

**ASPECTOS DO CULTIVO *IN VITRO* E
DIVERGÊNCIA GENÉTICA EM GÉRBERA
(*Gerbera jamesonii*)**

RODRIGO KELSON SILVA REZENDE

2005

RODRIGO KELSON SILVA REZENDE

ASPECTOS DO CULTIVO *IN VITRO* E DIVERGÊNCIA GENÉTICA
EM GÉRBERA (*Gerbera jamesonii*)

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Fisiologia Vegetal, para a obtenção do título de "Mestre".



Orientador

Prof. Dr. Luciano Vilela Paiva

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
2005

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Rezende, Rodrigo Kelson Silva

Aspectos do cultivo *in vitro* e divergência genética em gérbera (*Gerbera jamesonii*) / Rodrigo Kelson Silva Rezende. -- Lavras : UFLA, 2005.

91 p. : il.

Orientador: Luciano Vilela Paiva
Dissertação (Mestrado) – UFLA.
Bibliografia.

1. Micropropagação. 2. Enraizamento. 3. Aclimatização. 4. RAPD. 5. Anatomia vegetal I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-635.93355

RODRIGO KELSON SILVA REZENDE

**ASPECTOS DO CULTIVO *IN VITRO* E DIVERGÊNCIA GENÉTICA
EM GÉRBERA (*Gerbera jamesonii*)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Fisiologia Vegetal, para a obtenção do título de “Mestre”.

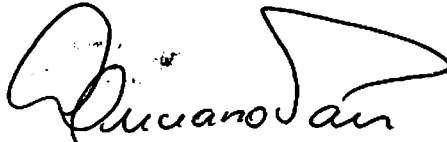
APROVADA em 5 de agosto de 2005.

Prof. Renato Paiva, PhD

DBI/UFLA

Antônio Chalfun Jr., PhD

UFLA



Prof. Lucjano Vilela Paiva

UFLA

(Orientador)

LAVRAS

MINAS GERAIS - BRASIL

A Deus,

por não escolher os capacitados, mas por capacitar os escolhidos,

OFEREÇO.

Aos meus pais, Jofre de Rezende Costa e
Maria Aparecida Silva Rezende.
À minha irmã, Renata Kelly Silva Rezende,

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar ao meu lado em todos os momentos de minha vida.

Aos meus pais, Jofre e “Cidinha”, e a minha irmã, “Rê”, por todo amor, dedicação, carinho e por sempre me apoiarem em todos os momentos da minha caminhada. Eu amo muito vocês !

A todos os meus familiares, que sempre acreditaram em meu potencial e me incentivaram a seguir em frente.

À Universidade Federal de Lavras e à CAPES, pela oportunidade da realização do mestrado e pela concessão da bolsa de estudos.

Ao meu orientador, professor Dr. Luciano Vilela Paiva, por toda atenção, apoio e conselhos oferecidos durante estes dois anos de convívio profissional.

Ao professor Dr. Renato Paiva, pela oportunidade da iniciação científica durante a graduação, pela co-orientação durante o mestrado e por fazer parte da banca avaliadora de minha dissertação.

Ao pesquisador Dr. Antônio Chalfun Júnior, pelas valiosas sugestões durante a realização deste trabalho, pela participação da banca avaliadora e por se mostrar uma pessoa muito competente e prestativa.

Ao pesquisador Dr. Marcelo Murad, pelo agradável convívio e por fazer parte desta banca avaliadora.

À professora Dra. Dulcinéia de Carvalho pelo auxílio na análise estatística dos dados moleculares.

À Multiflores, na pessoa do Dr. Luciano Vilela Paiva, pela cessão das plantas matrizes para a realização dos experimentos.

Aos professores do setor de Fisiologia Vegetal, Renato, Donizeti, Evaristo, Amauri, Ângela e Luiz Edson, por todos os conhecimentos transmitidos.

Aos grandes amigos que conheci no Laboratório de Cultura de Tecidos: Mauro, Breno, Raniere, Cíntia, Raírys, Cristiano, Ednabel, Gustavo, Lenaldo, Fernanda, Patrícia, Diogo, Letícia, Eduardo, Luciano, Vanessa, Álvaro e “Tina”.

Aos amigos do Laboratório Central de Biologia Molecular (LCBM), Paula Torga, Maiana, José Renato, Sanzio, Gracielle, Marcus, Kalynka, Paula, Janaína, Luciano, Douglas, Raphael, Rodrigo, Monalisa, Guilherme, Sarah, Magnólia Nilson e Juliana.

