

MÁRCIO HENRIQUE PEREIRA BARBOSA

PROPAGAÇÃO *In Vitro* DE *Corbora jamesonii* Bolus ex Hook
ATRAVÉS DE CAPÍTULOS JOVENS

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura de Lavras, como parte das exigências do Curso de Pós-graduação em Agronomia, área de concentração Fitotecnia para obtenção do grau de "MESTRE".

ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA DE LAVRAS
LAVRAS - MINAS GERAIS

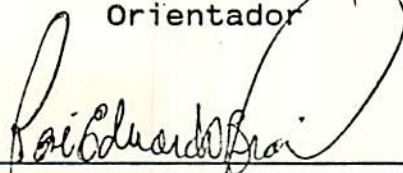
1991

PROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE *Gerbera jamesonii* Bolus ex Hook
ATRAVÉS DE CAPÍTULOS JOVENS

APROVADA: 07 de Fevereiro de 1992



Prof. Dr. Moacir Pasqual
Orientador



Prof. PhD. José Eduardo Brasil Pereira Pinto



Eng. Agr. MS Eduardo Fonseca Arelló

A minha esposa,

Maria da Glória de Oliveira Barbosa

OFEREÇO

Aos meus pais, Sebastião e Neusa

A minha irmã, Cristina

Ao meu irmão, Luís Cláudio

Aos meus avós e tios(as)

DEDICO

BIOGRAFIA DO AUTOR

MARCIO HENRIQUE PEREIRA BARBOSA, filho de Sebastião Cardoso Barbosa e Neusa Maria Pereira Barbosa, nasceu em Lavras, Estado de Minas Gerais, a 30 de abril de 1966.

Concluiu o curso superior na Escola Superior de Agricultura de Lavras, Minas Gerais, no ano de 1989, recebendo o título de Engenheiro Agrônomo.

Em março de 1990, iniciou o curso de pós-graduação em Agronomia, área de concentração em Fitotecnia, à nível de Mestrado, na Escola Superior de Agricultura de Lavras.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por tudo

A minha esposa Glória e aos meus pais e irmãos, pelo carinho que me dedicaram durante o curso.

Ao meu tio José Eduardo Brasil Pereira Pinto, pelo valioso incentivo, apoio e amizade transmitida durante toda minha formação profissional.

Ao professor Moacir Pasqual, pela orientação e sugestões apresentadas.

Ao engenheiro agrônomo Eduardo Fonseca Arelló pela amizade e companheirismo.

Ao engenheiro agrônomo Antônio Nazareno Guimarães Mendes pela amizade e ensinamentos sobre microinformática.

A Escola Superior de Agricultura de Lavras (ESAL), através de seus departamentos, especialmente ao Departamento de Agricultura (DAG) e ao Laboratório de Biotecnologia, pelos conhecimentos adquiridos.

Ao produtor agrícola Sr. Adriano Antônio Gervásio Van Vliet pelo fornecimento dos explantes (capítulos jovens) iniciais.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos.

Aos laboratoristas Evaldo de Souza Arantes e Vantuil Antônio Rodrigues, pela colaboração durante as pesquisas.

A Tecla, pelos serviços datilográficos.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

LISTAS DE QUADROS

Quadro		Página
1	Representação qualitativa da resposta morfogenética observada no cultivo "in vitro" de capítulos jovens de <u>Gerbera jamesonii</u> Bolus ex Hook cv. Appelbloesem em diferentes concentrações de BAP e AIA. ESAL, Lavras/MG, 1991.	20
2	Representação qualitativa da resposta morfogenética observada no cultivo "in vitro" de capítulos jovens de <u>Gerbera jamesonii</u> Bolus ex Hook cv. Appelbloesem em meio MS suplementado com 6 mg/l de BAP para as diferentes concentrações de 2,4-D e AIA. ESAL, Lavras/MG, 1991	21
3	Resumo da análise de variância e regressão para diâmetro médio dos capítulos desenvolvidos "in vitro" de <u>Gerbera jamesonii</u> Bolus ex Hook cv. Appelbloesem, nos diferentes níveis de BAP e AIA empregados. ESAL, Lavras/MG, 1991	22

Quadro

Página

- 4 **Resumo da análise de variância e regressão para diâmetro médio dos capítulos desenvolvidos "in vitro" de Gerbera jamesonii Bolus ex Hook cv. Appelbloesem em meio MS suplementado com 6 mg/l de BAP e com diferentes níveis de 2,4-D e AIA. ESAL, Lavras/MG, 1991** **24**
- 5 **Resumo da análise de variância e regressão para o número médio de brotos de Gerbera jamesonii Bolus ex Hook cv. Appelbloesem nos diferentes níveis de AIA e BAP empregados. ESAL, Lavras/MG, 1991.** **33**
- 6 **Resumo da análise de variância para o número médio de brotos de Gerbera jamesonii Bolus ex Hook cv. Appelbloesem nos diferentes tratamentos com adenina e tirosina suplementado com 2,27 mg/l de BAP. ESAL, Lavras/MG, 1991.** **38**
- 7 **Número médio de brotos obtidos "in vitro" de Gerbera jamesonii Bolus ex Hook cv. Appelbloesem, para os diferentes tratamentos empregando-se o meio MS suplementado com 2,27 mg/l de BAP. ESAL, Lavras/MG, 1991.** **39**

Quadro

Página

- 8 Resumo da análise de variância para o número médio de brotos de Gerbera jamesonii Bolus ex Hook cv. Appelbloesem nos diferentes tratamentos com as concentrações dos sais do MS suplementado com 2,27 mg/l de BAP. ESAL, Lavras/MG, 1991. 40
- 9 Número médio de brotos obtidos "in vitro" de Gerbera jamesonii Bolus ex Hook cv. Appelbloesem, para as diferentes concentrações de sais do MS suplementado com 2,27 mg/l de BAP. ESAL, Lavras/MG, 1991. 41
- 10 Resumo da análise de variância e regressão para épocas de avaliação em função do número de brotos obtidos em meio MS com 2,27 mg/l de BAP, de Gerbera jamesonii Bolus ex Hook cv. Appelbloesem. ESAL, Lavras/MG, 1991. 44
- 11 Representação qualitativa da resposta morfogenética observada observada no cultivo de brotações de Gerbera jamesonii Bolus ex Hook cv. Appelbloesem em diferentes concentrações de sais e níveis de AIA. ESAL, Lavras/MG, 1991. .. 47

- 12 Representação qualitativa da resposta morfo-
nética observada observada no cultivo de brota-
ções de Gerbera jamesonii Bolus ex Hook cv.
Appelbloesem em diferentes concentrações de
sais e níveis de ANA. ESAL, Lavras/MG, 1991. ..

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Efeito do BAP sobre o diâmetro dos capítulos desenvolvidos "in vitro" de <u>Gerbera jamesonii</u> Bolus ex Hook cv. Appelbloesem. ESAL, Lavras/MG, 1991.	25
2	Efeito do 2,4-D sobre o diâmetro dos capítulos desenvolvidos "in vitro" de <u>Gerbera jamesonii</u> Bolus ex Hook cv. Appelbloesem em meio MS suplementado com 6 mg/l de BAP. ESAL, Lavras/MG, 1991.	26
3	Broto adventício regenerado a partir do cultivo "in vitro" de capítulo jovem. ESAL, Lavras/MG, 1991.	29
4	Efeito do BAP sobre o número de brotos obtidos "in vitro" de <u>Gerbera jamesonii</u> Bolus ex Hook cv. Appelbloesem. ESAL, Lavras/MG, 1991.	34

Figura

Página

- 5 Efeito do AIA sobre o número de brotos obtidos "in vitro" de Gerbera jamesonii Bolus ex Hook cv. Appelbloesem. ESAL, Lavras/MG, 1991. 36
- 6 Efeito da época de avaliação sobre o número de brotos obtidos "in vitro" de Gerbera jamesonii Bolus ex Hook cv. Appelbloesem em meio MS suplementado com 2,27 mg/l de BAP. ESAL, Lavras/MG, 1991. 45
- 7 Representação esquemática da micropropagação de Gerbera jamesonii Bolus ex Hook cv. Appelbloesem através de capítulos jovens. 1. Capítulos jovens. 2 e 3. Brotações axilares em fase de multiplicação. 4. Plântula enraizada pronta para aclimação. 50

SUMARIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Estabelecimento da cultura	3
2.2. Multiplicação de brotos	9
2.3. Enraizamento de brotos	12
3. MATERIAL E METODOS	14
3.1. Fase de Estabelecimento da Cultura	15
3.2. Fase de Multiplicação	16
3.3. Fase de Enraizamento	18
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
4.1. Fase de Estabelecimento da Cultura	19
4.2. Fase de Multiplicação	32
4.3. Fase de Enraizamento	46
4.4. Considerações finais	51
5. CONCLUSÕES	53
5.1. Fase de Estabelecimento da Cultura	53
5.2. Fase de Multiplicação	53
5.3. Fase de Enraizamento	54

6. RESUMO	55
7. SUMMARY	57
8. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	59

LISTA DE ABREVIATURAS

BAP (BA)	6-Benzilaminopurina = 6-Benziladenina
SDB339	6-Benzilamino-9-(tetrahidro-2-piril)-purina
PBA	(6-Benzilamino)-9-2-tetraidropirani-9-H-purina
KIN	Cinetina; 6-furfurilamino-purina
AIB	Acido indolilbutírico
AIA	Acido 3-indolilacético
ANA	Acido naftalenoacético
2,4-D	Acido 2,4-diclorofenoxiacético
GA ₃	Acido giberélico; 2,4a,7-trihidroxi-1-metil-8-metilenegib-3 ene-1,10-ácido carboxílico-1-4-lactona
MS	MURASHIGE & SKOOG (1962)

1. INTRODUÇÃO

As técnicas de cultura de tecidos tem sido amplamente empregadas para a propagação de plantas, principalmente as ornamentais, e entre estas destacam-se a violeta e a gerbera, as quais são responsáveis por mais de 70% dentre quarenta espécies de plantas ornamentais produzidas pela França através da cultura de tecidos (BOUZIGUES, 1987).

No Brasil a produção de gerbera de corte está concentrada em Jaguariúna-SP na cooperativa Holambra, respondendo por mais de 85% da produção nacional, sendo o restante completado por produtores do sul do país. Apenas 20% das flores de gerbera produzidas no Brasil, são exportadas para os países da América do Sul, principalmente Colômbia. O exigente mercado europeu não contribui para a importação destas flores.

Nos últimos anos tem sido crescente o interesse pelas gerberas, pois, suas flores que são utilizadas para corte, apresentam boa durabilidade e uma gama de cores, que podem satisfazer os mercados mais exigentes. As gerberas cultivadas atualmente são híbridos procedentes da Gerbera jamesonii; pertencem à família das compostas e são nativas da Ásia e África do Sul.

Existem dois métodos para a propagação dessa espécie. Através de sementes, mas, por ser uma planta de polinização

cruzada, este método não é utilizado comercialmente, pois, origina progênies muito desuniformes. O principal método é o vegetativo, porém possui a desvantagem de disseminação de doenças durante as sucessivas gerações de propagação. O cultivo da gerbera é semi-perene e os métodos de propagação por divisão de touceiras e por corte do rizoma produzem, em média, respectivamente, 5 e 40 mudas por ano (CHU & HUANG, 1983). Sendo assim, somente os métodos convencionais de propagação e tratamentos fitossanitários não são suficientes para atender a grande demanda de mudas para instalação e renovação de campos de cultura. Neste contexto, é importante ressaltar a frequente importação de mudas produzidas pelas técnicas de cultura de tecidos da Holanda.

