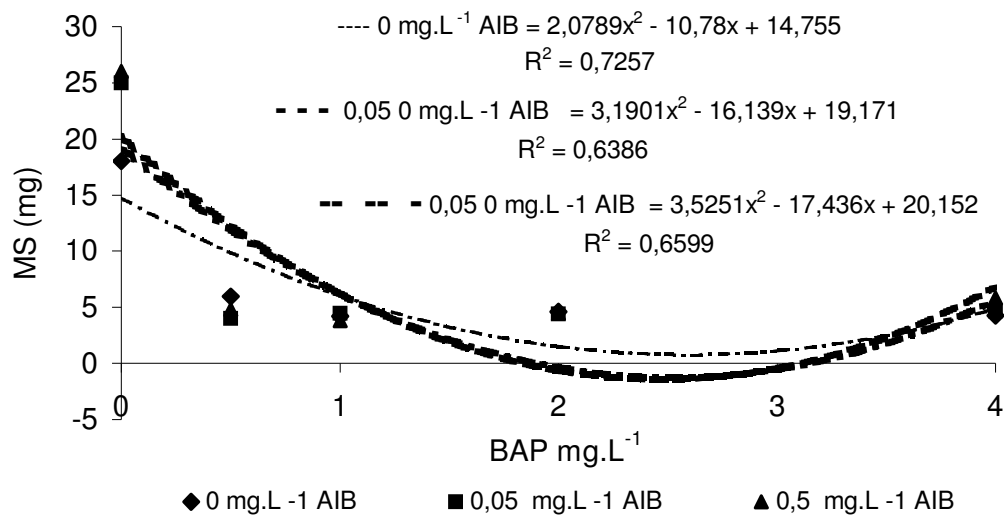
**Figura 17.** Efeito do nível de kinetina no acúmulo de massa seca (MS) em cada broto de gérbera, variedade Ornela, independente do nível de AIB após oito semanas da implantação do experimento. (barra na vertical das médias mostra o desvio padrão).

A interação dos níveis de BAP com os de AIB foi significativa para o acúmulo das massas fresca e seca (TABELA 1). A presença de BAP reduziu drasticamente o acúmulo das massas fresca e seca nos brotos formados (FIGURAS 18 e 19). Esta redução está associada à forma de avaliação, uma vez que se comparou a média da massa de cada broto. No meio com BAP houve maior proliferação de brotos, no entanto, o desenvolvimento destes foi inferior quando comparado com a ausência de BAP. Entretanto, caso fosse comparada a massa da parte aérea total produzida por cada explante inicial, provavelmente teria sido observado o inverso.

Na presença de auxina (0,05 e 0,5 mg.L<sup>-1</sup>) verificou-se resposta semelhante em relação ao acúmulo de massa seca. Na ausência de citocinina, a presença de auxina promoveu maior incremento de massa fresca e seca em cada broto (FIGURAS 18 e 19). Quando a auxina inicia a sua atividade, ocorre uma rápida expansão celular, aumentando a entrada de água para o interior das células assim como de outras moléculas (SANTOS & DOMINGUES, 2002), incrementado desta forma o acúmulo de massa nos tecidos.



**Figura 18.** Efeito da interação de AIB e BAP no acúmulo de massa fresca (MF) em explantes de gérbera, variedade Ornela.



**Figura 19.** Efeito da interação de AIB e BAP no acúmulo de massa seca (MS) em explantes de gérbera, variedade Ornela.

Apesar de não verificar diferença estatística significativa entre os níveis de AIB, e não ter sido realizada nenhuma avaliação em relação a qualidade das plântulas, as combinações de 0,0 e 0,5  $\text{mg.L}^{-1}$  de BAP com 0,5  $\text{mg.L}^{-1}$  de AIB apresentaram melhores características para a multiplicação da variedade Ornela (FIGURA 13).

### 4.3 Otimização da concentração dos sais do meio MS na propagação *in vitro* de gérbera, variedade Ornela

O número médio de brotos formados por explantes variou entre as diversas concentrações dos sais do meio MS e os balanços de fitorreguladores estudados, assim como na interação destes fatores (TABELA 3). Os balanços utilizados foram definidos a partir do segundo experimento, onde se comparou 15 combinações entre AIB e BAP para definir os mais eficientes na indução da proliferação de brotos e diferenciação de raízes. O balanço com 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de AIB e 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de BAP foi o mais eficiente na proliferação de brotos enquanto o meio contendo 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de AIB apresentou as melhores condições para o desenvolvimento de plântulas com maior potencial (FIGURA 21) para serem aclimatadas.

**Tabela 3.** Efeito do balanço de fitorreguladores e da concentração dos sais do meio MS na significância dos valores do teste F nas variáveis avaliadas em plântulas *in vitro* de gérbera, variedade Ornela, avaliadas após oito semanas da implantação do experimento.

Tratamentos	nº brotos	Altura	Massa fresca	Massa seca	enraizamento
Balanço	*	*	*	*	*
MS	*	*	*	*	ns
Interação	*	*	*	*	ns
CV (%)	7,15	7,63	14,63	9,72	17,66

\* Valor do F significativo a 5% de probabilidade de erro.

ns Valores não significativos a 5% de probabilidade de erro.

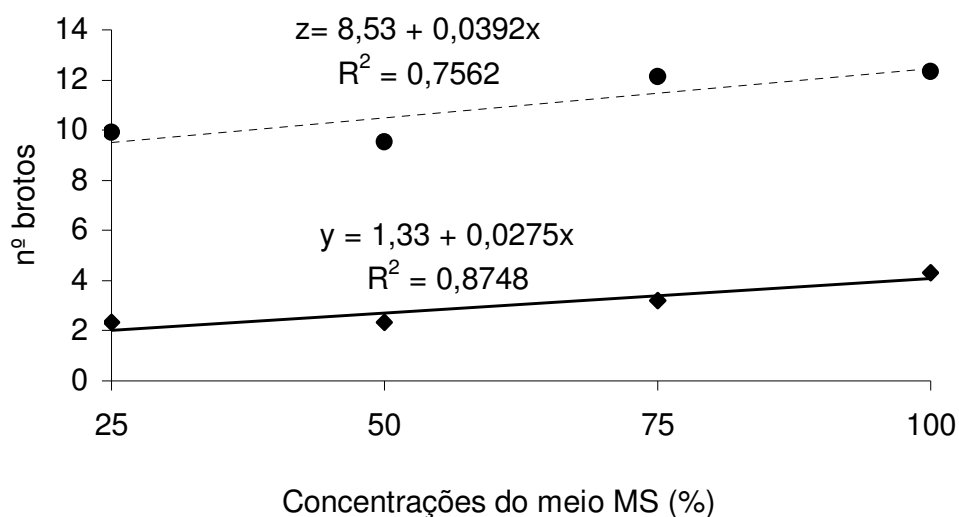
Os explantes mantidos em todos os níveis dos sais do meio MS apresentaram proliferação de brotos. No entanto, o número de brotos formados em cada explante foi limitado pela baixa concentração dos sais do meio MS (FIGURA 20). O vigor das plântulas formadas nas duas concentrações maiores não diferenciou (FIGURA 21). O dobro da concentração de sais minerais do meio MS proporcionou incremento significativo em alguns parâmetros de crescimento (comprimento de brotos, número de raízes, massa fresca e seca) em *Stevia rebaudiana* (estévia) em condições de biorreator (BONDAREV et al. 2003).

Nos meios de cultura contendo citocinina, o número de brotos formados nas duas concentrações menores dos sais do meio MS (25 e 50%) foi inferior às outras duas (75 e 100%). Com o incremento da concentração dos sais aumentou também o número de brotos, o valor máximo sendo atingindo na concentração de 75% e mantido na concentração maior. Já no meio com 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de AIB, houve uma maior tendência de aumento linear do número médio de brotos com o incremento da concentração dos sais do meio MS (FIGURA 20).