Ao laboratorista e amigo Anderson Ramos, por sua eficiência e boa vontade na ajuda aos companheiros de laboratório.

Aos funcionários Izonel, “Lena”, “Tanhan”, Evaristo, Joel, Odorêncio e “Barrinha” pela grande amizade ao longo desses anos.

A todos os amigos da Fisiologia Vegetal, em especial: Peterson, Paulo Cairo, Aurélio, Sidnei, Lisandro, “Guto”, “Espeto”, “Dani”, Morbeck, João Paulo e Andrea.

Ao Fábio (“Cebola”), pela grande amizade construída ao longo desses anos e pela ajuda na parte estatística.

A todos os amigos da graduação e pós-graduação que estiveram e estão comigo nesta caminhada.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

BIOGRAFIA

Rodrigo Kelson Silva Rezende, filho de Jofre de Rezende Costa e Maria Aparecida Silva Rezende, nasceu em 6 de abril de 1980, na cidade de Andrelândia, estado de Minas Gerais.

Concluiu o ensino médio no Colégio Nossa Senhora de Lourdes em dezembro de 1997, na cidade de Lavras, estado de Minas Gerais.

Graduou-se Engenheiro Agrônomo pela Universidade Federal de Lavras em julho de 2003, onde foi bolsista de iniciação científica do PIBIC/CNPq, de novembro de 2000 a julho de 2003, na área de Fisiologia Vegetal.

Ingressou no mestrado em Agronomia, área de concentração em Fisiologia Vegetal, em agosto de 2003.

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
CAPÍTULO I: INTRODUÇÃO GERAL	1
1 INTRODUÇÃO	2
2 REFERENCIAL TEÓRICO	6
2.1 Descrição da espécie	6
2.2 Cultura de tecidos vegetais.....	7
2.3 Meios nutritivos	9
2.4 Estabelecimento <i>in vitro</i>	10
2.5 Calogênese	11
2.6 Enraizamento.....	12
2.7 Aclimatização.....	13
2.8 Aspectos anatômicos.....	14
2.9 Marcadores moleculares RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) e divergência genética.....	15
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	21
CAPÍTULO II: CONTROLE DA CONTAMINAÇÃO NO ESTABELECIMENTO <i>IN VITRO</i> DE CAPÍTULOS FLORAIS DE <i>Gerbera jamesonii</i>	28
1 RESUMO	29
2 ABSTRACT	30
3 INTRODUÇÃO	31
4 MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1 Material vegetal.....	33
4.2 Controle da contaminação no estabelecimento <i>in vitro</i> de capítulos florais	33

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
5.1 Controle da contaminação no estabelecimento <i>in vitro</i> de capítulos florais	35
6 CONCLUSÕES.....	38
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39
 CAPÍTULO III: ASPECTOS DO CULTIVO <i>IN VITRO</i> A PARTIR DE CAPÍTULOS FLORAIS E DA ANATOMIA FOLIAR DE <i>Gerbera jamesonii</i>	
1 RESUMO	42
2 ABSTRACT	43
3 INTRODUÇÃO	44
4 MATERIAL E MÉTODOS	47
4.1 Organogênese indireta a partir de capítulos florais de gérbera	47
4.2 Efeito de diferentes doses de ANA no enraizamento <i>in vitro</i> de brotações ..	48
4.3 Aclimatização de plântulas	49
4.4 Anatomia de folhas produzidas por cultivo <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	49
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
5.1 Organogênese indireta a partir de capítulos florais de gérbera	51
5.2 Efeito de diferentes doses de ANA no enraizamento <i>in vitro</i> de brotações ..	55
5.3 Aclimatização de plântulas	59
5.4 Anatomia de folhas produzidas por cultivo <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	60
6 CONCLUSÕES.....	67
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68
 CAPÍTULO IV: ESTUDO DA DIVERGÊNCIA GENÉTICA ENTRE CULTIVARES DE <i>Gerbera jamesonii</i> POR MEIO DE MARCADORES RAPD	
1 RESUMO	73
2 ABSTRACT	74