O uso das técnicas de cultura de tecidos permite a obtenção em curto espaço de tempo, de um grande número de plantas uniformes e sadias. Para o sucesso da micropropagação em grande escala, três etapas a saber, devem ser vencidas: (a) Estabelecimento dos explantes primários em meio de cultura, (b) Adequação do meio ótimo para cultivo, bem como as condições externas, para obter altas taxas de multiplicação e (c) Indução de raízes e aclimatação das plantas após a transferência para o solo.

Este trabalho, teve por objetivo, determinar metodologias adequadas para cultivo "in vitro" de Gerbera jamesonii Bolus ex Hook cv. Appelbloesem, que proporcione um rápido estabelecimento através de capítulos jovens, multiplicação de brotações axilares e enraizamento de brotos.

2: REVISAO DE LITERATURA

2.1. Estabelecimento da cultura

O emprego da cultura de tecidos tem sido crescente para a gerbera, tornando-se uma alternativa bastante viável para sua propagação assexual. As primeiras tentativas neste sentido foram feitas por PIERIK & SEGERS (1973), na Holanda, estudando os fatores que afetavam a formação de raízes adventícias, utilizando como explante, nervuras de folhas jovens. Os resultados deste trabalho foram básicos para os posteriores estudos do cultivo de gerbera "in vitro".

Diversos trabalhos mostram que a gerbera pode ser propagada vegetativamente por cultivo "in vitro" de inflorescências (PAWLOWSKA, 1977), folhas (HEDTRICH, 1979), parte central do rizoma (SAWA, 1977), escapo ou talo floral (CHU & HUANG, 1983), meristemas (MURASHIGE et alii, 1974 e RUFFONI et alii, 1987) e capítulos jovens (LALIBERTE et alii, 1985 e PIERIK et alii, 1975). Estes métodos por sua vez, apresentam vantagens e desvantagens. Segundo CHU & HUANG (1983), a utilização de inflorescências, folhas, parte central do rizoma, meristemas e capítulos jovens, não podem ser considerados métodos ideais para produção comercial de plântulas de gerbera. Por outro lado, MURASHIGE et alii (1974) afirma que meristemas não podem

ser utilizados rotineiramente devido as altas taxas de contaminação dos explantes, superiores a 80%. Uma objeção que se faz em relação a utilização de folhas, inflorescências e capítulos jovens, escapo ou talo floral e parte central do rizoma para o estabelecimento da cultura de gerbera "in vitro", é que, a percentagem de explantes com formação de brotos é pequena e algumas vezes nula. De maneira geral, as brotações obtidas por qualquer um dos métodos podem facilmente serem usadas como material estéril inicial para outras subculturas e experimentos onde se deseja brotações axilares.

Teoricamente, qualquer tecido pode ser utilizado como explante, em vista da totipotência das células vegetais. Na prática, entretanto, procura-se utilizar explantes que contenham maior proporção de tecidos meristemáticos ou que tenham maior capacidade de expressar a totipotência. Apices caulinares, gemas axilares e meristemas são os explantes mais indicados para a propagação clonal "in vitro". Assim, RUFFONI et alii (1987), determinaram uma metodologia pela qual explantes meristemáticos poderão ser utilizados para estabelecimento inicial da cultura "in vitro", com alta eficiência de assepsia dos mesmos. A metodologia consiste no pré-tratamento da planta matriz com desfolhação e imersão em solução contendo 100 mg/l de estreptomicina + 1 g/l de benlate + 1 g/l de ridomil, com posterior transplante para substrato esterelizado. As brotações regeneradas poderão ser utilizadas para extração dos meristemas.

Atualmente o método que emprega meristemas (RUFFONI et alii, 1987) é o mais indicado para propagação massal mais

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

Os primeiros trabalhos com a intenção de induzir calos a partir de explantes de gerbera, foram feitos por PIERIK & SEGERS (1973). Segundo os autores, as altas concentrações de citocininas BA (1 e 10 mg/l) e SDB339 (1 e 10 mg/l), foram mais efetivas para induzir a formação de calos e que este fato foi ampliado ainda mais quando se adicionou uma auxina, AIB (10 mg/l). Estes resultados concordam com o trabalho de MURASHIGE & SKOOG (1962), onde a combinação de uma citocinina com uma auxina beneficia a formação de calos. No entanto, PIERIK & SEGERS (1973) não conseguiram induzir a formação de gemas adventícias a partir de calos.

MURASHIGE et alii (1974) estabeleceram "in vitro" a cultura de calos de gerbera, sendo esta, subculturada indefinidamente em meio químico apropriado. As culturas de calos foram abandonadas após numerosas tentativas, visto que a organogênese ocorreu de forma inconstante e em pequeno número. Por outro lado, RUFFONI & SULIS (1988) cultivaram calos oriundos da parte basal de brotações, em meio sólido contendo metade da concentração dos sais do MS, suplementado com AIA e altos níveis de BAP. Somente cinco clones, de um total de sessenta, foram capazes de regenerar numerosas brotações a partir de calos.

Avaliando o efeito da citocinina e cultivar na formação de

brotos, a partir do cultivo "in vitro" de capítulos, PIERIK et alii (1982) concluíram que os altos níveis de citocinina, BA (10 e 20 mg/l) e KIN (10 mg/l), podem induzir deformação de folhas e aumentar a formação de calos em certas cultivares. Estes autores também recomendam que a formação de calos e a regeneração de brotações adventícias a partir destes calos deve ser evitada, pois estes são fontes potenciais de mutações.

Segundo LALIBERTE et alii (1985), não se pode afirmar com certeza, qual o local de origem destas brotações adventícias. Elas tanto podem ter se originado por reorientação de tecidos meristemáticos das inflorescências, bem como do tecido do receptáculo floral. No entanto AHMIM & VIETH (1986), CAPPADOCIA et alii (1987) e SITBON (1981) citam que em determinadas ocasiões, a regeneração dessas plântulas ocorre em calos que se formam a partir de óvulos imaturos e que, portanto, tais plântulas podem ser consideradas haplóides. Porém, a frequência de obtenção desses haplóides ainda é baixa para os diferentes genótipos estudados. É importante ressaltar que a obtenção de haplóides de gerbera por cultivo "in vitro" de capítulos é de grande importância para o melhoramento dessa espécie, visto as dificuldades para a obtenção de linhas puras por autofecundação e também devido aos insucessos com a cultura de anteras "in vitro".

Para conseguir o estabelecimento "in vitro" através de explantes de gerbera pode-se utilizar os métodos anteriormente citados. Estes métodos, por sua vez, empregam concentrações adequadas de citocininas e auxinas buscando um melhor balanço hormonal, anteriormente estudado por SKOOG & MILLER (1957). Desta

forma, dentre as citocininas, a BA é a mais comumente empregada na fase de proliferação de brotos podendo ser empregada juntamente com AIA. Assim, LALIBERTE et alii (1985) utilizaram 1,0 ou 2,0 mg/l de BA associados com 0,1 mg/l de AIA, conseguindo melhores resultados no cultivo "in vitro" de capítulos para produção de brotos. De outra forma, PIERIK et alii (1982), utilizando níveis mais elevados de BA (5, 10 e 20 mg/l), conseguiram também a formação de brotos adventícios, trabalhando com quinze cultivares de gerbera.

Segundo PIERIK et alii (1975), é essencial a presença de citocinina no meio de cultura para a formação de brotos a partir do capítulo. As concentrações ótimas de BA e PBA, foram respectivamente 10 e 5 mg/l, sendo o PBA significativamente mais efetivo do que o BA. Esses mesmos autores também citam que, de modo contrário, a auxina não é essencial no meio de cultura para a produção de brotos, embora a utilização de baixas concentrações de AIA (0,1 mg/l) ou AIB (0,05 mg/l) tenham estimulado um pouco mais a produção destas brotações quando comparados com nenhuma auxina. No entanto, quando estas concentrações foram aumentadas para 0,5 e 0,1 mg/l de AIA e AIB respectivamente, a formação de brotos foi inibida.

Mais recentemente, ARELLO et alii (1991) conseguiram a regeneração de brotos a partir do cultivo "in vitro" de capítulos, para as cultivares Appel Bloesen e Marleen. Segundo os autores, melhores resultados foram conseguidos com o uso do MS adicionado de 2,0 mg/l de BAP e 0,5 mg/l de AIA.

E importante ressaltar que o sucesso da utilização do

capítulo como explante inicial para estabelecer a cultura de gerbera "in vitro", depende, principalmente, da cultivar considerada e da concentração de reguladores de crescimento utilizada, entre outros fatores (PIERIK et alii, 1975; PIERIK et alii, 1979; SITBON, 1981; CAPPADOCIA et alii, 1987; MEYNET, 1983 e PIERIK et alii, 1982).

Utilizando pedaços de folhas de gerbera, cultivar Vulcan, HEDTRICH (1979) conseguiu a regeneração de gemas adventícias em meio MS contendo BAP (1 mg/l) e GA₃ (0,1 mg/l).

Devido a impossibilidade das cultivares de flores amarelas formarem brotos a partir do cultivo "in vitro" de capítulos, CHU & HUANG (1983) desenvolveram uma nova metodologia que consiste em cultivar "in vitro" pedaços dos talos das flores, também referidos como escapo. Conseguiram após dezesseis semanas de cultivo a formação de cinco ou mais brotos por escapo. Para tanto empregaram também a citocinina BA (10 mg/l) em meio contendo metade das concentrações dos macroelementos do MS, mais os adicionais orgânicos e os microelementos do meio Heller.

A obtenção de brotos, para posterior propagação "in vitro", pode ser feita também com o cultivo de meristemas. As primeiras tentativas neste sentido foram feitas por MURASHIGE et alii (1974) utilizando os seguintes reguladores de crescimento: KIN (1 mg/l) e AIA (2 mg/l), em meio MS suplementado com sulfato de adenina (80 mg/l) e tirosina (100 mg/l). Segundo os autores, meristemas não podem ser rotineiramente utilizados devido a alta frequência de contaminação por microorganismos, superior a 80%. A utilização de desinfestantes convencionais não foi satisfatória, sendo acompanhado por frequente morte dos explantes

para os tratamentos onde foram empregadas concentrações mais elevadas desses produtos.

Utilizando-se desta mesma metodologia, e empregando uma concentração mais elevada da citocinina KIN (7 mg/l) e AIA (0,2 mg/l), PETRU & MATOUS (1984) conseguiram também obter com sucesso alguns brotos desenvolvidos à partir de meristemas. Este sucesso foi alcançado também por HUANG & CHU (1985) utilizando metade das concentrações dos nutrientes do MS suplementados com BA (5 mg/l) e AIA (0,1 mg/l).

Sucesso maior, foi alcançado por RUFFONI et alii (1987), onde estes autores desenvolveram uma metodologia para obtenção dos explantes meristemáticos, pela qual tornou possível a propagação clonal em escala comercial. A metodologia consiste no pré-tratamento das plantas matrizes com bactericida e fungicidas. As brotações regeneradas serão fornecedoras dos meristemas, que por sua vez, apresentarão-se com alta qualidade fitossanitária.

2.2. Multiplicação de brotos

A micropropagação é uma das principais aplicações da cultura de tecidos, especialmente para aquelas plantas que, por métodos convencionais, não atendem à demanda de mudas, como é o caso da gerbera.

Uma das maneiras que pode ser conduzida a propagação vegetativa "in vitro" de uma determinada espécie, é pela multiplicação de brotações através de sucessivas subculturas, ou seja, as gemas axilares são estimuladas a crescerem formando

tufos de brotos, os quais são subdivididos dando origem a novos explantes, que por sua vez repetem o mesmo processo.