Apesar de ser comum o uso da mesma composição do meio de cultura durante todas as fases do processo da propagação *in vitro*, as exigências das culturas por macro e micro nutrientes diferenciam entre cada fase. No meio de cultura com 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de AIB, as plântulas obtidas na concentração de 50% dos sais do meio MS, apresentaram maior potencial para serem aclimatizadas, apesar de que nesta concentração o número de brotos foi inferior às concentrações superiores (FIGURA 21).

A redução das concentrações dos sais do meio MS a 25 e 12,5% ocasionou a formação de mudas de gérbas com qualidade inferiores (menos vigor) quando comparadas aos tratamentos com concentrações de 100 e 50% (BARBOSA et al. 1992). Para a multiplicação de samambaia *in vitro* o incremento da concentração dos sais do meio MS até 25% aumentou em até 2,6 vezes o número de brotos, acima desta concentração houve redução para este parâmetro (PASQUAL et al. 1994).

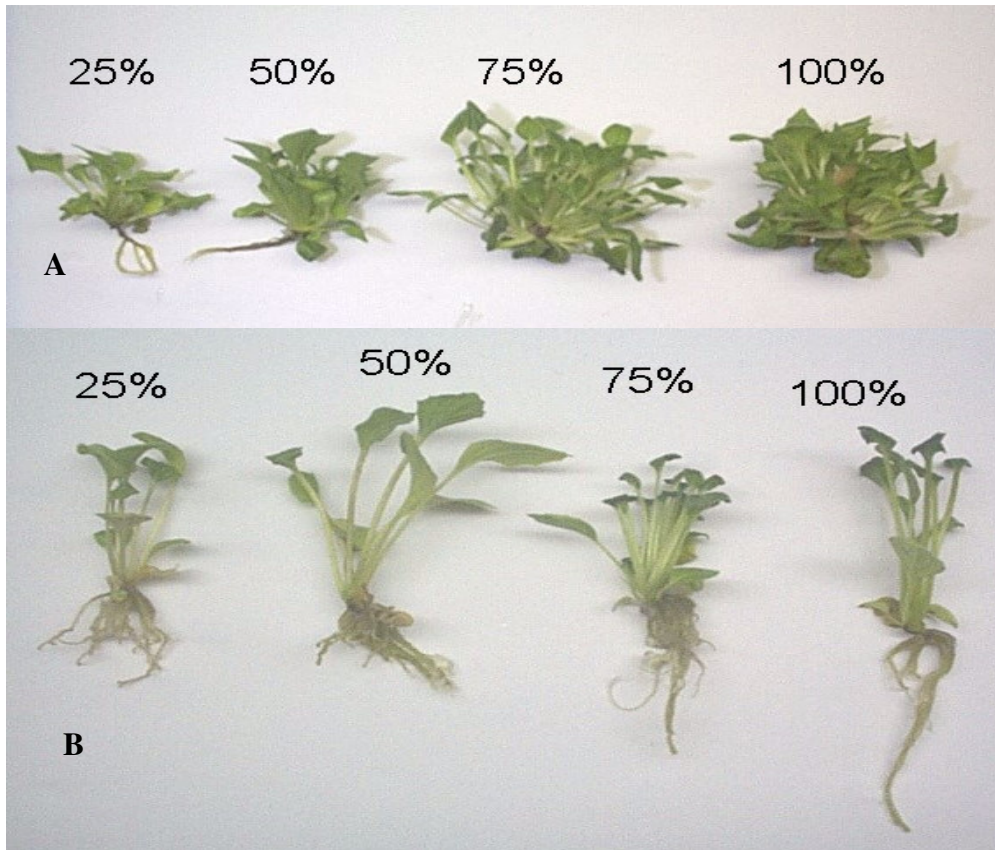
Os modelos de regressão linear e cúbico foram significativos para mostrar a tendência de resposta do número de brotos com o incremento da concentração dos sais do meio MS (TABELA 3), sendo adotado o modelo linear.



**Figura 20.** Efeitos da concentração dos sais do meio MS e dois tratamentos de fitoreguladores na proliferação de brotos na variedade Ornela de gérbas, após oito semanas da implantação do experimento. (z= MS +0,5 mg.L<sup>-1</sup> de AIB + 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de BAP; y= MS +0,5 mg.L<sup>-1</sup> de AIB).

No presente trabalho não se detectou anomalias nas plântulas mantidas nas diferentes concentrações dos sais do meio MS (FIGURA 21). No entanto, as plântulas obtidas no meio contendo 75 e 100% da concentração dos sais do meio MS apresentaram coloração verde mais intensa, independente do balanço de fitoreguladores (FIGURA 21). A redução da concentração dos sais do meio MS ocasionou o surgimento de clorose em plântulas de *Delphinium cardinale* (flor de corte), sendo atribuído à deficiência de ferro e magnésio (OHKI & SAWAKI, 1999).

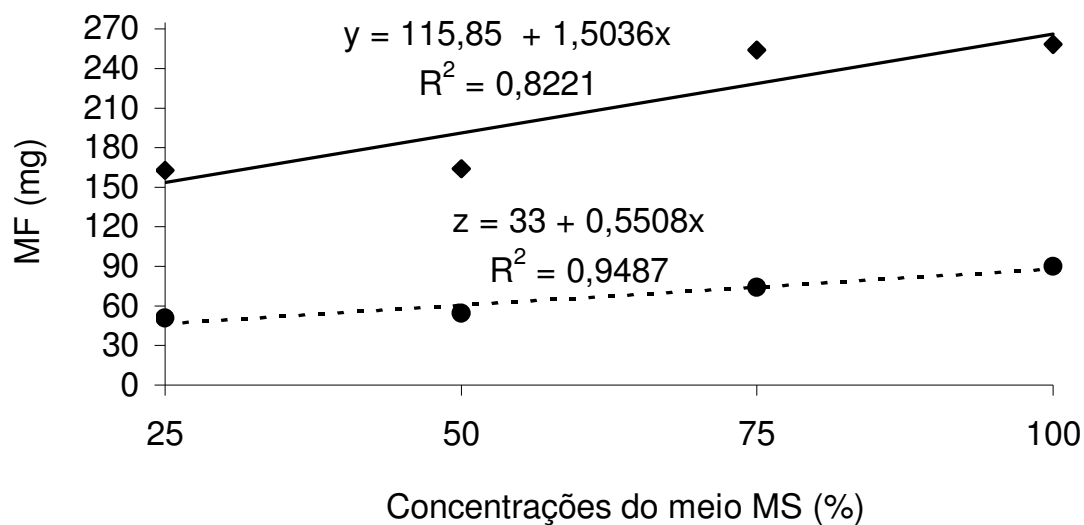




**Figura 21.** Efeito da concentração dos sais do meio MS e dois tratamentos de fitorreguladores no padrão de desenvolvimento de plântulas *in vitro* de gérbera variedade Ornela. A - MS +0,5 mg.L<sup>-1</sup> de AIB + 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de BAP; B- MS +0,5 mg.L<sup>-1</sup> de AIB.

O acúmulo das massas fresca e seca nos brotos depende dos balanços de fitorreguladores e das concentrações dos sais do meio MS (TABELA 3). No balanço para a diferenciação de raízes, apesar de haver menor quantidade de brotos, as plântulas apresentaram maior massa fresca quando comparadas com as mantidas no balanço para a proliferação de brotos (FIGURA 22).