3 INTRODUÇÃO	75
4 MATERIAL E MÉTODOS	76
4.1 Estudo da divergência genética entre cultivares de <i>Gerbera jamesonii</i> por meio de marcadores RAPD	76
4.1.1 Material vegetal.....	76
4.1.2 Extração e quantificação do DNA genômico	76
4.1.3 Amplificação via RAPD.....	78
4.1.4 Análise estatística dos dados moleculares.....	79
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	82
5.1 Divergência genética entre cultivares de <i>Gerbera jamesonii</i> por meio de marcadores RAPD.....	82
5.1.1 Marcadores RAPD	82
5.1.2 Análise da divergência genética.....	85
6 CONCLUSÕES.....	90
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91

RESUMO

REZENDE, Rodrigo Kelson Silva. Aspectos do cultivo *in vitro* e divergência genética em gérbera (*Gerbera jamesonii*). 2005. 91 p. (Mestrado em Agronomia/Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

A gérbera (*Gerbera jamesonii*) é uma espécie ornamental que apresenta flores com boa durabilidade e uma gama de cores que pode satisfazer os mercados mais exigentes. Nesse contexto, estudos vêm sendo realizados buscando encontrar a melhor alternativa para a propagação comercial desta espécie. Os objetivos deste trabalho foram estudar vários aspectos envolvidos no cultivo *in vitro* de gérbera, tais como: estabelecimento da cultura por meio de capítulos florais, controle da contaminação, multiplicação de brotações axilares, enraizamento de brotos, aclimatização de plântulas e estudos anatômicos, bem como analisar a divergência genética entre seis cultivares de *Gerbera jamesonii* ('Jaguar Yellow', 'Jaguar Cream', 'Jaguar Lemon', 'Jaguar Salmon Pastels', 'Jaguar Red', 'Jaguar Deep Rose') por meio de marcadores RAPD. Para o estabelecimento da cultura por meio de capítulos florais, recomenda-se utilizar hipoclorito de sódio (2,0% de cloro ativo) por um período de 60 minutos para a desinfestação dos explantes. Obtiveram-se em média, 3,2 brotações e 6,6 folhas a partir da indução de calos em capítulos florais de gérbera. Foi observada a formação de raízes na ausência e na presença de ANA, obtendo-se 100% de enraizamento. A suplementação do meio de cultura com doses crescentes de ANA promoveu um aumento linear no número de raízes e comprimento médio de raízes. As plântulas provenientes do cultivo *in vitro* apresentaram uma taxa de 100% de sobrevivência na aclimatização. As estruturas foliares desenvolvidas *in vivo* apresentam epiderme adaxial, parênquima paliçádico, parênquima esponjoso e epiderme abaxial mais espessos que no cultivo *in vitro*. O sistema vascular observado em folhas produzidas *in vivo* é mais desenvolvido que *in vitro*. Não foi observado a ocorrência de vitrificação em plântulas de gérbera cultivadas *in vitro*. Os marcadores RAPD foram eficientes no estudo da divergência genética entre as diferentes cultivares de *Gerbera jamesonii* analisadas. As cultivares de *Gerbera jamesonii* foram separadas em dois grupos distintos, a 44% de similaridade genética. A maior similaridade genética encontrada (56%) foi entre as cultivares Jaguar Yellow e Jaguar Lemon. Os resultados demonstram que marcadores RAPD podem ser utilizados na separação de plântulas de *Gerbera jamesonii* oriundas do cultivo *in vitro*, com base na coloração da flor.

* Comitê Orientador: Luciano Vilela Paiva – UFLA (Orientador), Renato Paiva (Co-Orientador) – UFLA.

ABSTRACT

REZENDE, Rodrigo Kelson Silva. *Aspects of the in vitro cultivation and genetic divergence in gerbera (Gerbera jamesonii)*. 2005. 91 p. (Master Program in Agronomy/Plant Physiology) - Federal University of Lavras, Lavras, MG. *