Segundo PIERIK et alii (1982) é fundamental a utilização de citocinina no meio de cultura para obter ótimas taxas de multiplicação. No entanto, a escolha da citocinina e da concentração a ser utilizada, dependerá da cultivar considerada. Assim, a partir do cultivo "in vitro" de meristemas, MURASHIGE et alii (1974) regeneraram brotações e essas foram subculturadas em meio MS suplementado com KIN (10 mg/l) e AIA (0,5 mg/l). Observaram também, que um progressivo aumento do número de divisões por cultura foi associado com o incremento de KIN no meio de cultivo, até a concentração de 10 mg/l. Esses mesmos autores ressaltam que não é necessária a utilização da auxina em associação com a citocinina, no meio de multiplicação, embora a concentração de 0,5 mg/l de AIA tenha sido selecionada e incluída nesta mesma fase. Isto porque, a utilização do AIA parece aumentar o vigor das plântulas. De maneira contrária, LALIBERTE et alii (1985) acreditam que o vigor dos brotos observado em seus estudos, os quais dobraram de tamanho quando comparados com o controle, seja resultante da adição ao meio MS de sulfato de adenina (80 mg/l) e ou tirosina (100 mg/l), que por sua vez apresentam efeitos similares.

E oportuno observar que o meio de cultura utilizado por MURASHIGE et alii (1974), apresentava o sulfato de adenina e tirosina nas mesmas concentrações utilizadas por LALIBERTE et alii (1985), bem como os componentes orgânicos: tiamina-HCl, mio-inositol, ácido nicotínico e bifosfato de sódio. No

entanto, LALIBERTE et alii (1985) citam que a presença no meio de cultura desses mesmos componentes orgânicos, não apresenta nenhum efeito positivo na proliferação de brotos. Este fato também foi observado por SCOZEK & HEMPEL (1988), concluindo que a taxa de multiplicação de brotos não depende da concentração e presença desses aditivos orgânicos e ressaltam ainda, a importância de reduzir os custos de um laboratório de produção de mudas, empregando menor quantidade dos mesmos.

Trabalhando com as cultivares Mardi Gras e Pastourelle, LALIBERTE et alii (1985) obtiveram melhores resultados durante a fase de multiplicação, utilizando a BA (2 mg/l) associada ao AIA (0,1 mg/l). Associando também uma auxina com uma citocinina, KIN (7 mg/l) e AIA (0,2 mg/l), PETRU & MATOUS (1984) conseguiram melhores resultados para a cultivar Lada. Empregando somente a citocinina KIN, SCHIVA et alii (1982) obtiveram melhor taxa de multiplicação com 2 e 10 mg/l para as cultivares Peter e Tunisia, respectivamente. Em estudos com a cultivar Marleen, HEMPEL et alii (1985) conseguiram ótima taxa de multiplicação de brotos utilizando também, somente a KIN (5 mg/l).

Avaliando o efeito da KIN (1,5 e 10 mg/l) na produção de brotações axilares de dez cultivares de gerbera, PIERIK et alii (1982) observaram que o nível de KIN requerido por cada cultivar para produção ótima de brotos foi variável. Outro fato observado, ocorrido para algumas cultivares quando utilizaram concentrações mais elevadas de KIN (5 e 10 mg/l), foi a deformação de folhas e formação de calos na base dos brotos. Isto mostra a importância de considerar-se, no momento da avaliação experimental, os parâmetros qualitativos juntamente

com os quantitativos.

Para obter máxima eficiência na taxa de multiplicação de gerbera "in vitro" é necessário que se determine um período de passagem para que seja feita uma nova subcultura. Desta forma, MURASHIGE et alii (1974) determinaram como padrão o período de quatro semanas. Esses autores observaram também que com mais de nove semanas de cultivo, os tecidos apresentam claramente perda de vigor e deterioração.

2.3. Enraizamento de brotos

A última etapa a ser vencida para se ter êxito em um programa de micropropagação em grande escala é a indução de raízes e aclimação das plântulas após a transferência para o solo.

Estudos pioneiros para determinar os fatores que afetam a formação de raízes em gerbera, foram feitos por PIERIK & SEGERS (1973). Estes autores, testando os fatores: concentração de sais e reguladores de crescimento, conseguiram induzir a formação de raízes, utilizando como explante inicial, nervuras de folhas jovens de gerbera.

MURASHIGE et alii (1974) obtiveram plântulas "in vitro" de gerbera através da cultura de meristemas. O fator nível de auxina no meio foi estudado no enraizamento "in vitro" desses brotos. Os melhores resultados foram obtidos com os níveis mais elevados de AIA, 3 e 10 mg/l com 90 e 100 % de plântulas

enraizadas, respectivamente. Da mesma forma, PETRU & MATOUS (1984) obtiveram resultados similares aos de MURASHIGE et alii (1974), no que diz respeito ao enraizamento com níveis mais elevados da auxina AIA (8 mg/l).

Utilizando-se da mesma técnica empregada por MURASHIGE et alii (1974) para obtenção de brotações "in vitro", HUANG & CHU (1985) conseguiram o enraizamento "in vivo" dessas brotações, tratando-as com AIB na concentração de 0,1 %. Assim, evita-se mais uma fase de cultivo "in vitro", reduzindo os custos operacionais de um laboratório comercial de produção de mudas.

LALIBERTE et alii (1985) utilizando capítulos jovens como explante para início de cultura, obtiveram "in vitro", brotações de duas cultivares de gerbera. Ambos os clones apresentaram 100 % de enraizamento em todas as concentrações de AIA (0,00 ; 0,05 ; 0,10 ; 0,30; 0,50 e 1,00 mg/l) estudadas.

De outra maneira, empregando a citocinina BA (1,25 mg/l), HEMPEL et alii (1985) conseguiram induzir raízes nas brotações micropropagadas "in vitro".

Comparando o efeito de duas auxinas no enraizamento "in vitro" das cultivares Fleur e Florence, PIERIK & SPRENKELS (1984) utilizaram o meio MS suplementado com AIA nas concentrações variando de 3 a 10 mg/l e ANA a 1 ou 3 mg/l. Observaram que o ANA proporcionou 100 % de enraizamento, com mais raízes por broto, para ambas as cultivares, em comparação com o efeito do AIA. Altos percentuais de brotos enraizados foram alcançados também com o emprego do AIA, porém este não apresentou diferença significativa no enraizamento em comparação com o tratamento sem auxina.

3. MATERIAL E METODOS

Os trabalhos foram desenvolvidos durante o ano de 1990 e 1991 no Laboratório de Cultura de Tecidos do Departamento de Agricultura da Escola Superior de Agricultura de Lavras - ESAL, Minas Gerais, utilizando a cultivar Appelbloesem de Gerbera jamesonii Bolus ex Hook.

Os ensaios foram realizados "in vitro" e subdivididos em três fases: 1) Estabelecimento da cultura, 2) Multiplicação de brotos e 3) Enraizamento de brotos. Os meios de cultura tiveram o pH aferido para 5,8 antes do processo de autoclavagem (120°C - 1 atm - 20 minutos) e solidificados com 0,7% de ágar (AGAR - AGAR - Vetec Química e Representação Ltda). As culturas foram colocadas para desenvolver em sala de crescimento, nas seguintes condições: fotoperíodo de 16 horas sob luz branca fria (2500 lux) e temperatura de 26°C \pm 1°. Usou-se o delineamento inteiramente casualizado. As análises estatísticas foram feitas de acordo com o modelo matemático apropriado para este delineamento, aplicando-se o teste tukey a 5 % de probabilidade para comparação das médias das variáveis não quantitativas. Para as variáveis quantitativas os resultados foram apresentados em gráficos determinados por equação de regressão.

Para efeito de análise estatística, os dados referentes aos parâmetros avaliados (diâmetro do capítulo desenvolvido e

número de brotos), para os ensaios das fases de estabelecimento e multiplicação, foram transformados em $\sqrt{x+0,5}$. Cada repetição foi representada pela média de 4 tubos de ensaio (25 x 150 mm) com um explante cada.

Entende-se pelo termo, capítulo desenvolvido, o desenvolvimento dos capítulos jovens estabelecidos "in vitro" resultante da ocorrência de calos e do entumescimento e crescimento de partes florais.

3.1. Fase de estabelecimento da cultura

As plantas foram selecionadas em viveiro, segundo o vigor vegetativo e exuberância de flores. Procedeu-se a coleta dos explantes iniciais, os quais, constituíram-se de inflorescências jovens (capítulos), fechadas, com diâmetro variando de 0,5 a 0,7 cm.

Após a coleta dos explantes, estes foram desinfestados em câmara de fluxo laminar com álcool 70 % durante dois minutos e em seguida, com solução de hipoclorito de sódio a 1,5 % durante vinte minutos. Posteriormente, todos os capítulos foram lavados sucessivas vezes em água destilada autoclavada.

Com auxílio de pinças e bisturis, dividiu-se cada explante em, no máximo, quatro pedaços menores, os quais foram inoculados separadamente em tubos de ensaio contendo meio MS suplementado com tirosina (100 mg/l) e adenina (80 mg/l). Foram também acrescentados os seguintes reguladores de crescimento em esquema fatorial (4 x 4), nos níveis: 0,0 - 3,0 - 6,0 e 9,0 mg/l de BAP

e 0,0 - 1,0 - 2,0 e 3,0 mg/l de AIA. O segundo ensaio foi em esquema fatorial (3 x 3) utilizando o meio MS suplementado com adenina e tirosina nas mesmas concentrações empregadas anteriormente, porém acrescido da dosagem de 6 mg/l de BAP. Os níveis dos fatores foram: 0,0 - 1,0 e 2,0 mg/l de AIA e 0,0 - 5,0 e 10,0 mg/l de 2,4-D. Os tratamentos para ambos os ensaios realizados foram constituídos de três repetições.

As avaliações foram feitas aos quarenta dias após a inoculação observando-se o número de brotos adventícios regenerados por explante, a formação de calos e o desenvolvimento dos tecidos estabelecidos "in vitro".

3.2. Fase de Multiplicação

Brotações adventícias obtidas a partir do cultivo "in vitro" de capítulos jovens, foram multiplicadas por várias vezes até que fosse atingido uma quantidade suficiente para instalação do primeiro ensaio de multiplicação. Para tanto empregou-se a metodologia descrita por MURASHIGE et alii (1974), utilizando o meio MS suplementado com KIN (5 mg/l) e AIA (0,5 mg/l).

Para esta fase os explantes iniciais constituíram-se de brotações com 3 folhas.

O meio de cultura utilizado no primeiro ensaio de multiplicação foi o MS, suplementado com adenina (80 mg/l) e tirosina (100 mg/l). Foram também acrescentados os reguladores

de crescimento BAP e AIA, num fatorial 5 X 4, onde os fatores foram constituídos pelos reguladores de crescimento e os respectivos níveis pelas dosagens: 0,0 - 0,5 - 1,0 - 2,0 e 4,0 mg/l de BAP e 0,0 - 0,25 - 0,5 e 1,0 mg/l de AIA.

O segundo ensaio foi realizado para verificar o efeito da adenina e tirosina sobre a taxa de multiplicação de brotações axilares. Empregou-se o meio MS suplementado com o nível ótimo de 2,27 mg/l de BAP determinado no primeiro ensaio. As concentrações de adenina e tirosina utilizadas foram respectivamente, 80 e 100 mg/l, e os tratamentos, num total de quatro, foram os seguintes: 1 - adenina, 2 - tirosina, 3 - adenina e tirosina e 4 - testemunha.

Com a finalidade de avaliar o efeito da concentração dos sais do MS sobre a taxa de multiplicação dos brotos, foi realizado um terceiro ensaio. O meio de cultura foi suplementado com adenina e tirosina, a 80 e 100 mg/l respectivamente, e 2,27 mg/l de BAP. As quatro concentrações avaliadas foram: 100 % - 75 % - 50 % e 25 % dos sais do MS.

Os tratamentos referentes aos três ensaios foram constituídos por quatro repetições.

A avaliação foi feita trinta dias após a inoculação levando-se em consideração o número médio de brotos com três folhas e comprimento maior do que 1 cm por explante inicial.