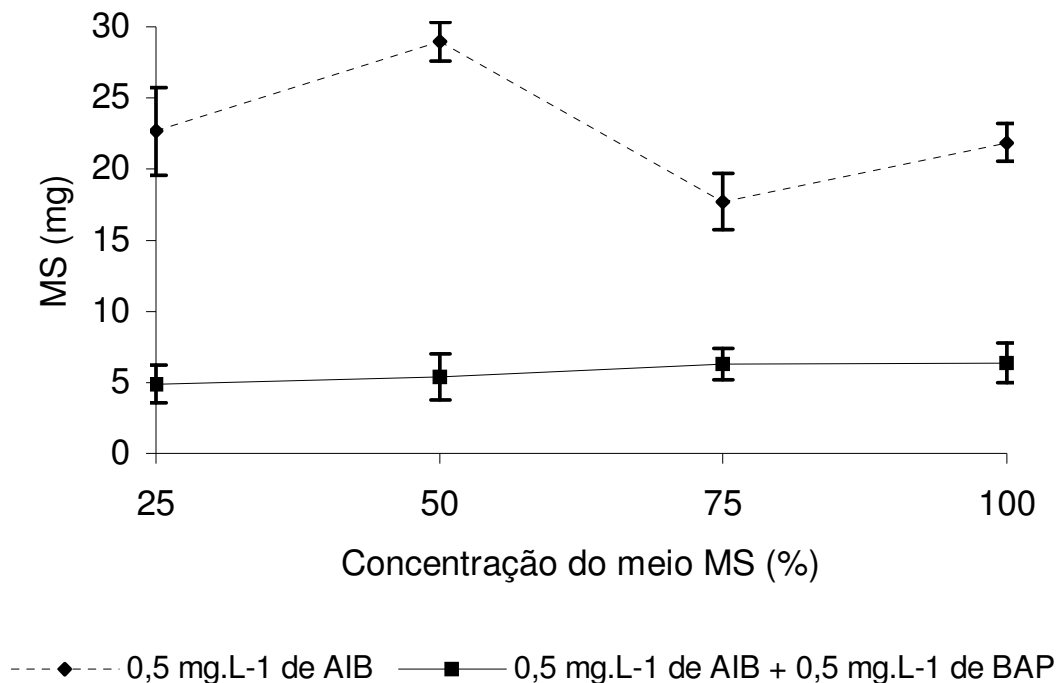
Nos dois balanços utilizados, na menor concentração dos sais do meio MS as plântulas apresentaram massa fresca inferior, havendo tendência de aumento no acúmulo de massa fresca de acordo com o incremento da concentração dos sais no meio (FIGURA 22), mostrando que a redução da concentração dos sais do meio MS limitou o acúmulo de massa fresca em plântulas de gérbera.



**Figura 22.** Efeitos da concentração dos sais do meio MS em duas combinações entre AIB e BAP na massa fresca (MF) dos brotos de gérbera, variedade Ornella, após oito semanas da implantação do experimento. ( $z = MS + 0,5 \text{ mg.L}^{-1}$  de AIB +  $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$  de BAP;  $y = MS + 0,5 \text{ mg.L}^{-1}$  de AIB).

Entre os modelos de regressão pré-definidos pelo programa estatístico SAEG, não houve um modelo significativo para explicar a resposta do acúmulo de massa seca nas diferentes concentrações dos sais do meio MS no balanço favorável à diferenciação de raízes.

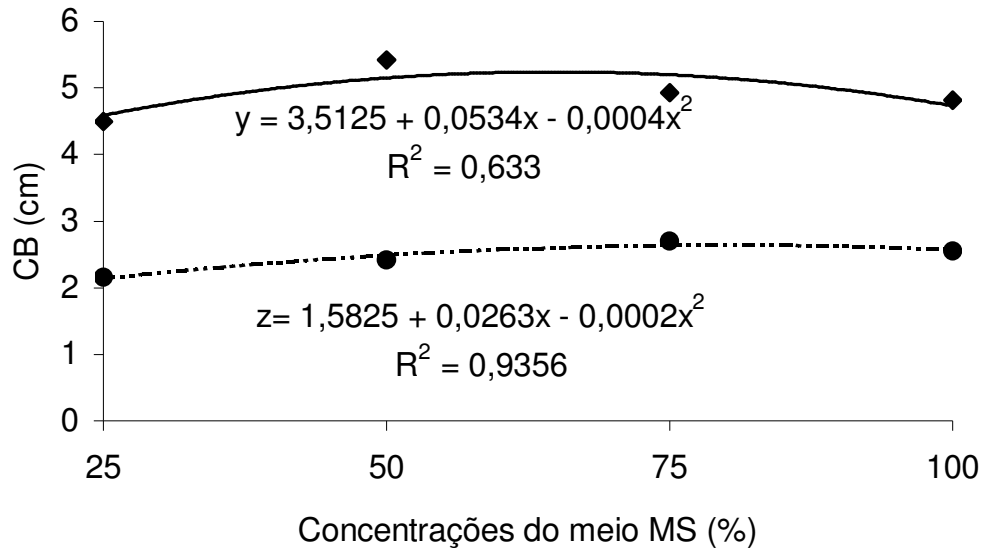
No meio com  $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$  AIB, o acúmulo de massa seca nas culturas não apresentou tendência linear de resposta nas diferentes concentrações dos sais do meio MS. Na figura 23 observa-se que nas maiores concentrações (75 e 100%) o acúmulo de massa seca foi inferior às duas menores (25 e 50%). Já no meio MS com o balanço  $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$  AIB e  $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$  BAP, houve uma ligeira tendência de incremento no acúmulo de massa seca nas culturas com o incremento das concentrações dos sais. No balanço favorável à diferenciação de raízes o acúmulo de massa seca nas plântulas foi superior ao balanço favorável à proliferação de brotos (FIGURA 23).



**Figura 23.** Efeitos da concentração dos sais do meio MS em duas combinações entre AIB e BAP no acúmulo de massa seca (MS) em brotos de gérbera, variedade Ornela, após oito semanas da implantação do experimento.

No balanço favorável à diferenciação de raízes o comprimento das brotações foi superior do que no balanço favorável à proliferação de brotos (FIGURA 24). Enquanto a auxina mantém a dominância apical, as citocininas apresentam efeito contrário (DAVIES, 1995). Em cultura de tecidos, as auxinas normalmente são utilizadas para estimular o crescimento da parte aérea formada (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998; EAPEN et al. 1998; SUDHA, et al. 1998). Entretanto, na fase de multiplicação, concentrações excessivas de auxina podem inibir ou favorecer demasiadamente o enraizamento ou a formação de calo em detrimento da multiplicação (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

No balanço favorável a proliferação de brotos, verificou-se ligeira tendência de aumentar o comprimento das brotações com o incremento da concentração dos sais do meio MS, enquanto que no balanço favorável à diferenciação de raízes este efeito não foi observado (FIGURA 24).



**Figura 24.** Efeitos da concentração dos sais do meio MS em duas combinações entre AIB e BAP no comprimento médio de brotos (CB) de gérbera, variedade Ornela, após oito semanas da implantação do experimento. ( $z = \text{MS} + 0,5 \text{ mg.L}^{-1}$  de AIB +  $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$  de BAP;  $y = \text{MS} + 0,5 \text{ mg.L}^{-1}$  de AIB).