Gerbera (Gerbera jamesonii) is an ornamental specie that presents flowers with long shelf-life and a range of colors that can satisfy the most demanding markets. In this context, studies have been accomplished looking for the best alternative for the commercial propagation of this species. The objectives of this work were to study several aspects involved in the *in vitro* cultivation of gerbera, such as the establishment of the culture from capitulum explants. The control of the contamination, multiplication of axillary shoots, rooting of shoots, seedlings acclimatization and anatomical studies, as well as to analyze the genetic divergence among six cultivars of *Gerbera jamesonii* ('Jaguar Yellow', 'Jaguar Cream', 'Jaguar Lemon', 'Jaguar Salmon Pastels', 'Jaguar Red', 'Jaguar Deep Rose') by RAPD markers. To the establishment of the culture from capitulum explants, it is recommended to use sodium hypochlorite (2,0% of active chlorine) for a period of 60 minutes to sterilize the explants. The mean values were 3,2 for shoots and 6,6 for leaves starting from the induction of callus in gerbera capitulum explants. The formation of roots was observed in the absence and in the presence of NAA obtaining 100% of rooting. By suppling higher of NAA levels to the medium, a linear increase of the number of roots and mean length of roots was observed. Seedlings coming from the *in vitro* cultivation presented 100% of survival in the acclimatization. The foliar structures developed *in vivo* showed adaxial epidermis, palisade parenchyma, spongy parenchyma and abaxial epidermis thicker than in the *in vitro* cultivation. The vascular system observed in leaves produced *in vivo* is more developed than *in vitro*. It was not observed the effect of vitrification in seedlings of gerbera cultivated *in vitro*. The RAPD markers were efficient to study the genetic divergence among the different cultivars of *Gerbera jamesonii* analyzed. *Gerbera jamesonii* cultivars were separated in two different groups at a level of 44% of genetic similarity. The largest genetic similarity found (56%) was between Jaguar Yellow and Jaguar Lemon cultivars.

* Guidance Committee: Luciano Vilela Paiva – UFLA (Adviser), Renato Paiva (Co-Adviser) – UFLA.

The results demonstrated that RAPD markers can be used to separate seedlings of *Gerbera jamesonii* originated from *in vitro* cultivation based on the flower color.

CAPÍTULO I: INTRODUÇÃO GERAL

1 INTRODUÇÃO

A floricultura brasileira atual, decididamente, insere-se num novo contexto econômico, social e cultural do país, e reflete a incorporação de valores ligados à melhoria das condições de vida e de bem estar das populações de suas diversas regiões. Tais conceitos se consolidam na valorização do consumo de flores e plantas ornamentais, tanto para espécies e variedades de corte ou cultivadas em vasos, para arranjos e ornamentações nos ambientes domésticos, coletivos e eventos sociais, quanto para a incorporação crescente das plantas, gramas e forrações utilizadas na jardinagem e no paisagismo em obras e áreas públicas além de projetos e construções de natureza privada, comerciais e residenciais.

Segundo Optiz (2004), o setor de floricultura movimenta, mundialmente, cerca de US\$16 bilhões, com base no desempenho do mercado produtor, ou aproximadamente US\$48 bilhões quando se usa como parâmetro o mercado consumidor.

Quando se observa a participação do Brasil nesse mercado, ficam evidentes as amplas possibilidades de expansão. O país responde por apenas 0,88% da produção e por 0,22% das exportações mundiais.

No Brasil, cerca de 3.600 produtores, das mais diferentes regiões, estão envolvidos com essa cadeia produtiva. Eles cultivam aproximadamente 6.100 hectares, produzindo mais de 250 espécies, entre flores de vaso, de corte e plantas verdes. O grande polo fica em São Paulo, estado que responde por 70% da produção e que registra em torno de 40% do consumo nacional.

Na avaliação de Optiz (2004), os negócios de flores e de plantas ornamentais dentro do país ainda necessita de maior impulso. A falta de hábito da população e a pouca tradição da maioria das regiões em inserir esses artigos

entre as compras regulares são os fatores responsáveis pelo baixo consumo per capita nacional, estimado em US\$3,50 por habitante/ano. Este valor pode ser considerado muito baixo quando comparado, por exemplo, com o da Alemanha, onde o consumo estimado é de US\$94,00 por habitante/ano.

No mês de dezembro de 2004, as exportações brasileiras de flores e plantas ornamentais atingiram US\$ 2,27 milhões, superando em 16,09% o valor exportado no mesmo mês do ano anterior. No acumulado do ano, as exportações nacionais do segmento somaram US\$ 23,5 milhões, valor esse que superou em 20,96% os resultados obtidos no período de janeiro a dezembro de 2003, confirmando todos os prognósticos sobre a performance contemporânea do setor exportador da floricultura brasileira (Ibraflor, 2005).

A maior parcela das flores frescas para o mercado, exportada pelo Brasil, constituiu-se de produtos típicos da floricultura de clima temperado e incluiu, principalmente, rosas, crisântemos, lisianthus, lírios e gérberas, entre outras (Ibraflor, 2005).