Foram feitas também outras observações para o experimento BAP x AIA, aos dez, vinte, quarenta, cinquenta e sessenta dias após a inoculação, para o tratamento que apresentou a melhor taxa de multiplicação, com a finalidade de definir um período de passagem para que se possa fazer novo subcultivo.

3.3. Fase de Enraizamento

Os explantes utilizados constituíram-se de brotações micropropagadas da cultivar Appelbloesem em meio MS com a metade das concentrações dos sais, suplementado com 2,27 mg/l de BAP, 100 mg/l de tirosina e 80 mg/l de adenina. Os explantes apresentando em média, 3 a 4 folhas e comprimento de 3 a 4 cm, foram transferidos para tubos de ensaio contendo meio de cultura suplementado com todas as combinações possíveis de quatro concentrações dos sais do MS (100 % - 50 % - 25 % e 12,5 %) e cinco níveis de AIA (0,0 - 0,5 - 1,0 - 2,0 e 4,0 mg/l). Para o outro ensaio empregou-se o mesmo meio de cultura utilizado anteriormente e suplementado com as combinações em esquema fatorial (4 x 5) dos sais do MS (100 % - 50 % - 25 % e 12,5 %) e dos níveis de ANA (0,0 - 0,5 - 1,0 - 2,0 e 5,0 mg/l).

A avaliação foi feita aos trinta dias após a inoculação levando-se em consideração a percentagem de plântulas enraizadas, bem como a qualidade (vigor) das plântulas. Esta qualidade foi definida como muda boa, média e ruim, caracterizadas em função do: pecíolo longo e com um aumento significativo da superfície foliar das novas folhas originadas nesta fase de enraizamento.

4. RESULTADOS E DISCUSSAO

4.1. Fase de Estabelecimento

O método de esterilização dos capítulos jovens empregado neste trabalho apresentou eficiência de 75 %, sendo os agentes contaminantes, bactérias e fungos. A proximidade dos capítulos jovens do solo, por ocasião da coleta, pode justificar este índice de contaminação. Desta forma, testes mais rigorosos de descontaminação devem ser feitos para o material já coletado, bem como, adaptar-se uma metodologia que garanta uma certa descontaminação do material ainda no campo, isto é, antes da coleta, quando as inflorescências estiverem na planta mãe.

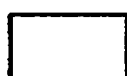
Observa-se nos quadros 1 e 2 o desenvolvimento dos capítulos estabelecidos "in vitro" em todos os tratamentos com exceção da testemunha (reguladores de crescimento ausentes) no quadro 1. Esse desenvolvimento foi resultante da ocorrência de calos e do entumescimento e crescimento de partes florais do capítulo, tais como estames e pistilos.

Considerando-se o diâmetro médio dos capítulos desenvolvidos "in vitro", a análise de variância para o experimento BAP x AIA, mostrou efeito significativo somente para o fator BAP (Quadro 3) e para o experimento AIA x 2,4-D, houve

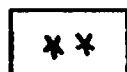
QUADRO 1 - Representação qualitativa da resposta morfogênética observada no cultivo "in vitro" de capítulos jovens de Gerbera jamesonii Bolus ex Hook cv. Appelbloesem em diferentes concentrações de BAP e AIA. ESAL, Lavras/MG, 1991.

BAP \ AIA	0	3	6	9
0		xx □□ oo	xx oo	xx □□ oo
1	xx ●●	xx oo	xx oo	xx oo
2	xx ●●	xx oo	xx oo	xx oo
3	xx ●●	xx oo	xx oo	xx oo

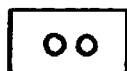
BAP e AIA - mg/l



Ausência de resposta



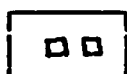
Capitulum desenvolvido (diâmetro maior que 1,5cm) = calo + entumescimento de partes florais



Coloração clara



Coloração escura



Regeneração de broto

QUADRO 2 - Representação qualitativa da resposta morfogênica observada no cultivo "in vitro" de capítulos jovens de Gerbera jamesonii Bolus ex Hook cv. Appelbloesem em meio MS suplementado com 6 mg/l de BAP para as diferentes concentrações de 2,4-D e AIA. ESAL, Lavras/MG, 1991.

2,4-D \ AIA	0	1	2
0	** □□ ○○	** ○○	** ○○
5	** ●●	** ●●	** ●●
10	** ●●	** ●●	** ●●

2,4-D e AIA - mg/l

**

Capítulo desenvolvido = calo + entumescimento de partes florais

○○

Coloração clara, tecido firme, diâmetro maior 1,5 cm

●●

Coloração escura, tecido friável, diâmetro menor que 1,5 cm

□□

Regeneração de broto adventício

QUADRO 3 - Resumo da análise de variância e regressão para diâmetro médio dos capítulos desenvolvidos "in vitro" de Gerbera jamesonii Bolus ex Hook cv. Appelbloesem, nos diferentes níveis de BAP e AIA empregados. ESAL, Lavras/MG, 1991.

Causas da variação	Gl	Quadrados médios e significância ^{1/}
BAP	(3)	0,814 **
.Linear	1	1,384 **
.Quadrática	1	0,878 **
.Cúbica	1	0,177 **
AIA	3	0,006
BAP x AIA	9	0,002
Resíduo	32	0,012
 C.V. (%)		 7,58

^{1/} Dados transformados em $\sqrt{x + 0,5}$

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade

significância apenas para 2,4-D (Quadro 4).

De modo geral verifica-se que os melhores resultados quanto ao diâmetro médio dos capítulos desenvolvidos foram conseguidos com o emprego de BAP na ausência de 2,4-D e independentemente do nível de AIA utilizado (Quadro 3 e Figura 1). O nível ótimo de BAP obtido através da equação de regressão foi de 6,16 mg/l. Estes resultados assemelham-se com as recomendações de PIERIK et alii (1982) que sugerem o uso de 10 mg/l de BAP e ausência total de auxina AIA para otimizar a produção de calos e desenvolvimento dos capítulos.

A presença de 2,4-D não proporcionou resultados positivos quanto ao desenvolvimento dos tecidos, observando-se, pela Figura 2 uma redução significativa para o diâmetro médio dos capítulos desenvolvidos, nas dosagens de 5 e 10 mg/l de 2,4-D. O efeito negativo desta auxina em relação ao cultivo "in vitro" dos capítulos jovens pode ser observado também no Quadro 2.

Praticamente todos os tratamentos evidenciaram a presença de calos, exceto na ausência dos reguladores de crescimento (Quadro 1 e 2). Uma das respostas mais comuns de um tecido cultivado "in vitro" é a formação de um calo, ou seja, de uma massa de células de proliferação contínua e mais ou menos desordenada. É importante ressaltar que, paralelamente à ocorrência dos calos, houve o entumescimento e crescimento de partes florais do capítulo e que em uma análise apenas visual, não foi possível definir se a formação de calos ficou restrita às regiões seccionadas do explante ou se também

QUADRO 4 - Resumo da análise de variância e regressão para diâmetro médio dos capítulos desenvolvidos "in vitro" de Gerbera jamesonii Bolus ex Hook cv. Appelbloesem em meio MS suplementado com 6 mg/l de BAP e com diferentes níveis de 2,4-D e AIA. ESAL, Lavras/MG, 1991.

Causas da variação	Gl	Quadrados médios e significância 1/
2,4-D	(2)	0,684 **
.Linear	1	1,212 **
.Quadrática	1	0,151 **
AIA	2	0,004
2,4-D x AIA	4	0,030
Resíduo	18	0,011
C.V. (%)		8,86

1/ Dados transformados em $\sqrt{x + 0,5}$

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade

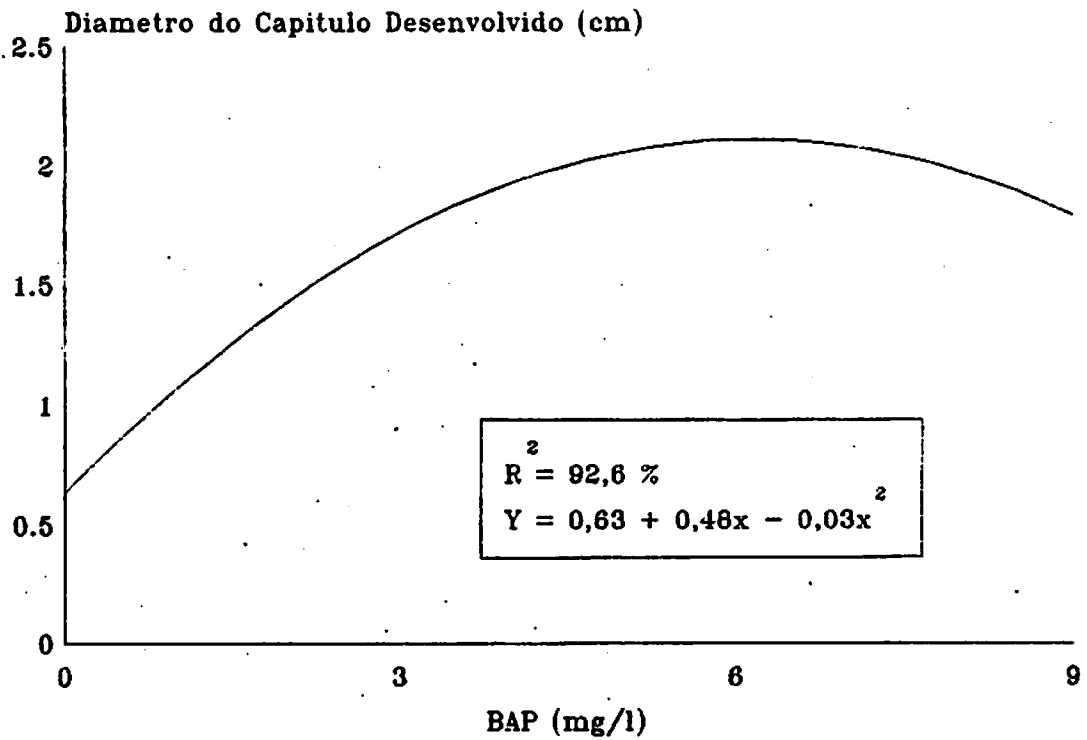


FIGURA 1 - Efeito do BAP sobre o diâmetro dos capítulos desenvolvidos "in vitro" de Gerbera jamesonii Bolus ex Hook cv. Appelbloesem. ESAL, Lavras/MG, 1991.