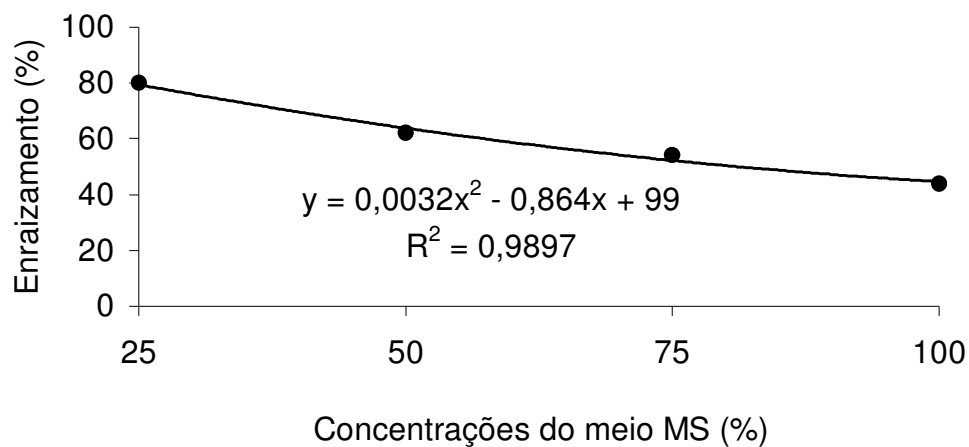
A diferenciação de raízes somente foi influenciada por balanços de fitorreguladores (TABELA 3). No meio de cultura com  $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$  de AIB houve 100% de enraizamento, enquanto que no balanço com  $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$  de AIB e  $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$  de BAP, o máximo de enraizamento chegou a 80% no meio com 25% dos sais do meio MS, e na maior concentração dos sais (100%) houve a menor percentagem de enraizamento (FIGURA 25). Mesmo na presença de auxina, o incremento da concentração dos sais reduziu a percentagem de enraizamento.

GRATTAPAGLIA & MACHADO (1998); VILLALOBOS & THORPE (1991) citaram que diluições das formulações básicas do meio de cultura têm, em geral, possibilitado melhor enraizamento em culturas *in vitro*. Mesmo na presença de auxinas, altas concentrações de sais tendem a inibir todas as fases do enraizamento, particularmente a de crescimento das raízes. Observou-se que o crescimento das raízes nas concentrações de 25 e 50% dos sais do meio MS foi mais intenso (FIGURA 21), apesar de não ter sido avaliado o comprimento das mesmas.

A variação na concentração dos sais não influenciou na percentagem de enraizamento de gérbera (BARBOSA et al. 1992). PIERIK & SEGERS (1973) citaram que as concentrações dos sais pouco influenciaram no enraizamento. A redução pela metade da concentração dos sais do meio MS promoveu a formação de maior número de raízes em dois genótipos de morangueiro (PEREIRA et al. 1999).

Por outro lado, o fato de ter ocorrido diferenciação celular mesmo nas concentrações mais baixa dos sais do meio MS (25%), demonstra que o balanço de fitorreguladores suplementados ao meio deve ser considerado como o principal fator para induzir a diferenciação de raízes ou a proliferação de brotos. Observações semelhantes

foram reportadas por BONDAREV et al. (2003), com relação à utilização de sais minerais e de carboidratos em culturas *in vitro* de *Stevia rebaudiana* (estévia).



**Figura 25.** Efeitos da concentração dos sais do meio MS no enraizamento de brotos de gerbera, variedade Ornela, em meio suplementado com  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  de AIB +  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP, após oito semanas da implantação do experimento.

#### 4.4 Avaliação da proliferação de brotos e enraizamento em três variedades de gérbera.

A Tabela 4 mostra o efeito das variedades e dos meios de cultura estudados assim como da interação destes nas variáveis avaliadas.

**Tabela 4.** Efeito de variedades e do meio de cultura na significância dos valores do teste F nas variáveis avaliadas em plântulas *in vitro* de gérbera, oito semanas após a implantação do experimento.

Tratamentos	nº brotos	Altura	enraizamento
Meio	*	*	*
Variedades	*	*	ns
Interação	*	ns	ns
CV (%)	23,61	13,24	9,12

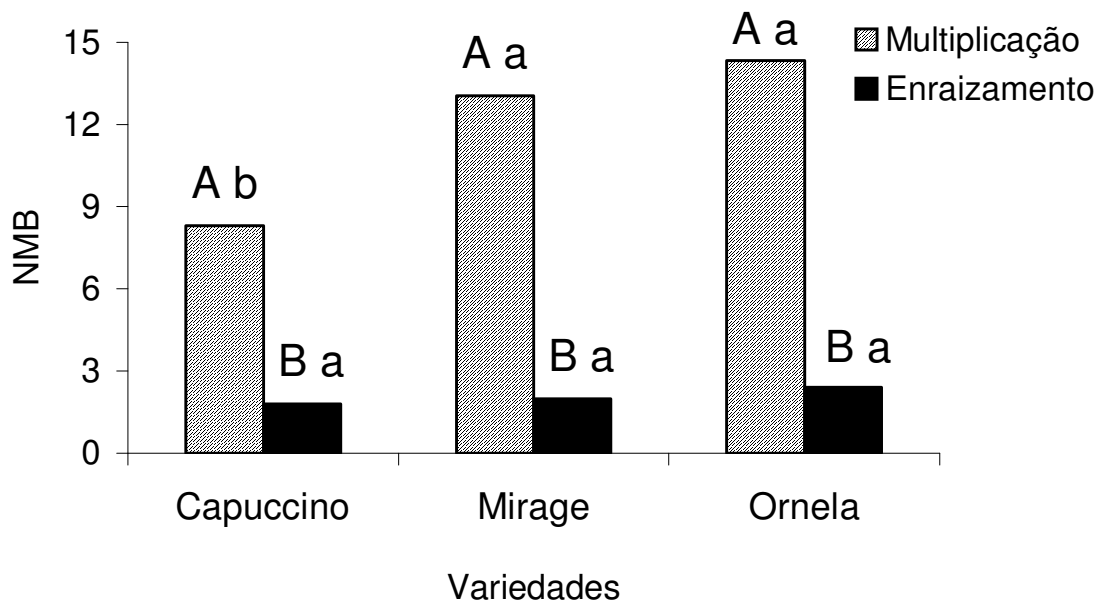
\* Valor do F significativo a 5% de probabilidade de erro.

ns Valores não significativos a 5% de probabilidade de erro.

O número médio de brotos apresentou diferença significativa entre as variedades, nos meios de cultura, assim como na interação destes fatores. A figura 26 mostra que a variedade Capuccino produziu menor quantidade de brotos que as outras variedades quando mantidas em meio de cultura favorável à proliferação de brotos. Quando mantidas em meio favorável à diferenciação de raízes, o número de brotos não diferenciou entre as variedades. No meio de cultura com  $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$  de AIB +  $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$  de BAP, favorável a proliferação de brotos, o número médio de brotos foi cerca de 5,76 vezes superior ao outro meio.

A diferença no número de brotos entre as variedades, possivelmente, deve estar associada com o balanço hormonal endógeno, com a sensibilidade celular às moléculas de fitorreguladores utilizadas, assim como no potencial genético de cada variedade.

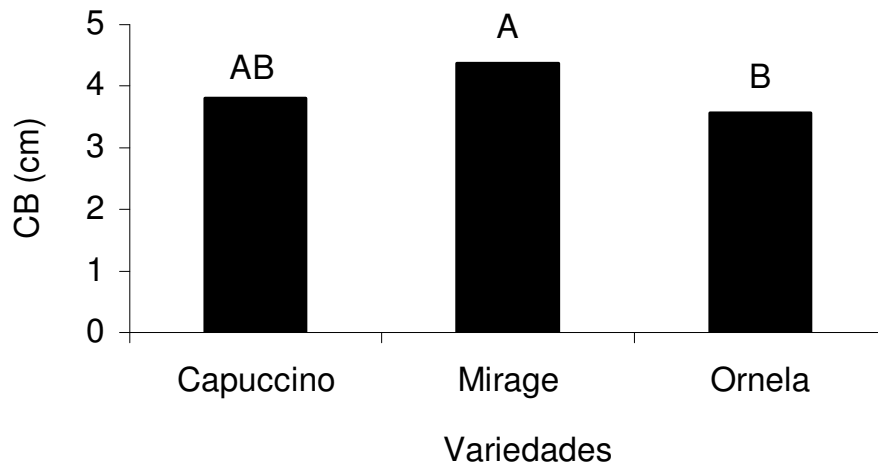
Conforme PERES (2002) o balanço de fitorreguladores mais eficiente na indução à proliferação de brotos deve ser ajustado para cada genótipo, uma vez que estes podem diferenciar-se quanto ao balanço hormonal endógeno e a sensibilidade celular.