A gérbera é uma espécie ornamental de grande expressão na Europa, Estados Unidos e Ásia, onde é utilizada predominantemente como flor de corte. Destacam-se, nesse contexto, Holanda, França e Itália, na Europa e Japão, na Ásia, como grandes produtores.

A Cooperativa Agropecuária de Holambra localizada no município de Jaguariúna – SP concentra cerca de 90% da produção nacional de gérbera de corte e de vaso (minigérbera), sendo o restante referente a centros de comercialização do sul do país.

Nos últimos anos, tem sido crescente o interesse pelas gérberas, pois, suas flores apresentam boa durabilidade e uma gama de cores, que podem satisfazer os mercados mais exigentes. Nesse contexto, estudos vêm sendo realizados, buscando encontrar a melhor alternativa para a propagação comercial desta espécie.

A propagação natural de gébera pode ser feita por meio de sementes ou por divisão de touceiras. Ambos os métodos são inconvenientes quando pensa-se em propagação em âmbito comercial, pois, suas sementes originam progênies desuniformes pela alogamia da espécie e a divisão de touceiras dissemina e acumula doenças por meio de sucessivas gerações.

O uso das técnicas de micropropagação permite que se consiga, em um curto espaço de tempo, grande número de plantas com qualidade superior.

Os produtores de gébera que utilizam a cultura de tecidos devem aprimorar todas as etapas da propagação, para poder competir no mercado. Essas etapas são: (a) estabelecimento do material inicial ou “explantes primários”, (b) otimização do meio para cultivo desse material, objetivando maiores taxas de multiplicação e (c) enraizamento e aclimatização das plântulas.

O método mais indicado para o estabelecimento inicial da cultura é o que emprega meristemas, entretanto, ele demanda um grande número de plantas adultas, as quais serão destruídas para o fornecimento de explantes iniciais.

Dessa forma, a utilização de explantes (capítulos florais, por exemplo) para o cultivo *in vitro* surge como um sistema alternativo de propagação de gébera em âmbito comercial. Nesse caso, as plantas matrizes podem vir a emitir novas flores que servirão como fonte de explantes.

Devido à facilidade de regeneração de novas plântulas, as sementes também podem ser usadas no cultivo *in vitro*. Nesse caso, torna-se difícil prever que cores de flor serão expressas pelas plantas por meio desse sistema de cultivo.

No processo de produção comercial de gébera, a cor da flor é uma das principais características morfológicas de interesse agrônômico. Na natureza, são encontradas na coloração que varia do amarelo ao laranja-escuro, mas, com o desenvolvimento de cultivares híbridas, disponibilizou-se no mercado grande

variedade de cores, incluindo: branca, nata, rosa, vermelha, carmim e violeta, entre outras.

A utilização de marcadores moleculares pode contribuir para o estudo de divergência genética entre diferentes cultivares de gérbera, baseado na cor da flor como característica morfológica, auxiliando no processo de separação de plantas durante o processo de produção comercial de mudas.

Neste contexto, os objetivos deste trabalho foram:

- i. Estudar vários aspectos envolvidos no cultivo *in vitro* de gérbera, tais como: estabelecimento da cultura por meio de capítulos florais, controle da contaminação, multiplicação de brotações axilares, enraizamento de brotos, aclimatização de plântulas e estudos anatômicos;
- ii. Analisar a divergência genética entre seis cultivares de *Gerbera jamesonii* por meio de marcadores RAPD.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Descrição da espécie

As gérberras são flores provenientes da *Gerbera jamesonii*, espécie da família das Asteráceas, originária do sul da África (Gerstenberger & Sigmund, 1980). São plantas perenes, herbáceas, que possuem flor composta. O capítulo é formado por várias filas concêntricas de flores femininas liguladas, havendo também uma fila de flores hermafroditas e ao centro ficam as flores masculinas, assemelhando-se a grandes margaridas (Figura 1).

Na natureza são encontradas na coloração que varia do amarelo ao laranja-escuro, mas com o desenvolvimento de cultivares híbridas, disponibilizou-se no mercado grande variedade de cores, abrangendo: branca, nata, rosa, vermelha, carmim e até mesmo violeta.

As flores podem apresentar diâmetro e comprimento de hastes variáveis.