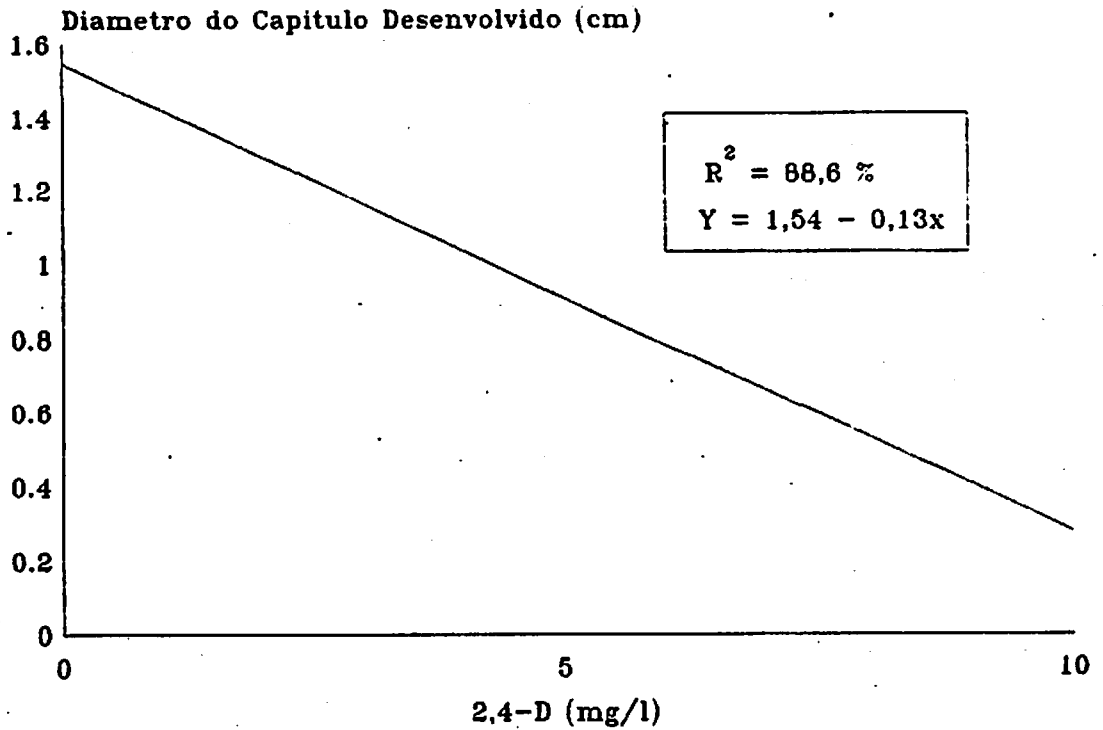


FIGURA 2 - Efeito do 2,4-D sobre o diâmetro dos capítulos desenvolvidos "in vitro" de Gerbera jamesonii Bolus ex Hook cv. Appelbloesem em meio MS suplementado com 6 mg/l de BAP. ESAL, Lavras/MG, 1991.

ocorreu uma proliferação celular nas zonas meristemáticas das inflorescências. Desta forma, estudos histológicos deverão ser conduzidos de maneira a elucidar os processos de diferenciação decorrentes do cultivo "in vitro" de capítulos jovens. É oportuno observar, que o processo de organogênese origina-se a partir de zonas de atividade meristemática em tecido de calo e, também, nos explantes primários, onde as divisões celulares e o padrão de diferenciação podem ocorrer de maneira que conduza a um grau de organização morfo-anatômica peculiar, que no caso caracterizará um órgão definido.

A regeneração de brotos adventícios ocorreu somente nos tratamentos com 3, 6 e 9 mg/l de BAP na ausência de AIA e 2,4-D (Quadro 1 e 2), sendo que para o nível 3 mg/l de BAP foram regeneradas em média, 2 plântulas por explante, para o nível de 6 mg/l de BAP, 3 plântulas e para o nível de 9 mg/l de BAP, 1 plântula. Coincidentemente a regeneração de brotos adventícios ocorreu nos tratamentos que proporcionaram melhores resultados quanto ao desenvolvimento dos tecidos, considerando-se os aspectos qualitativos e quantitativos (Quadros 1 e 2 e Figura 1). De maneira semelhante, PIERIK et alii (1975) conseguiram obter um ou dois brotos por capítulo, utilizando também um quarto da inflorescência jovem como explante.

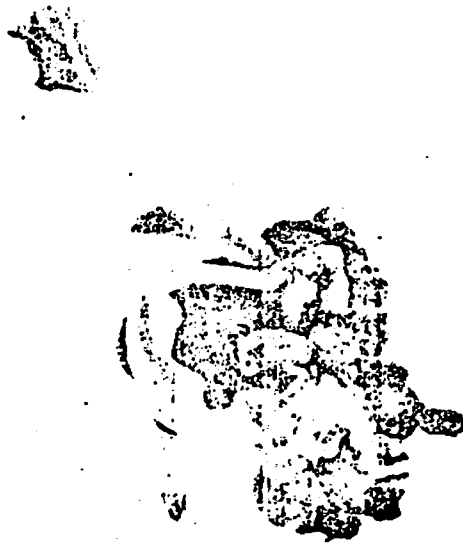
O local de origem dessas brotações não está bem definido, pois, segundo LALIBERTE et alii (1985), elas tanto podem ter se originado por reorientação de tecidos meristemáticos das inflorescências, bem como do tecido do receptáculo floral. De outra forma, AHMIN & VIETH (1986),

CAPPADOCIA et alii (1987) e SITBON (1981) acreditam que em determinadas ocasiões, a regeneração dessas plântulas ocorre em calos que se formam a partir de óvulos imaturos e que portanto, tais plântulas podem ser consideradas haplóides. Por outro lado, PIERIK et alii (1982) concluíram que os altos níveis de citocinina, BA (10 e 20 mg/l) e KIN (10 mg/l), podem induzir a deformação de folhas e aumentar a formação de calos em certas cultivares. Esses autores também recomendam que a formação de calos e regeneração de brotações adventícias a partir desses calos deve ser evitada, pois estes são fontes potenciais de mutações.

Um maior detalhe da regeneração de um broto adventício a partir do cultivo "in vitro" de capítulos pode ser observado na figura 3.

É importante ressaltar que MURASHIGE et alii (1974) já haviam estabelecido a cultura de calos de *Gerbera* "in vitro". Entretanto, estas culturas foram abandonadas após numerosas tentativas, visto que a organogênese ocorreu de forma inconstante e em pequeno número.

Sabe-se que o processo morfogenético é resultante da divisão e diferenciação celular organizadas, com padrões definidos, e que dependem, basicamente, da atividade e expressão de certos genes. Assim, os fatores que afetam esses eventos são variados e interagem de diversas formas, sendo quase que impossível caracterizar um único fator específico para cada fenômeno morfogenético. De maneira semelhante, RAMALHO et alii (1990) citam em seu livro que a principal dificuldade da cultura de tecidos é identificar para cada espécie, qual o meio de



01

FIGURA 3 - Broto adventício regenerado a partir do cultivo "in vitro" de capítulo jovem. ESAL, Lavras/MG, 1991.

cultura mais apropriado para que ocorra a divisão celular e sobretudo para "ligar" e "desligar" os genes no momento e no local apropriado, visando a diferenciação celular e, conseqüentemente, a obtenção de uma planta idêntica àquela de onde a célula ou o conjunto de células foi retirado.

Em cultura de tecidos, os fatores físicos tais como, o estado físico do meio, o pH, o tamanho do frasco, a temperatura, a luz, entre outros, interferem nos processos organogênicos. Entretanto os principais fatores que controlam a morfogênese são os fitoreguladores, particularmente o balanço auxina/citocinina no meio de cultura, fato estabelecido no clássico trabalho de SKOOG & MILLER (1957). Esses autores verificaram que tal balanço, convenientemente manipulado, induzia em calos originados da medula de fumo, raízes, gemas caulinares ou apenas mais tecido de calo.

Os efeitos isolados ou sinérgicos dos fatores que controlam a organogênese, 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 principalmente para uma dada condição fisiológica de momento, citando-se para este último caso, como exemplo, o trabalho de CAPPADOCIA et alii (1987). Esses autores avaliaram a produção de haplóides de Gerbera jamesonii por cultura "in vitro" de óvulos, obtidos de plantas floridas em dois períodos distintos, outono e primavera. Em conclusão, observaram que o período de coleta das inflorescências aliado a uma dada condição fisiológica da planta doadora, foram os principais fatores que afetaram tanto a frequência de formação de calos quanto a capacidade

morfogenética destes calos.

Os dados obtidos confirmam as afirmações anteriores de PIERIK et alii (1975), onde citam que é essencial a presença de citocinina no meio de cultura para a formação de brotos a partir do capítulo. Os autores empregaram níveis mais elevados das citocininas, 10 mg/l de PBA e 5 mg/l de BA, sendo o PBA significativamente mais eficiente do que o BA para a regeneração dos brotos adventícios. Resultados semelhantes, foram obtidos por PIERIK et alii (1982), onde, trabalhando com quinze cultivares de gerbera, conseguiram melhores resultados no cultivo "in vitro" de capítulos para produção de brotos adventícios, empregando o meio MS e concentrações mais elevadas de BA (5, 10 e 20 mg/l).

O AIA não apresentou efeito significativo para o diâmetro médio dos capítulos desenvolvidos (Quadro 3 e 4), ressaltando também que a regeneração de brotos adventícios ocorreu nos tratamentos onde esta auxina estava ausente (Quadro 1 e 2). Esses resultados concordam em parte com as afirmações de PIERIK et alii (1975), onde estes autores citam que a auxina não é essencial para a produção de brotos, embora a utilização de baixas concentrações de AIA (0,1 mg/l) ou AIB (0,05 mg/l) tenham estimulado um pouco mais a produção dessas brotações em comparação com nenhuma auxina. Entretanto quando esses níveis foram elevados para 0,5 e 0,1 mg/l de AIA e AIB respectivamente, a formação de brotos foi inibida. Por outro lado, LALIBERTE et alii (1985), trabalhando com as cultivares Pastourelle e Mardi Gras, conseguiram melhores resultados no cultivo "in vitro" de capítulos para produção de brotos, utilizando o meio MS suplementado com níveis mais baixos de BA, 1 ou 2 mg/l associados

à 0,1 mg/l de AIA. De maneira semelhante, ARELLO et alii (1991) cosegüiram para as variedades Appel Bloesen e Marleen, intenso desenvolvimento de calos com emissão de brotos a partir dos capítulos, em meio MS acrescido de 2,0 mg/l de BAP e 0,5 mg/l de AIA.

4.2. Fase de Multiplicação

Considerando o número médio de brotos com três folhas e comprimento maior do que 1 cm, a análise de variância mostrou significância ao nível de 1 % para o fator citocinina (BAP) e de 5 % para o fator auxina (AIA) (Quadro 5).

A figura 4 apresenta o efeito do BAP sobre o número de brotos obtidos "in vitro". Observa-se pela curva de regressão, um aumento no número de brotos até a concentração de 2,27 mg/l de BAP, obtida pela derivada da equação, totalizando um máximo de 3,64 brotos nesta concentração. De maneira contrária, níveis de citocinina superiores à 2,27 mg/l, não tiveram efeito no aumento do número de brotos.

Os dados obtidos concordam com a afirmação de PIERIK et alii (1982) de que é fundamental a utilização de citocinina no meio de cultura para obter ótimas taxas de multiplicação, no entanto, a escolha da citocinina e da concentração utilizada, dependerá da cultivar considerada. Há similaridade nas respostas obtidas por SCHIVA et alii (1982) que obtiveram melhor taxa de multiplicação com os níveis 2 e 10 mg/l de KIN

QUADRO 5 - Resumo da análise de variância e regressão para o número médio de brotos de Gerbera jamesonii Bolus ex Hook cv. Appelbloesem nos diferentes níveis de AIA e BAP empregados. ESAL, Lavras/MG, 1991.