**Figura 26.** Número médio de brotos (NMB) de três variedades de gérbera mantidas em meio de cultura favorável à multiplicação (MS + 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de AIB + 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de BAP) e enraizamento (MS + 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de AIB).

\* Médias seguidas de mesma letra minúscula entre as variedades e maiúsculas entre os meios não diferenciam entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

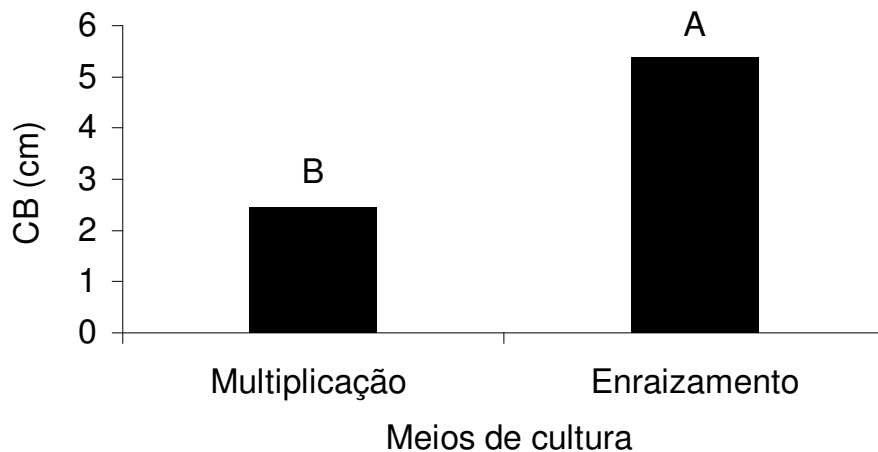
Em relação ao comprimento das brotações verificou-se diferença significativa entre as variedades e os meios de cultura, não verificando interação significativa destes fatores. A figura 27, mostra que o comprimento médio dos brotos da variedade Mirage, considerando os valores médios sobre meios de cultura, foi superior à variedade Ornela, não diferenciando da variedade Capuccino, que por sua vez não apresentou diferença significativa em relação à variedade Ornela. Entretanto, quando se compara os meios de cultura, considerando valores médios sobre variedades, no meio favorável ao enraizamento a altura das plântulas foi significativamente superior (FIGURA 28).



**Figura 27.** Comprimento médio de brotos (CB), em cm, de três variedades de gérbera *in vitro*, independente do meio de cultura utilizado.

\* Médias seguidas de mesma letra não diferenciam entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Quanto aos meios de culturas, na presença dos fitorreguladores favoráveis a proliferação de brotos (MS + 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de AIB + 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de BAP) o comprimento foi inferior que as brotações obtidas no meio com MS + 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de AIB.

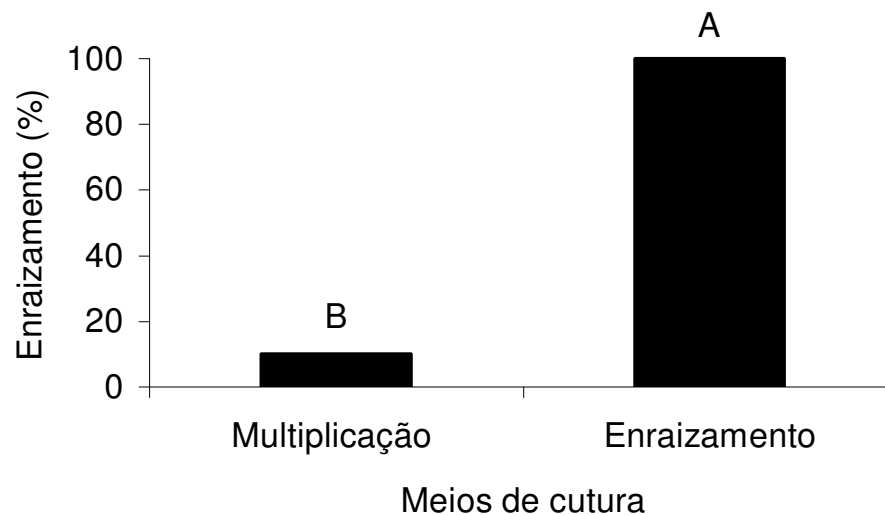


**Figura 28.** Comprimento médio de brotos (CB) de gérbera *in vitro* em dois meios de cultura, independente das variedades utilizadas.

\* Médias seguidas de mesma letra diferenciam entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.



Em relação à diferenciação de raízes, somente foi verificada diferença significativa entre os meios de cultura, sendo que no meio contendo auxina exógena o percentual de enraizamento foi superior (FIGURA 29).



**Figura 29.** Enraizamento de brotos de gérbera *in vitro*, em dois meios de cultura, independente das variedades utilizadas.

\* Médias seguidas de mesma letra diferenciam entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

O fato de não verificar diferenças significativas entre as variedades no enraizamento, pode estar associado com a facilidade de enraizamento desta espécie, uma vez que mesmo na ausência de fitorreguladores, ocorreu a diferenciação de raízes na variedade Ornela (FIGURA 13). RADICE & MARCONI (1998) não verificaram diferenças entre tratamentos utilizados na indução à diferenciação de raízes em seis variedades de gérbera. No entanto, estes autores não compararam as variedades, e conforme os dados mostrados, nem todas as variedades apresentaram 100% de enraizamento.

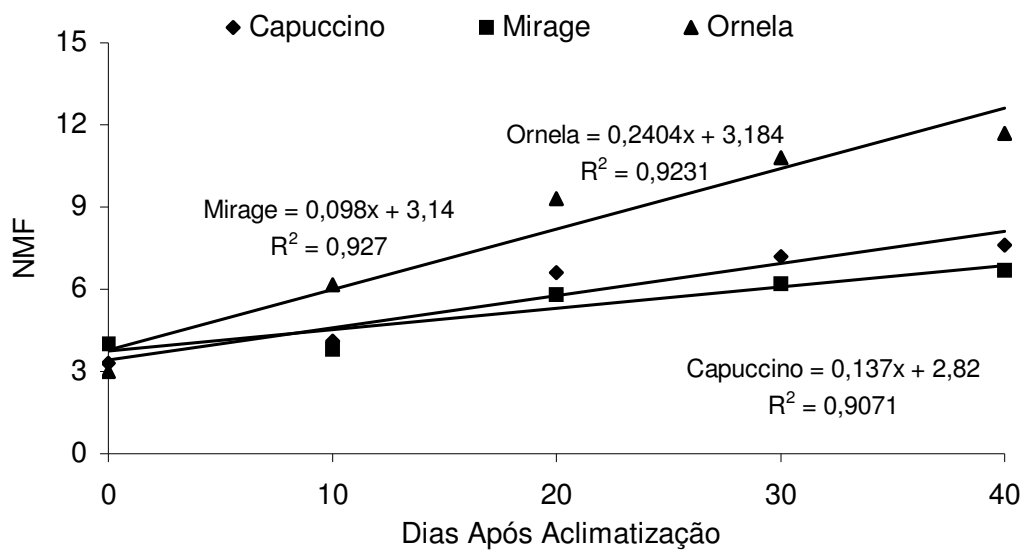
#### 4.5 Aclimação de três variedades de gérberras

As variedades de gérberra em estudo apresentaram facilidade e alto potencial para a aclimação nas condições estudadas. Este fato pode ser atribuído às características da espécie, as condições que as plântulas apresentavam no momento da aclimação e das condições climáticas do local. O fato de utilizar plântulas com raízes pode ter facilitado o processo, uma vez que apesar destas apresentarem baixa eficiência fisiológica, podem facilitar e acelerar o estabelecimento das mudas durante a aclimação (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

A taxa de sobrevivência e a altura das plântulas não diferenciaram entre as variedades em estudo, assim como no decorrer das avaliações. Apesar dos resultados favoráveis à aclimação de plântulas de gérberra, na literatura encontra-se trabalhos direcionados a melhorar este processo. SATO et al. (1999) relataram que o uso de fungos micorrízicos-arbusculares beneficiou o desenvolvimento de plântulas de gérberra propagadas *in vitro*.