As folhas apresentam-se em forma de roseta e podem variar, de acordo com a cultivar, em tamanho e em estrutura. O sistema radicular é, originalmente, pivotante, mas, à medida que se desenvolve, converte-se em fasciculado e é composto por grossas raízes de onde partem numerosas radículas (Infoagro, 2005).

A propagação pode ser por meio de sementes, assexuada por divisão de touceiras ou por cultura de tecidos (Mascarini, 1998).



FIGURA 1 *Gerbera jamesonii*. Fonte: S & G Flowers (2005).

2.2 Cultura de tecidos vegetais

Cultura de tecidos vegetais, ramo da biotecnologia, é a técnica de crescimento de células, tecidos e órgãos em um meio nutritivo artificial, isolados da planta-mãe (George, 1996). O cultivo de tecidos vegetais *in vitro* pode minimizar os efeitos da variação de fatores ambientais, assim como se pode conseguir um maior controle sobre as condições de temperatura, luz e nutrientes. Como resultado, a produção de plantas de valor econômico torna-se viável (Seabrook, 1980).

A propagação de plantas de interesse econômico, por meio da cultura de tecidos, baseia-se no princípio da totipotencialidade das células, ou seja, qualquer célula no organismo vegetal contém toda a informação genética necessária para a regeneração de uma planta completa (Torres et al., 1998).

A aplicação mais prática da cultura de tecidos é a micropropagação, também denominada de propagação vegetativa *in vitro* (Grattapaglia & Machado, 1998). Os principais benefícios da micropropagação de plantas são: a) a possibilidade de aumento rápido do número de indivíduos geneticamente idênticos a partir de plantas selecionadas, b) a produção de mudas durante todo o ano, mesmo em regiões nas quais a planta não apresenta condições para a propagação sexuada, c) a produção de plantas com elevada qualidade sanitária, em geral livre de bactérias, fungos e vírus, d) a possibilidade de conservação de germoplasmas, garantindo a manutenção da biodiversidade e e) auxílio em programas de melhoramento de plantas por meio da associação de métodos de cultura de tecidos e regeneração de plantas *in vitro* (Echeverrigaray et al., 2001).

De acordo com Grattapaglia & Machado (1998), a propagação *in vitro* divide-se, basicamente, em três estágios: I - seleção e desinfestação de explantes e cultura em meio nutritivo asséptico, II - multiplicação dos propágulos mediante subculturas em meio próprio para a multiplicação e III - transferência das partes aéreas produzidas para o meio de enraizamento e subsequente transplantio das plantas obtidas para substrato ou solo. Conforme o explante utilizado, a multiplicação pode ser: a) por meio da proliferação de gemas axilares (órgãos meristemáticos pré-formados), b) mediante indução de gemas adventícias por organogênese direta ou indireta (passando pela fase de calo) e c) por via embriogênese somática direta ou indireta (por calo).

O emprego da cultura de tecidos tem sido crescente para a gérbera, tornando-se uma alternativa bastante viável para sua propagação assexual. As primeiras tentativas nesse 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 *in vitro* de gérbera.

Diversos trabalhos mostram que a gérbera 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 al., 1974 e Ruffoni et al., 1987) e capítulos florais (Laliberte et al., 1985 e Pierik et al., 1975). Estes métodos por sua vez, apresentam vantagens e desvantagens. Segundo Chu & Huang (1983), uma objeção que se faz em relação à utilização de inflorescências, folhas, parte central do rizoma, escapo ou talo floral e capítulos florais para o estabelecimento da cultura de gérbera *in vitro* é que a porcentagem 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 nos quais se desejam brotações axilares.

2.3 Meios nutritivos

Torres et al. (2001) descrevem que o meio de cultura é constituído de componentes essenciais (água, sais inorgânicos, fonte de carbono e energia, vitaminas e reguladores de crescimento) e opcionais (aminoácidos, amidas, ácidos orgânicos e substâncias naturais complexas). A composição do meio de cultura tem importante papel nas respostas de crescimento de células e tecidos *in vitro* (Borgatto et al., 2002).

As plantas ou explantes cultivados *in vitro* possuem exigências nutricionais específicas. Assim, ao excisar parte da planta para cultivo *in vitro*, observa-se que os explantes não são completamente autotróficos e requerem meios nutritivos suplementados com as necessidades exógenas da célula, em termos de elementos essenciais, constituintes orgânicos e energia (Torres et al., 2001).