Causas da variação	Gl	Quadrados médios e significância ^{1/}
AIA	(3)	0,077 *
.Linear	1	0,154 **
.Quadrática	1	0,002
.Cúbica	1	0,075 **
BAP	(4)	0,267 **
.Linear	1	0,112 *
.Quadrática	1	0,712 **
.Cúbica	1	0,229 **
BAP x AIA	12	0,017
Resíduo	40	0,018
C.V. (%)		7,29

^{1/} Dados transformados em $\sqrt{x + 0,5}$

* Significativo ao nível de 1% de probabilidade

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade

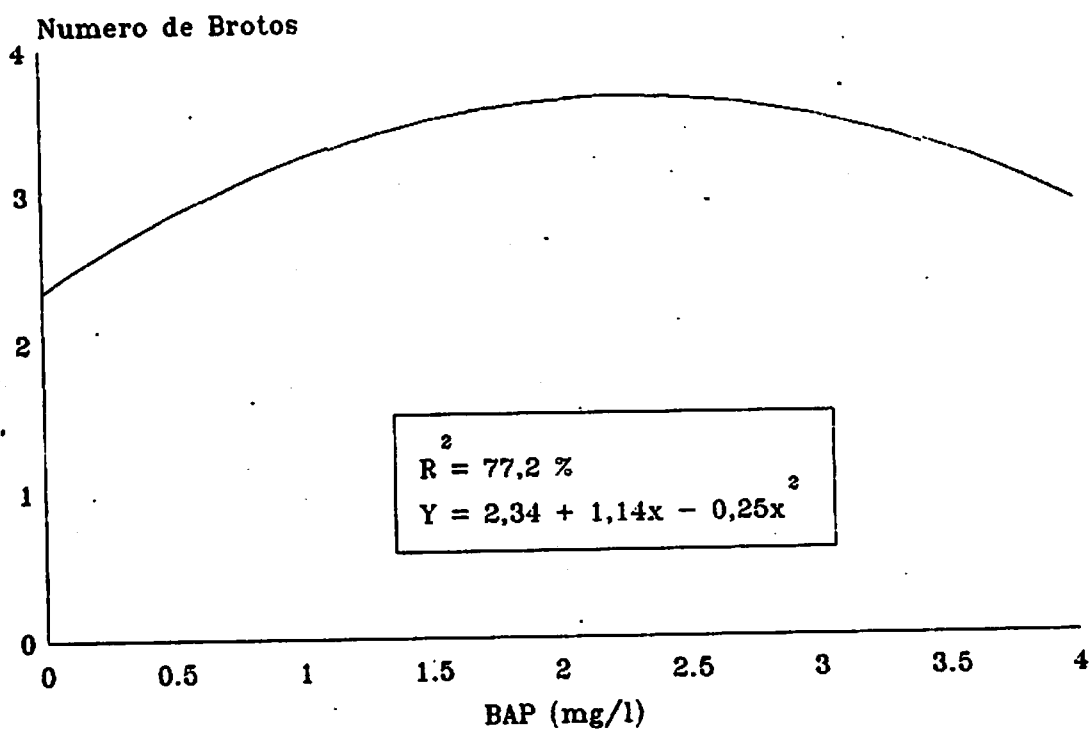


FIGURA 4 - Efeito do BAP sobre o número de brotos obtidos "in vitro" de Gerbera jamesonii Bolus ex Hook cv. Appelbloessem. ESAL, Lavras/MG, 1991.

para as cultivares Peter e Tunisia, respectivamente, e por HEMPEL et alii (1985), que conseguiram ótima taxa de multiplicação de brotos da cv. Marleen utilizando também somente a KIN (5 mg/l).

Por outro lado, LALIBERTE et alii (1985), trabalhando com as cultivares Mardi Gras e Pastourelle, obtiveram melhores taxas de multiplicação utilizando a citocinina BA (2 mg/l) associada à auxina AIA (0,1 mg/l). Empregando também conjuntamente uma auxina com uma citocinina, AIA (0,2 mg/l) e KIN (7,0 mg/l), PETRU & MATOUS (1984) conseguiram bons resultados na multiplicação da cultivar Lada.

Em termos gerais, observa-se pela figura 5, um ligeiro decréscimo para o número de brotos, com o aumento do nível de AIA até 1,0 mg/l. De modo semelhante MURASHIGE et alii (1974) concluíram, que não é necessário a utilização da auxina em associação com a citocinina no meio de multiplicação, embora a concentração de 0,5 mg/l de AIA tenha sido selecionada e incluída nesta mesma fase. Isto porque, esses autores acreditam que a presença do AIA parece aumentar o vigor das plântulas. De maneira contrária LALIBERTE et alii (1985) acreditam que esse vigor dos brotos, observado também nesse estudo, seja resultante da adição ao meio MS de sulfato de adenina (80 mg/l) e ou tirosina (100 mg/l), as quais por sua vez, apresentam efeitos similares. É oportuno observar que o meio de cultura utilizado por MURASHIGE et alii (1974), apresentava o sulfato de adenina e tirosina nas mesmas concentrações utilizadas por LALIBERTE et alii (1985).

Sabe-se que a adenina, usada também na forma de

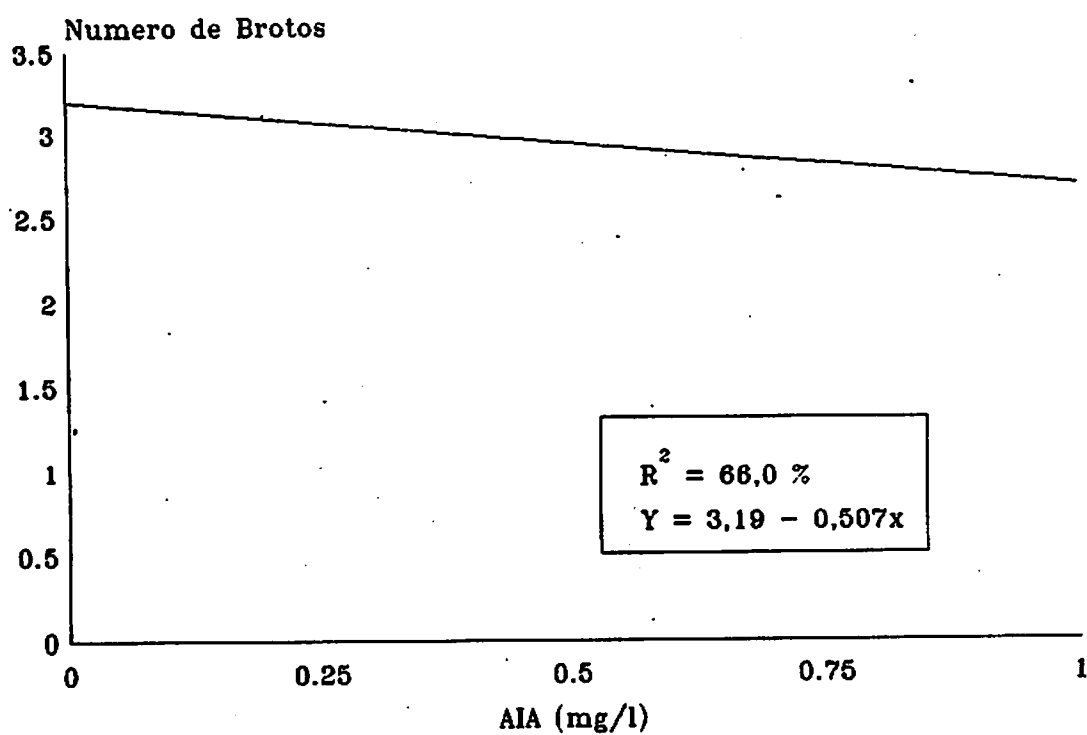


FIGURA 5 - Efeito do AIA sobre o número de brotos obtidos "in vitro" de Gerbera jamesonii Bolus ex Hook cv. Appelbloesem. ESAL, Lavras/MG, 1991.

sulfato de adenina, em algumas situações, pode apresentar um efeito de uma citocinina "fraca" ou pode haver uma interação com as próprias citocininas do meio beneficiando a taxa de multiplicação. Entretanto, observa-se pelos quadros 6 e 7 que o número médio de brotos não diferiram estatisticamente entre si para os diferentes tratamentos empregados com adenina e tirosina. Estes resultados confirmam as afirmações de LALIBERTE et alii (1985) e SCOZEK & HEMPEL (1988), onde a presença no meio de cultura destes mesmos componentes orgânicos não apresenta efeito positivo na proliferação de brotos no cultivo "in vitro" de gerbera.

Para os tratamentos sem a citocinina (BAP), foi observado 100 % de brotos enraizados nos diversos níveis de AIA utilizados. Outro fato a ser registrado é que o vigor dessas plântulas foi bem superior às brotações obtidas nos tratamentos com presença de BAP. Este maior vigor observado, pode ser definido como um aumento da superfície foliar das novas folhas com pecíolos longos e rígidos. De modo geral, podemos afirmar que o BAP mostrou-se necessário a multiplicação de brotos, promovendo a formação de grande número de brotos, em detrimento, porém, de seu desenvolvimento.

A concentração dos sais do MS que proporcionou a maior produção do número médio em 5,527 brotos por explante inicial, foi a de 50 %, não diferindo estatisticamente pelo teste tukey a 5 %, das concentrações de 100 e 75 % (Quadro 8 e 9). Estes resultados confirmam a utilização da metade das concentrações dos sais do MS, para a fase de multiplicação,

QUADRO 6 - Resumo da análise de variância para o número médio de brotos de Gerbera jamesonii Bolus ex Hook cv. Appelbloesem nos diferentes tratamentos com adenina e tirosina suplementado com 2,27 mg/l de BAP. ESAL, Lavras/MG, 1991.

Causas da variação	Gl	Quadrados médios e significância ^{1/}
Tratamento	3	0,039
Resíduo	12	0,101
C.V. (%)		15,29

^{1/} Dados transformados em $\sqrt{x + 0,5}$

QUADRO 7 - Número médio de brotos obtidos "in vitro" de Gerbera jamesonii Bolus ex Hook cv. Appelbloesem, para os diferentes tratamentos empregando-se o meio MS suplementado com 2,27 mg/l de BAP. ESAL, Lavras/MG, 1991.

TRATAMENTOS	NUMERO MEDIO DE BROTOS ^{1/}
Adenina (80 mg/l)	4,088 A
Tirosina (100 mg/l)	4,300 A
Adenina (80 mg/l) e Tirosina (100 mg/l)	3,365 A
Testemunha	3,793 A

^{1/} Dados transformados em $\sqrt{x + 0,5}$

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste tukey - 5 % .

QUADRO 8 - Resumo da análise de variância para o número médio de brotos de Gerbera jamesonii Bolus ex Hook cv. Appelbloesem nos diferentes tratamentos com as concentrações dos sais do MS suplementado com 2,27 mg/l de BAP. ESAL, Lavras/MG, 1991.

Causas da variação	G1	Quadrados médios e significância 1/
Tratamento	3	0,247 *
Resíduo	12	0,061
C.V. (%)		11,55

1/ Dados transformados em $\sqrt{x + 0,5}$

* Significativo ao nível de 5 % de probabilidade

QUADRO 9 - Número médio de brotos obtidos "in vitro" de Gerbera jamesonii Bolus ex Hook cv. Appelbloesem, para as diferentes concentrações de sais do MS suplementado com 2,27 mg/l de BAP. ESAL, Lavras/MG, 1991.

TRATAMENTOS	NÚMERO MEDIO DE BROTOS ^{1/}
100 % dos sais do MS	3,956 A B
75 % dos sais do MS	4,217 A B
50 % dos sais do MS	5,527 A
25 % dos sais do MS	2,923 B

^{1/} Dados transformados em $\sqrt{x + 0,5}$

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste tukey - 5 % .

por SCOZEK & HEMPEL (1988) e HUANG & CHU (1985). Desta forma, poderá ser adotado para a multiplicação "in vitro" da cultivar Appelbloesem, a utilização da metade da concentração dos sais do MS suplementado com 2,27 mg/l de BAP.

Houve leve formação de calos na parte basal dos explantes nos tratamentos onde a citocinina estava presente, entretanto, aparentemente estes calos não influenciaram de maneira significativa na multiplicação de brotos. PIERIK et alii (1982) ressaltam que, para determinadas cultivares, as concentrações mais elevadas de KIN (5 e 10 mg/l), resultam em intensa formação de calos na base dos brotos, podendo prejudicar a taxa de multiplicação.

Para obter máxima eficiência na taxa de multiplicação de gerbera "in vitro" é necessário que se determine um período de passagem para que seja feita uma nova subcultura. MURASHIGE et alii (1974) trabalhando com Gerbera jamesonii, determinaram como padrão o período de passagem de quatro semanas. Segundo GRATTAPAGLIA & MACHADO (1990), o período de incubação mais comum entre as repicagens para a maioria das plantas é de quatro semanas. Entretanto, este pode não ser o intervalo ideal para otimizar a taxa de multiplicação, a qual, os autores definem, como sendo o número de novos explantes produzidos por um explante, num certo período de tempo.

Com a finalidade de determinar o período de repicagem, foram feitas seis avaliações para o tratamento com o nível de 2,0 mg/l de BAP do experimento BAP x AIA, aos dez, vinte, trinta, quarenta, cinquenta e sessenta dias após a inoculação.