Em relação ao número médio de folhas (NMF) de cada plântula observou-se diferença significativa entre as variedades entre as avaliações ao longo do tempo, assim como na interação destas fontes de variação. A variedade Ornela apresentou maior número médio de folhas que as outras variedades (FIGURA 30). No decorrer das avaliações verificou-se incremento linear no número médio de folhas nas três variedades estudadas (FIGURA 28). No trabalho de SATO et al. (1999) com gérberra de vaso, clone 800X, foi registrado número médio de folhas de 7,38 aos 60 dias após o transplante. Esta diferença entre os valores observados com o da literatura pode ser em função dos genótipos em estudo, assim como das condições ambientais.

Na avaliação realizada após 30 dias da aclimação das plântulas, não verificou-se ampla variação no número de folhas e a altura das plântulas, demonstrando que este período foi suficiente para aclimação. Desta forma, estas plântulas apresentaram condições para serem plantadas em local definitivo de cultivo, seja em canteiro ou vasos, não sendo necessária a permanência das plântulas por período superior às condições de aclimação.



**Figura 30.** Número médio de folhas (NMF) em três variedades de gérbera durante aclimatização.

## 5 CONCLUSÕES

- ✓ O processo utilizado para a implantação de gérbera, variedade Phanter, *in vitro* a partir de inflorescência mostrou-se viável para a produção comercial de mudas, apesar de apresentar baixa eficiência;
- ✓ As contaminações por bactérias foram predominantes durante a implantação da variedade Phanter *in vitro*;
- ✓ A regeneração dos explantes, da variedade Phanter, utilizados demonstrou estar em função do estágio de desenvolvimento das inflorescências;
- ✓ Inflorescências em estágio jovem, com cerca de 0,5 - 1,0 cm de diâmetro, apresentaram melhores resultados para a implantação *in vitro* de *Gerbera jamesonii* variedade Phanter;
- ✓ A proliferação de brotos em explantes de gérbera variedade Ornela depende da concentração e do tipo de citocinina utilizada;
- ✓ O BAP como fonte de citocinina demonstrou ser mais eficiente que a kinetina para induzir a proliferação de brotos na variedade Ornela;
- ✓ O balanço com 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de AIB + 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de BAP apresentou os melhores resultados durante a multiplicação *in vitro* da variedade Ornela;
- ✓ Para a multiplicação ou enraizamento da variedade Ornela *in vitro*, a concentração ideal dos sais do meio MS varia para cada fase;
- ✓ A concentração dos sais do meio MS influenciou no número de brotos em explantes de gérbera variedade Ornela, sendo que concentrações abaixo de 50% limitaram a proliferação de brotos;
- ✓ As variedades Capuccino, Mirage e Ornela apresentaram divergências quanto ao número de brotos mesmo quando mantidas em mesmo balanço de fitoreguladores e apresentaram alto potencial e facilidade na fase de aclimação nas condições estudadas.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, W. A. B. **Caracterização anatômica da organogênese *in vitro* e transformação genética via *Agrobacterium tumefaciens* em citrus sp.** 2002. Tese (Doutorado em Fitotecnia). ESALQ, Piracicaba-SP. 138 p.

AMARAL, A. F. C. **Comportamento *in vitro* de explantes de matrizes de cenoura (*Dacus carota* L.) tratadas com variáveis níveis de potássio.** 2003. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas). ESALQ, Piracicaba-SP. 103 p.

ARELLO, E. F.; Gérbera (*Gerbera jamesonii* Bolus ex Hook. In: TOMBOLATO, A. F. C.; COSTA, A. M. M. Micropropagação de plantas ornamentais. **Boletim técnico** n. 174. Instituto Agrônomo, Campinas, SP. 1998.

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. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v. 26, n. 2, p. 269-273, 1991.

ARINAITWE, G.; RUBAIHAYO, P. R.; MAGAMBO, M. J. S. Proliferation rate effects of cytokinins on banana (*Musa* spp.) cultivars. **Scientia Horticulturae**. v. 86, p. 13-21, 2000.

BARBOSA, M. H. P.; PASQUAL, M.; PINTO, J. E. B. P.; ARELLO, E. F.; BARROS, I. Efeito de sais e ácido naftalenoacético sobre o enraizamento *in vitro* de *Gerbera jamesonii* Bolus ex Hook cv. Appelbloesen. **Ciência e Prática**. v.16, n. 1, p. 39-41, 1992.

BARBOSA, M. H. P.; PASQUAL, M.; PINTO, J. E. B. P.; PINTO, C. A. B. P. Propagação *in vitro* de *Gerbera jamesonii* Bolus ex Hook cv. Appelbloesem: Influência da adenina, tirosina e concentrações de sais do meio MS. **Ciência e Prática**, v. 17, n. 2, p. 151-154, 1993 b.

BARBOSA, M. H. P.; PINTO, J. E. B. P.; PINTO, C. A. B. P.; INNECCO, R. Propagação *in vitro* de *Gerbera jamesonii* Bolus ex Hook cv. Appelbloesem através de capítulos jovens. **Revista Ceres**. v. XLI, n. 236, p.387-394, 1994.

BARBOSA, M.H.P.; PASQUAL, M.; PINTO, J.E.B.P.; ARELLO, E. F. BARROS, I.. Efeitos da benzilaminopurina e ácido indole-3-acético sobre a propagação *in vitro* de *Gerbera jamesonii* bolus ex. Hook cv. Appelbloesem. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v.28, n. 1, p. 15-19, 1993 a.

BISBIS, B.; KEVERS, C.; CREVECOEUR, M.; DOMMES, J.; GASPAR, T. Restart of lignification in micropropagated walnut shoots coincides with rooting induction. **Biologia Plantarum**. v. 47, n. 1, p. 1-5, 2003.

BLAKESLEY, D.; LENTON, J. R.; HORGAN, R. Uptake and metabolism of 6-benzyladenine in shoot cultures of *Gerbera jamesonii*. **Physiologia Plantarum**. v. 81, p. 343-348, 1991.

BONDAREV, N.; RESHETNYAK, O.; NOSOV, A. Effects of nutrient medium composition on development of *Stevia rebaudiana* shoots cultivated in the roller bioreactor and their production of steviol glycosides. **Plant Science**. v. 165, p. 845-850, 2003.

BONGERS, F.J.G. Economia das flores. **Agroanalysis**, Rio de Janeiro, v.15, p.1-4, 1999.

BRAULT, M.; MALDINEY, R. Mechanisms of cytokinin action. **Plant Physiol. Biochem.** v. 37, n. 5, p. 403-412, 1999.

CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. D. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de Tecidos e Transformação de Plantas**. 1. Ed. Brasília: SPI. 1998, v.1, p. 87-132.