Nesse contexto, o meio Murashige & Skoog (MS) proposto em 1962, é um dos mais utilizados na cultura de tecidos da grande maioria das espécies, sendo realizadas algumas alterações de acordo com o explante utilizado (Caldas et al., 1998).

Os meios de cultura podem ser ainda modificados de acordo com a necessidade de cada tipo de explante e a espécie na qual se está trabalhando, sendo importante deter o conhecimento da importância de cada elemento contido em um meio de cultivo (Torres et al., 2001).

2.4 Estabelecimento *in vitro*

Um dos maiores problemas enfrentados na fase inicial de estabelecimento do explante *in vitro* diz respeito à contaminação bacteriana ou fúngica, principalmente presente na superfície dos tecidos de folhas, gemas e segmentos nodais. É freqüente deparar-se com contaminação presente no interior dos tecidos e que é conhecida como contaminação endógena. Este tipo de contaminação é mais freqüente em explantes derivados de plantas cultivadas no campo (Teixeira, 2004).

Os principais compostos utilizados para a desinfestação são o etanol e o cloro. O modo de ação do etanol consiste na rápida desnaturação protéica e na dissolução de lipídios, tendo como desvantagem o fato de ser pouco ativo contra esporos fúngicos. O cloro inativa enzimas, age como oxidante, tem efeito sobre bactérias e sua desvantagem é o odor irritante e também a baixa atividade contra esporos (Pasqual et al., 1997).

A desinfestação de segmentos de brotos, folhas e botões florais pode ser feita com álcool etílico comercial na concentração de 50% a 70% (v/v), por um período de 1 a 3 minutos, seguida de um tratamento com hipoclorito de sódio ou

cálcio 0,5% a 2% (p/v), por 5 a 20 minutos e de 3 a 5 lavagens com água destilada autoclavada por um período mínimo de 5 minutos (Teixeira, 2004).

2.5 Calogênese

Uma das metodologias mais aplicadas para o cultivo *in vitro* é a indução de calogênese. Calos são definidos como aglomerados de células parenquimáticas não organizadas, irregularmente diferenciadas, que se multiplicam desordenadamente e se desenvolvem em resposta a injúrias químicas ou físicas. No entanto, os calos podem se diferenciar em tecidos e órgãos (Torres et al., 1998).

Os calos apresentam um padrão típico de crescimento, o qual é caracterizado por meio de fases distintas. O estudo do crescimento dos calos envolve a determinação dos períodos em que ocorrem essas fases, sendo cada uma delas representada por eventos que lhe são peculiares (Smith, 1992).

Segundo Pierik (1990), o crescimento e o desenvolvimento dessas células podem ser influenciados pelo próprio material vegetal, como por exemplo genótipo, idade da planta, do órgão ou do tecido, estado fisiológico, pelo meio nutritivo, acrescido ou não de reguladores de crescimento e por fatores físicos externos, como luz e temperatura. Todos esses fatores agem acelerando, retardando ou até mesmo inibindo a proliferação celular e, conseqüentemente, a formação e o crescimento de um calo.

Desdiferenciação, indução e regeneração de plantas a partir de calos são, muitas vezes, processos difíceis de serem obtidos e podem demandar algum tempo (Grattapaglia & Machado, 1998).

A adição de reguladores de crescimento ao meio de cultura visa suprir as possíveis deficiências de fitohormônios nos explantes que se encontram isolados das regiões produtoras da planta matriz.

As auxinas têm sido amplamente utilizadas nos meios de cultivo para a indução de calos e, geralmente, dependendo da concentração, causam alongação celular e expansão ou divisão celular. A interação entre auxinas e citocininas também é muito utilizada para a indução de calogênese (Torres et al., 1998).

A morfogênese de calos nem sempre leva à formação de plântulas viáveis. Embora brotos e raízes possam ser emitidos, pode não ocorrer uma conexão vascular entre eles, o que é de extrema necessidade para a viabilização da plântula (Wetmore & Rier, 1963).

2.6 Enraizamento

O propósito da rizogênese é a formação de raízes adventícias nas partes aéreas obtidas no estágio de multiplicação, o que permite a constituição de plantas completas, para posterior aclimatização.

Lopes et al. (2001) relatam que a rizogênese pode ser dividida em três fases: indução, iniciação e alongação. A duração destas fases pode ser de uma a três semanas.