Escolheu-se o tratamento com 2,0 mg/l de BAP por este se aproximar do nível ótimo de 2,27 mg/l de BAP, determinado pela derivada da equação de regressão, no primeiro ensaio de multiplicação de brotos. Observa-se no quadro 10 que a análise de variância mostrou efeito significativo entre épocas de avaliação, ao nível de 1 % de probabilidade. Entretanto, baseado somente na determinação através da curva de regressão do número de dias ótimo que proporciona o máximo de número de brotos (Figura 6), podemos concluir erroneamente sobre o melhor período de repicagem. Ou seja, não podemos afirmar que os 39,36 dias determinado através da equação de regressão, com um máximo de 3,63 brotos, seja a época ideal para as subculturas. Portanto, uma repicagem a cada vinte dias com uma taxa média de 1:2,52 é melhor do que uma repicagem a cada 30 ou 39,36 dias com as taxas de 1:3,59 e 1:3,63, respectivamente. Neste caso, num período de 150 dias, o primeiro sistema produziria $2,52^{7,5}$ plantas, o que é aproximadamente igual a 1024, enquanto que o segundo e terceiro sistemas produziram apenas $3,59^5$ e $3,63^{3,81}$, o que é aproximadamente igual a 596 e 136 plantas respectivamente. É importante ressaltar que, as taxas médias de 2,52 e 3,59 brotos representam os dados originais não transformados.

Em uma análise apenas visual, observou-se claramente início de perda de vigor e deterioração das plântulas com períodos de incubação superiores aos cinquenta dias, intensificando mais aos sessenta dias. Este fato foi também registrado por MURASHIGE et alii (1974) onde os autores observaram que com mais de nove semanas de cultivo, os tecidos se deterioravam.



QUADRO 10 - Resumo da análise de variância e regressão para épocas de avaliação em função do número de brotos obtidos em meio MS com 2,27 mg/l de BAP, de Gerbera jamesonii Bolus ex Hook cv. Appelbloesem. ESAL, Lavras/MG, 1991.

Causas da variação	Gl	Quadrados médios e significância ^{1/}
Epoca	(5)	0,171 **
.Linear	1	0,233 *
.Quadrática	1	0,563 **
.Cúbica	1	0,014
Resíduo	14	0,028
C.V. (%)		9,22

^{1/} Dados transformados em $\sqrt{x + 0,5}$

* Significativo ao nível de 5 % de probabilidade

** Significativo ao nível de 1 % de probabilidade



TABLE 10 - Results of analysis of variance for treatment effects on the yield of wheat in the field. The analysis was conducted using the method of least squares. The results are given in the following table. The values in parentheses are the standard errors of the differences between the means.

Treatment	Yield (kg/ha)	Standard Error (S.E.)
Control	0.000	0.000
1	0.001	0.001
2	0.002	0.002
3	0.003	0.003
4	0.004	0.004
5	0.005	0.005
6	0.006	0.006
7	0.007	0.007
8	0.008	0.008
9	0.009	0.009
10	0.010	0.010
11	0.011	0.011
12	0.012	0.012
13	0.013	0.013
14	0.014	0.014
15	0.015	0.015
16	0.016	0.016
17	0.017	0.017
18	0.018	0.018
19	0.019	0.019
20	0.020	0.020

Standard error of the difference between the means = $\sqrt{2} \times \text{S.E.}$
 Significant at level of 5% or probability
 Significant at level of 1% or probability

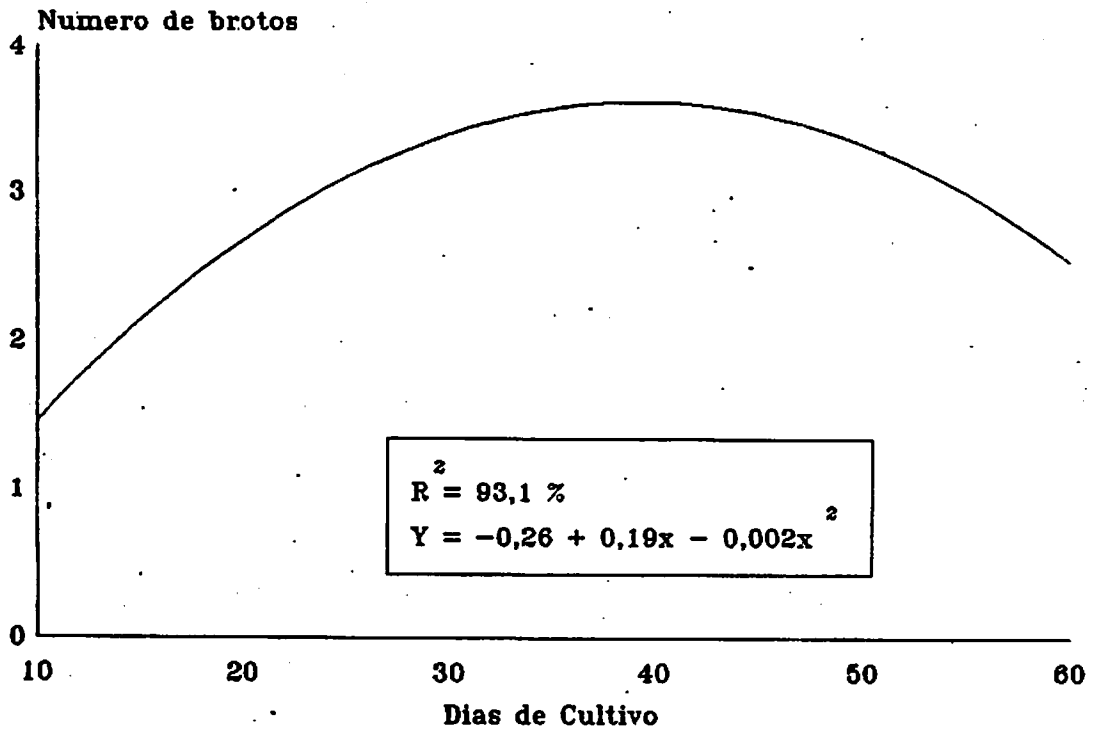


FIGURA 6 - Efeito da época de avaliação sobre o número de brotos obtidos "in vitro" de Gerbera jamesonii Bolus ex Hook cv. Appelbloesem em meio MS suplementado com 2,27 mg/l de BAP. ESAL, Lavras/MG, 1991.

4.3. Fase de Enraizamento

Observou-se a formação de raízes aos 40 dias após a inoculação obtendo-se 100 % de enraizamento em todos os tratamentos (Quadro 11 e 12). Da mesma forma, LALIBERTE et alii (1985), trabalhando com duas cultivares de gerbera, conseguiram 100 % de enraizamento dos brotos em todas as concentrações de AIA (0,00 - 0,05 - 0,10 - 0,30 - 0,50 e 1,00 mg/l) estudadas. Por outro lado, MURASHIGE et alii (1974) obtiveram 90 e 100 % de plântulas enraizadas somente com níveis mais elevados de AIA, 3 e 10 mg/l respectivamente. Esse resultado foi observado também por PETRU & MATOUS (1984) conseguindo com nível mais elevado de AIA (8 mg/l) 100 % de enraizamento.

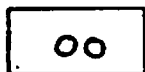
Houve intensa formação de calos na parte basal dos brotos, para os diferentes níveis de ANA empregados, originando-se dos calos, raízes de tamanho menor, mais espessas e em maior quantidade quando comparadas com a testemunha e com os níveis de AIA empregados. Para estes últimos, as raízes foram emitidas diretamente do explante na sua parte basal. Este fato pode ser constatado observando-se a figura 7 (4). Há similaridade nas respostas obtidas por PIERIK & SPRENKELS (1984) com as cultivares Fleur e Florence, utilizando o meio MS suplementado com AIA nas concentrações variando de 3 a 10 mg/l e ANA a 1 ou 3 mg/l. Esses autores observaram que o ANA proporcionou 100 % de enraizamento, com mais raízes por broto, para ambas as cultivares, em

QUADRO 11 - Representação qualitativa da resposta morfogênica observada no cultivo de brotações de Gerbera jamesonii Bolus ex Hook cv. Appelbloesem em diferentes concentrações de sais e níveis de AIA. ESAL, Lavras/MG, 1991.

AIA \ SAIS	0	0,5	1	2	4
100	oo	oo	oo	oo	oo
.50	oo	oo	oo	oo	oo
25	●●	●●	●●	●●	●●
12,5	□□	□□	□□	□□	□□

AIA - mg/l e SAIS - %

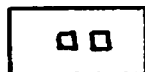
100 % de enraizamento em todos os tratamentos



Muda de qualidade boa



Muda de qualidade média



Muda de qualidade ruim

QUADRO 12 - Representação qualitativa da resposta morfofenética observada no cultivo de brotações de Gerbera jamesonii Bolus ex Hook cv. Appelbloesem em diferentes concentrações de sais e níveis de ANA. ESAL, Lavras/MG, 1991.

ANA \ SAIS	0	0,5	1	2	5
100	▲▲ □□	○○ ▲▲ ●●	○○ ▲▲ ●●	○○ ■■ ●●	○○ ■■ ●●
50	▲▲ □□	○○ ▲▲ ●●	○○ ■■ ●●	○○ ■■ ●●	○○ ■■ ●●
25	▲▲ □□	○○ ▲▲ ●●	○○ ▲▲ ●●	○○ ■■ ●●	○○ ■■ ●●
12,5	▲▲ □□	○○ ▲▲ ●●	○○ ▲▲ ●●	○○ ■■ ●●	○○ ■■ ●●

ANA - mg/l e SAIS - %

100 % de enraizamento em todos os tratamentos

○○	Raízes espessas e quebradiças
●●	Ocorrência de calos
□□	Raízes com ramificações
■■	Raízes com comprimento inferior a 1,5 cm
△△	Raízes com comp. intermediário a 1,5 e 2,5 cm
▲▲	Raízes com comprimento superior a 2,5 cm

comparação com o efeito do AIA, e que altos percentuais de brotos enraizados foram alcançados também com o emprego do AIA, porém este não apresentou diferença significativa no enraizamento em comparação com o tratamento sem auxina. De maneira semelhante, os resultados da Quadro 11 e 12 mostram que, para conseguir-se o enraizamento com sucesso da cultivar Appelbloesem pode-se empregar o meio MS com as concentrações dos sais reduzidas à metade, sem a necessidade de adicionar auxina.

O ANA, que resultou em intensa formação de calos, apresenta efeito inferior quando comparado com a eficiência do AIA para induzir raízes, como mostram os estudos feitos por PIERIK & SEGERS (1973), MURASHIGE et alii (1974), PETRU & MATOUS (1984) e PIERIK & SPRENKELS (1984), onde o uso do AIA no que tange ao enraizamento de brotações de gerbera, tem excelente efeito nas diversas concentrações em que é utilizado.

De outra forma, HUANG & CHU (1985), trabalhando com a auxina AIB, conseguiram taxa de enraizamento de 90 % em brotações maiores do que 2 cm de altura, oriundas da cultura de meristemas. Essas mudas foram tratadas com solução de AIB (0,1 %) por 30 segundos e colocadas para enraizar em canteiros de areia lavada sob constante nebulização. Da mesma forma, HEMPEL et alii (1985) conseguiram induzir raízes em brotações de gerbera utilizando a citocinina BA, obtendo um maior número de raízes com 1,25 mg/l, quando comparadas com concentrações mais altas do mesmo regulador de crescimento.



FIGURA 7 - Representação esquemática da micropropagação de Gerbera jamesonii Bolus ex Hook cv. Appelbloesem através de capitulos jovens. 1. Capitulos jovens. 2 e 3. Brotas axilares em fase de multiplicação. 4. Plântula enraizada pronta para aclimação.