CARVALHO, R. F. **Uso de mutantes fotomorfológicos no estudo da competência para regeneração *in vitro* em micro-tomateiro (*Lycopersicon esculentum* cv Micro-tom)**. 2003. Dissertação (Mestrado (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas)). ESALQ, Piracicaba-SP. 69 p.

CARVALHO, R. L.; CHIANCA, G. K.: A produção de flores e plantas ornamentais do Estado do Rio de Janeiro: evolução recente, desafios e perspectivas. **Pesq. agropec. & Desenv. sustent.** Niterói-RJ. v. 1, n. 1, p. 97-112, 2002.

CARY, A.; UTTAMCHANDANI, S. J.; SMETS, R.; VAN ONCKELEN, H. A.; HOWELL, S. H. *Arabidopsis* mutants with increased organ regeneration in tissue culture are more competent to respond to hormonal signals. **Planta**. v. 213, p. 700-707, 2001.

CASTAN, J. **Identificação de produtos para mercados interno e externo**. Rio de Janeiro, 2003. 1 CD-ROM.

CENTENO, M. L.; RODRÍGUEZ, R.; BERROS, B.; RODRÍGUEZ, A. Endogenous hormonal content and somatic embryogenic capacity of *Corylus avellana* L. cotyledons. **Plant Cell Reports**, v. 17, p. 139-144, 1997.

CHRISTIANSON M. L.; WARNICK, D. A. Organogenesis *in vitro* as a developmental process. **HortScience**. v. 23, p. 515 - 519, 1988.

CID, L. P. B. A propagação *in vitro* de plantas. O que é isso? **Biociência & Desenvolvimento**. n. 19, p. 16-21, 2001.

DAVIES, P.J. The plant hormones concept: concentration, sensitivity and transport. In: DAVIES, P. J. (Ed.) **Plant hormones: physiology, biochemistry and molecular biology**. Dordrecht, Kluwer Acad. Publi. 1995, p. 13 - 38.

DINIZ, J. D. N.; GONÇALVES, A. N.; FERREYRA HERNANDEZ, F. F.; TORRES, A. C. Absorção de macronutrientes por explantes de bannaneira *in vitro*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v. 34, n. 7, p. 1201-1209, 1999.

EAPEN, S.; TIVAREKAR, S. & GEORGE, L. Thidiazuron-induced shoot regeneration in pigeonpea (*Cajanus cajan* L.). **Plant Cell Tiss. Org. Cult.** v.53, p.217-220, 1998.  
FAO/IAEA. **Low cost options for tissue culture technology in developing countries**. 102 p. 2002.

GASPAR, T. & HOFINGER, M. Auxin metabolism during adventitious rooting. In DAVIS, T. D., HAISSIG, B. E., SANKHLA, N. **Adventitious root formation in cuttings**. ed. Advances in Plant Sciences Series. vol. 2. Dioscorides Press. Portland. Oregon. 1988, p. 117-131.

GRAÇA, L. R.; SILVA, G. M. B. Produção de Flores e Plantas Ornamentais: Custos e Rentabilidade de Algumas Espécies na Região de Curitiba. Disponível no site: <<http://gipaf.cnptia.embrapa.br/itens/publ/sober/trab256.pdf>>. Acesso em 19/08/2003.

GRATTAPAGLIA, D. MACHADO, M. A. Micropropagação. In. TORRES, A. C; CALDAS. L. S. & BUSO, J. A. (Org.). **Cultura de Tecidos e Transformação de Genética de Plantas**. 1. Ed. Brasília: SPI. 1998, v.1, p.183-260.

HANDRO, W. & FLOH, E. I. S. Aspectos do controle da morfogênese *in vitro* In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. (Eds). **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília, CBAB/EMBRAPA, 1990. p. 203-212.

HOWELL, S. H.; LALL, S.; CHE, P. Cytokinins and shoot development. **Review TRENDS in Plant Science**. v. 8, n. 9, p. 453 - 459, 2003. Disponível no site: <<http://plants.trends.com>>. Acesso em: 10/08/2004

HUTCHISON, C. E.; KIEBER, J. J. Cytokinin signaling in Arabidopsis. **The plant cell**, S47-S59, Supplement, 2002. Disponível no site: <[www.plantcell.org](http://www.plantcell.org)>. Acesso em: 13/08/2003.

KÄMPF, A. N. **Produção Comercial de Plantas Ornamentais**. Guaíba: Agropecuária 2000. 254 p.

KERBAUY, G. B. Competência e determinação celular em cultura de células e tecidos de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. & BUSO, J. A (Eds). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, CBAB/EMBRAPA, 1999. p. 519-531.

KRIKORIAN, A. D. Medios de cultivo: Generalidades, Composición y preparación. IN: MROGINSKI, L. ROCA, W. M.; MROGINSKI, L. A. **Cultivo tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones**. p. 41-77, 1991.

LALIBERTÉ, S.; CHRÉTIEN, L.; VIETH, J. *In vitro* plantlet production from young capitulum explants of *Gerbera jamesonii*. **HortiScience**, v. 20, n. 1, p. 137-139, 1985.

- LEWANDOWSKI, I. Propagation method as an important factor in the growth and development of *Miscanthus x giganteus*. **Industrial Crops and Products**. v. 8, p. 229–245, 1998.
- LIBBENGA, K. R.; MENNES, A. M. Hormones binding and signal transduction. In DAVIES, P. J. (Ed.) **Plant hormones: physiology, biochemistry and molecular biology**. Dordrecht, Kluwer Acad. Publi., 1995.
- LORENZI, H.; SOUZA, H.M.S. **Plantas Ornamentais no Brasil**. 2. Ed. Nova Odessa, S.P.: Instituto Plantarum. 1999. 1120p.
- MATHUR, N.; RAMAWAT, K.G. & NANDWANI, D. Rapid *in vitro* multiplication of jujube through mature stem explants. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.** v. 43, p. 75 – 77, 1995.
- MERCIER, H.; SOUZA, B. M.; KRAUS, J. E.; HAMASAKI, R. M.; SOTTA, B. Endogenous auxin and cytokinin contents associated with shoot formation in leaves of pineapple cultured *in vitro*. **Braz. J. Plant. Physiol.** v. 15, n. 2, p. 107-112, 2003.
- MOK, D. W. S.; MOK, M. C. Cytokinin metabolism and action. **Ann. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.** v. 52, p. 89-118, 2001.
- MONTARROYOS, A. V. V. Contaminação *in vitro*. In: Notícias – **Associação de Cultura de Tecidos de Plantas** (ABCTP). abr. – ago. n. 36 –37, 2000
- MOREIRA, S. Flores contra o desemprego. **Jornal do Brasil** - Economia, Rio de Janeiro, 16 abr. 2000.
- MOTOS, J. R.. Micropropagação uma alternativa cada vez mais utilizada para a propagação de flores e plantas ornamentais. Informativo IBRAFLOR, ano IV n. 17. Disponível no site: <[www.flortec.com.br/artigos/micropropagação.htm](http://www.flortec.com.br/artigos/micropropagação.htm)>. Acesso em: 19/08/2003.
- MURASHIGE, T.; SERPA, M.; JONES; J. B. Clonal multiplication of Gerbera through tissue culture. **HortScience**. v.9, n. 3, p.175-180, 1974.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tabacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, p. 473-497, 1962.
- NACIF, A.M.; FERREIRA,R.N.D.;NOVO,N.;CHIANCA,G.K. Programa de Desenvolvimento da Floricultura no Estado do RJ. SEAAPI/RJ, Rio de Janeiro, 2002. 19 p.
- NAS, M. N.; READ. P. E. A hypothesis for the development of a defined tissue culture medium of higher plants and micropropagation of hazelnuts. **Scientia Horticulturae**. v. 101, n. 1-2, p. 189-200, 2004.



OHKI, S. & SAWAKI, S. The effects of inorganic salts and growth regulators on *in vitro* shoot proliferation and leaf chlorophyll content of *Delphinium cardinale*. **Scientia Horticulturae**.v. 81, p. 149-158, 1999.

PASQUAL, M.; HOSHIKA, E.; ISHIDA, J. S. Influência de diferentes concentrações de sacarose e sais minerais sobre a multiplicação *in vitro* de *Nephorolepis exaltata*, uma samambaia ornamental. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v. 29, n. 11, p. 1681 - 1684, 1994.

PEREIRA, J. E. S.; BIANCHI, V. J.; DUTRA, L. F.; FORTES, G. R. L. Enraizamento *in vitro* do morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duchesne) em diferentes concentrações do meio MS. **Ciência Rural**. v. 29, n. 1, p. 17-20, 1999.

PERES, L. E. P., KERBAUY, G. B. Citocininas In: KERBAUY, G. B. **Fisiologia Vegetal**. 1ª ed. Rio de Janeiro-RJ, Guanabara Koogan, 2004, p. 250-278.  
PERES, L. E. P. Bases fisiológicas e genéticas da regeneração de plantas *in vitro*. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**. n. 25, p. 44-48, 2002.

PIERIK, R. L. M.; JANSEN, J. L. M.; MAASDAM, A.; BINNENDIJK, C. M. Optimalization of Gerbera plantlet production from excised capitulum explants. **Scientia Horticulturae**, v. 3, p. 351-357, 1975.

PIERIK, R. L. M.; STEEGMANS, H. H. M.; VERHAEGH, J. A. M. ; WOUTERS, A. N. Effect of cytokinin and cultivar on shoot formation of *Gerbera jamesonii* *in vitro*. **Neth. J. Agri. Sci**. v. 30, p. 341-346, 1982.

PIERIK, R. L.M. & SEGERS, T. A. In vitro culture of midrib explants of gerbera: adventitious root formation and callus induction. **Zeitschrift fur Pflanzenphysiologie**. Stuttgart. v. 69. p. 204-2112, 1973.

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

REIS, C. V. **Estudos sobre Regeneração *in vitro* de *Catharanthus roseus*, sob diferentes balanços de reguladores de crescimento**. 2001. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia). UFRRJ, Seropédica-RJ. 68 p.

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

ROCA, W. M.; AMÉZQUITA, M. C.; VILLALOBOS, V. M.; Desarrollo de la biotecnología agrícola en América Latina y el Caribe. IN: MROGINSKI, L. ROCA, W. M.; MROGINSKI, L. A. **Cultivo tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones**. 1991, p.937- 946.

ROUT, G. R. & DAS, P. Recent trends in the biotechnology of *Chrysanthemum*: a critical review. **Scientia Horticulturae**. v. 69, p. 239-257, 1997.

ROUT, G.R.; SAMANTARAY S.; DAS P. *In vitro* manipulation and propagation of medicinal plants. **Biotechnology Advances**. v.18, p. 91-120, 2000.

SANTOS, C. H.; DOMINGUES, M. C. S. Mecanismos de ação de auxinas. In: CASTRO, P. R. C.; SENA, J. O. A.; KLUGE, R. A. **Introdução à fisiologia do desenvolvimento vegetal**. 2002, Maringá, Eduem p. 35-48.

SANTOS, C. H.; DOMINGUES, M. C. S. Mecanismos de ação de auxinas. In: CASTRO, P. R. C.; SENA, J. O. A.; KLUGE, R. A. **Introdução à fisiologia do desenvolvimento vegetal**. Maringá, Eduem p. 35-48. 2002.

SATO, A.Y.; NANNETTI, D.C.; PINTO, J.E.B.P.; SIQUEIRA, J.O.; BLANK, M.F.A. Fungos micorrízicos-arbusculares no desenvolvimento de mudas de helicônia e gérbera micropropagadas. **Horticultura Brasileira**. v. 17, n. 1, p. 25-28, 1999.

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

SKOOG, F. & MILLER, C.O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. *Symp. Soc. Exp. Biol.* v.11, p. 118-231, 1957.

SOUSA, C. M.; MIRANDA, R. M. Efeito do tipo de explante e da relação AIB/BAP na micropropagação de *Catharathus roseus*. **Rev. Univ. Rural - Sér. Ciên. da Vida**, Suplemento. Seropédica - RJ. v. 22, n. 2, p. 217-222, 2002.

SOUZA, A. V. **Propagação in vitro e aspectos anatômicos de (*Lychnophora pinaster*)**. 2003. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia). UFLA, Lavras - MG. p. 56-111.

SRISKANDARAJAH, S.; MULLINS, M. G.; NAIR, Y. Induction of adventitious rooting *in vitro* in difficult-to-propagate cultivars of apple. **Plant Science**. v. 24, p. 1-9, 1982.

STOLTZ, L. P. Factors influencing root initiation in a easy and a difficult-to-root *Chrysanthemum*. **Proc. Amer. Soc. Hortic. Sci.** v. 92, p. 622-626, 1968.

SUDHA, C. G. ; KRISHWAN, P. N. & PUSHANGADAN, P. *In vitro* propagation of *Holoestenia annulare* (Roxb.) K. Schum, a rare medicinal plant. **In vitro Cell, Dev. Biol.**, v.33, p. 57-63, 1998.

SUZUKI, R. M.; KERBAUY, G. B.; ZAFFARI, G. R. Endogenous hormonal levels and growth of dark-incubated shoots of *Catsetum fimbriatum*. **Journal of Plant Physiology**. v. 161, n. 8, p. 929-935, 2004.

TAIZ, L. & ZEIGER, E. **Plant physiology**. Sinauer Associates, Inc., Publishers, Sunderland, Massachusetts, USA, 792 pp. 1998

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Citocininas: reguladores da divisão celular. In. TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3ª edição, p.517-540, 2004.

TOPOONYANONT, N. & DEBERGH, P. C. Reducing bushiness in micropropagated *Gerbera*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. v. 67, p. 133-144, 2001.

TOPOONYANONT, N.; AMPAWAN, R.; DEBERGH, P. C. Bushiness in *Gerbera jamesonii*: Abnormal shoot development during micropropagation. **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**. v. 74, n. 6, p. 675-679, 1999.

TORRES, A. C.; FERREIRA, A. T.; SÁ, F. G.; BUSO, J. A.; CALDAS, L. S.; NASCIMENTO, A. S.; BRÍGID, M. M.; ROMANO, D. **Glossário de Biotecnologia Vegetal**. Brasília-DF. Embrapa Hortaliças, 2000. 128p.

VAN STADEN, J. & HARTY, A. R. Cytokinins and adventitious root formation. IN. DAVIS, T. D., HAISSIG, B. E., SANKHLA, N. **Adventitious root formation in cuttings**. ed. Advances in Plant Sciences Series. v. 2. Dioscorides Press. Portland. Oregon. 1988, p. 185-201.

VILLALOBOS, V. M. & THORPE, T. A. Micropropagación: Conceptos, metodología y resultados. In. IN: MROGINSKI, L. ROCA, W. M.; MROGINSKI, L. A. **Cultivo tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones**. 1991, p.127- 141.

YAMAGUCHI, M.; KATO, H.; YOSHIDA, S.; YAMAMURA, S.; UCHIMIYA, H.; UMEDA, M. Control of in vitro organogenesis by cyclin-dependent kinase activities in plants. **PNAS**. v. 100, n. 13, p. 8019-8023, 2003. Disponível em: <[www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1332637100](http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1332637100)>. Acesso em: 17/11.