A redução das concentrações dos sais do MS à 25% e 12,5% proporcionaram mudas de qualidade inferior (menor vigor), quando comparadas aos tratamentos que apresentavam as concentrações de 100% e 50% . Este vigor das plântulas foi caracterizado pelo aumento da superfície foliar das novas folhas, com pecíolos longos e rígidos. Os resultados obtidos por MURASHIGE et alii (1974) e LALIBERTE et alii (1985), foram semelhantes ao deste trabalho no que diz respeito ao vigor apresentado pelas plântulas.

A variação das concentrações dos sais não influenciou na porcentagem de enraizamento (Quadro 11 e 12). De maneira semelhante, PIERIK & SEGERS (1973) citam em seu trabalho que as concentrações diferentes dos sais do meio Heller, pouco influenciaram no enraizamento.

A utilização do sistema de propagação "in vitro" através do capítulos jovens e de brotações axilares e enraizamento posterior dessas plântulas, empregando concentrações ideais de reguladores de crescimento, determinadas experimentalmente, poderá contribuir de maneira alternativa para a produção comercial de gerbera com plantas idênticas e sadias.

4.4 Considerações finais

Empregou-se o método dos capítulos jovens neste trabalho pelo fato da disponibilidade dos explantes iniciais (capítulos jovens). Estes foram coletados em plantas adultas sem que as

mesmas fossem destruídas. É importante ressaltar que o método dos capítulos jovens é um sistema alternativo de propagação da Gerbera jamesonii. O método que é mais indicado para a propagação massal mais rápida é o que emprega meristemas, entretanto, este sistema, demanda um grande número de plantas adultas as quais serão destruídas para o fornecimento dos explantes iniciais.

5. CONCLUSÕES

5.1. Fase de Estabelecimento da Cultura

a) O BAP é essencial ao desenvolvimento "in vitro" dos capítulos e regeneração de plântulas da cultivar Appelbloesem especialmente nas concentrações de 3, 6 ou 9 mg/l de BAP.

b) O 2,4-D é prejudicial e o AIA não influencia a produção de brotos e desenvolvimento dos tecidos estabelecidos "in vitro".

5.2. Fase de Multiplicação

a) Maior taxa de multiplicação para a cultivar Appelbloesem pode ser obtida com o uso da metade das concentrações dos sais do MS e 2,27 mg/l de BAP, com período de subcultivo de até vinte dias.

b) Brotos enraizados são obtidos sem o uso de BAP.

c) A utilização de adenina ou tirosina não influencia a taxa de multiplicação para a cv. Appelbloesem.

5.3. Fase de Enraizamento

a) Há formação de raízes em todas as concentrações de sais e níveis de AIA e ANA utilizados.

b) Mudanças de melhor qualidade são obtidas com todos os níveis de AIA empregados e com as concentrações dos sais reduzidas até a metade.

c) O enraizamento não é influenciado pela variação nas concentrações dos sais.

d) As raízes são emitidas diretamente do explante na sua parte basal sem formação de calos, para os níveis de AIA empregados.

e) Há formação intensa de calos na parte basal dos brotos em todas as concentrações de ANA utilizadas, sendo que as raízes se originaram a partir destes calos.

6. RESUMO

Propagação "in vitro" de Gerbera jamesonii Bolus ex Hook através de capítulos jovens.

O presente estudo objetivou identificar técnicas de cultura de tecidos que permitam um rápido estabelecimento, multiplicação e enraizamento "in vitro" de Gerbera jamesonii Bolus ex Hook cv. Appelbloesem.

Os ensaios foram realizados "in vitro" e subdivididos em três fases: a) Estabelecimento da cultura, b) Multiplicação de brotos e c) Enraizamento de brotos. Para a primeira fase foram utilizadas inflorescências jovens (capítulos) como explante inicial. Melhores resultados quanto ao estabelecimento dos capítulos "in vitro" e regeneração de brotos adventícios foi conseguido com o uso de 3, 6 ou 9 mg/l de BAP. O uso de 2,4-D foi desinteressante para esta fase. Para o ensaio de multiplicação foram utilizados como explante, brotações adventícias obtidas no experimento anterior. Melhores resultados quanto a taxa de multiplicação, foram obtidos com a metade da concentração dos sais do MS e com o nível de 2,27 mg/l de BAP, independentemente do nível de AIA utilizado e com um período de subcultivo de vinte dias. Houve formação de raízes nos tratamentos sem BAP. A adenina e tirosina não influenciaram na taxa de multiplicação

dos brotos. Posteriormente, foram testados na fase de enraizamento, a concentração de sais e de auxina que proporcionassem mudas enraizadas de boa qualidade. Melhores resultados foram obtidos com todos os níveis de AIA empregados, proporcionando 100 % de brotos enraizados. A redução das concentrações dos sais à 25% e 12,5% resultaram em plântulas enraizadas de qualidade inferior, quando comparadas àquelas obtidas nas concentrações de 100% e 50%. Não houve formação de calos na base dos brotos, sendo as raízes emitidas diretamente do explante, para os diferentes níveis de AIA empregados.

7: SUMMARY

"In vitro" propagation of *Gerbera jamesonii* Bolus ex Hook using young capitulum

The purpose of this study was to establish tissue culture procedures for rapid in vitro multiplication and rooting of *Gerbera jamesonii* Bolus ex Hook cv. Appelbloesem.

Trials were carried out "in vitro" and separated in three stages: a) Culture establishment, b) Bud multiplication, and c) Bud rooting. For the first stage young inflorescences (capitulum) were used as initial explant. The best result concerning capitulum "in vitro" establishment was attained at 3, 6 or 9 mg/l of BAP. 2,4-D was not necessary at this stage. For the multiplication trials explantes were adventitious buds obtained from the first stage experiment. The best result for the multiplication rate was obtained using half of the salt concentration of the MS medium and 2,27 mg/l of BAP, independently of IAA level and the twenty days subculture period. Roots were formed in treatments with no BAP. Adenine and tyrosine did not influence bud multiplication rate. Further, during the rooting phase, salt and auxine concentrations were tested to produce good quality rooted plantlets. Best results were obtained at all levels of IAA, giving 100% rooted plantlets. Reduction of salt concentration to 25% and 12,5% resulted in poorer quality plantlets as compared to those obtained by using

100% and 50% concentrations. There was no callus formation at the bases, and roots were formed directly from the explant for all levels of IAA.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

01. AHMIM, M. & VIETH, J. Production de plantes haploides de Gerbera jamesonii par culture "in vitro" d'ovules. Canadian Journal of Botany, Ottawa, 64(10):2355-7, oct. 1986.
02. 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, Brasília, 26(2):269-73, fev.1991.
03. BOUZIGUES, P. La production de vitroplants pour l'horticulture ornementale en France. Revue Horticole, Paris, 277:15-23, 1987.
04. CAPPADOCIA, M.; CHRETIEN, L. & LAUBLIN, G. Production of haploids in Gerbera jamesonii via ovule culture: influence of fall versus spring sampling on callus formation and shoot regeneration. Canadian journal of botany, Ottawa, 66(6):1107-10, juin.1987.

05. CHU, C.-Y. & HUANG, M.-C. "In vitro" formation of gerbera (Gerbera hybrida Hort.) plantlets through excised scape culture. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science, Taiwan, 52(1):45-50, 1983.
06. GRATTAPAGLIA, D & MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C. & CALDAS, L.S. Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas. Brasília, ABCTP/EMBRAPA-CNPQ, 1990. p.99-169.
07. HEDTRICH, C.M. Production of shoots from leaves and production of Gerbera jamesonii. Gartenbauwissenschaft, Weihenstephan, 44(1):1-3, 1979.
08. HEMPEL, M.; PETOS-WITKOWSKA, B. & TYMOSZUK, J. The influence of cytokinins on multiplication and subsequent rooting of gerbera "in vitro". Acta Horticulturae, Skierniewice, 167:301-5, 1985.
09. HUANG, M.-C. & CHU, C.-Y. A scheme for commercial multiplication of gerbera (Gerbera hybrida Hort.) through shoot tip culture. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science, Taiwan, 54(1):94-100, 1985.

10. LALIBERTE, S.; CHRETIEN, L. & VIETH, J. "In vitro" plantlet production from young capitulum explants of Gerbera jamesonii. HortScience, Riverside, 20(1):137-9, 1985.
11. MEYNET, J. Incidences de la multiplication "in vitro" sur le comportement ultérieur en culture de quelques variétés de gerbera. Agronomie, Fréjus, 3(9):839-46, 1983.
12. MURASHIGE, T.; SERPA, M. & JONES, J.B. Clonal multiplication of gerbera through tissue culture. HortScience, Riverside; 9(3):175-80, 1974.
13. _____ & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum, Madison, 15:473-97, 1962.
14. PAWLOWSKA, H. Trials on gerbera propagation "in vitro". Referativnyi Zhurnal, Moskva, 21(2):177-81, 1977.
15. PETRU, E. & MATOUS, J. "In vitro" cultures of gerbera (Gerbera jamesonii bolus). Zahradnictví, Prague, 11(4)309-14, 1984.

16. PIERIK, R.L.M.; JANSEN, J.L.M.; MAASDAM, A. & BINNENDIJK, C.M. Optimalization of gerbera plantlet production from excised capitulum explants. Scientia Horticulturae, Wageningen, 3(4):351-7, 1975.
17. _____ & SEGERS, T.A. "In vitro" culture of midrib explants of gerbera: adventitious root formation and callus induction. Zeitschrift fur Pflanzenphysiologie, Stuttgart, 69:204-12, 1973.
18. _____ & SPRENKELS, P.A. Improvement of the rooting of gerbera "in vitro" by NAA. Vakblad voor de Bloemisterij, Wageningen, 39(21):45, 1984.
19. _____; STEEGMANS, H.H.M.; VERHAEGH, J.A.M. & WOUTERS, A. N. Effect of cytokinin and cultivar on shoot formation of Gerbera jamesonii "in vitro". Netherlands Journal of Agricultural Science, Wageningen, 30(4):341-6, 1982.
20. _____; _____; WOUTERS, A.N. & VEZHEAGH, J. New developments in the vegetative propagation of gerberas in testtubes. Vakbladvoor de Bloemisterij, Wageningen, 34(25):36-7, 1979.

21. RAMALHO, M; SANTOS, J.B. & PINTO, C.B.P. Genética na Agropecuária. In: _____ Biotecnologia. São Paulo, Ed Globo, 1990. p.303-6.
22. RUFFONI, B; DAMIANO, C; SILVANO, G; BREGLIANO, R. The sterilization e micropropagation of Gerbera jamesonii hybrida. Annali dell'Istituto Sperimentale per la Floricoltura, San Remo, 18(1):21-42, 1987.
23. _____ & SULIS, S. Regeneration from callus in Gerbera jamesonii hybrida: induction, development and evaluation. Annali dell'Istituto Sperimentale per la Floricoltura, San Remo, 19(1):73-81, 1988.
24. SAWA, K. The culture of pith from rhizome of gerbera "in vitro". Agriculture and Horticulture, Seibundo Sinkoshia, 32(3):50-1, 1977.
25. SCHIVA, T.; LERCARI, B. & GIUSTA, R. Micropropagation of gerbera: variable response to "in vitro" culture. Annali dell'Istituto Sperimentale per la Floricoltura, San Remo, 13(1):56-7, 1982.

26. SCOZEK, U. & HEMPEL, M. The influence of some organic medium compounds on multiplication of gerbera "in vitro". Acta Horticulturae, Skierniewice, 226(2):643-6, 1988.
27. SITBON, M. Production of haploid Gerbera jamesonii plants by "in vitro" culture of unfertilized ovules. Agronomie, Angers, 1(9):807-12, 1981.
28. SKOOG, F. & MILLER, C.O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured "in vitro". Symposia of the Society for experimental Biology, 11:118-31, 1957.