Dentre as substâncias reguladoras de crescimento, as auxinas exógenas têm participação fundamental no processo de rizogênese (Gaspar & Hofinger, 1988). Grattapaglia & Machado (1998) comentam que a auxina é importante nas duas fases iniciais da rizogênese e que esta pode ser inibidora na última fase. Também comentam que o uso desse regulador de crescimento no meio de cultivo e a posterior transferência do explante para outro isento de auxina são indicados para a indução e o desenvolvimento de raízes.

As auxinas mais utilizadas para a indução de raiz *in vitro* são ácido indol-3-acético (AIA), ácido naftaleno-acético (ANA) e ácido indol-butírico (AIB), sendo estes normalmente utilizados em baixas concentrações no meio de cultura (George & Sherrington, 1984; Zimmerman, 1981).

Alguns compostos podem ser adicionados ao meio de cultivo para auxiliar a indução da rizogênese. Uma das substâncias mais utilizadas é o carvão ativado, em concentrações que variam em torno de 0,1% a 2% (p/v).

O carvão ativado é utilizado para estimular a condição de escuro na qual as raízes normalmente se desenvolvem. Em termos químicos, o carvão ativado exerce um efeito de retenção de alguns componentes do meio de cultivo, como a fixação de citocininas residuais liberadas pelos tecidos vegetais e compostos tóxicos inibidores do enraizamento. O carvão ativado pode fixar também auxinas e reter fenóis oxidantes, sendo, de forma geral, benéfico, promovendo o alongamento das raízes (Drew, 1988; Mohamed-Yasseen, 2001).

Segundo McCown (1988), o enraizamento varia de acordo com a espécie, desde o fácil enraizamento e crescimento radicular até a inibição completa.

2.7 Aclimatização

A aclimatização envolve o transplante da plântula da condição *in vitro* para a casa de vegetação que, geralmente, consiste de uma fase crítica e que pode ser um fator limitante para o processo de micropropagação de algumas espécies (Torres et al., 1998).

Entre os vários fatores que podem estar envolvidos no processo de aclimatização, podem-se relacionar o genótipo, o estresse hídrico, a alteração do metabolismo heterotrófico para autotrófico, a infecção por patógenos e o estresse pela alteração na radiação (Debergh & Maene, 1981). A mudança repentina da umidade à qual a plântula estava exposta pode causar danos, mesmo em plantas que apresentem o aspecto normal.

Durante a aclimatização, o controle da luz pode ser efetuado com a utilização de sombrite. A umidade é conservada elevada, com a cobertura

plástica das plantas, irrigações ou nebulizações. A nutrição pode ser feita com auxílio de soluções nutritivas balanceadas, aliada ao aumento das condições autotróficas da planta quando a folha eleva a sua capacidade fotossintética (Desjardins et al., 1987; Zimmerman, 1988).

2.8 Aspectos anatômicos

A desordem estrutural e funcional nas plantas *in vitro* é resultado de complexos e múltiplos fatores no meio de cultura. A consequência é uma baixa taxa de sobrevivência das plantas quando transferidas para condições *ex vitro* (Ziv, 1987). Pasqual et al. (1997) afirmam que, durante o processo de transferência para a condição *ex vitro*, a cutícula é frequentemente menos desenvolvida devido à umidade relativa dos frascos ser relativamente alta. Como consequência, ocorre elevada perda de água durante o processo de aclimatização. As modificações manifestadas, principalmente nas folhas, afetam os principais processos executados por estas, ou seja, a fotossíntese e as trocas gasosas (Debergh & Maene, 1984). Especula-se que o ambiente de cultivo possa afetar e conduzir a diferentes atividades enzimáticas, resultando em várias mudanças nos processos metabólicos da planta.

Segundo Pasqual et al. (1997), a vitrificação é um dos principais problemas observados durante a fase de desenvolvimento dos explantes cultivados *in vitro*. Muitos fatores contribuem para a indução de vitrificação, tais como: fatores ambientais, baixa transpiração dos explantes, potencial hídrico do meio, composição dos macro e micronutrientes no meio e reguladores de crescimento, entre outros.

As desordens na vitrificação têm caráter morfológico (gemas com internódios curtos, folhas finas, alongadas e translúcidas, podendo a cor ser anormal) e caráter anatômico (hipertrofia do parênquima, grandes espaços

intercelulares, hipolignificação do sistema vascular e uma redução ou anomalia do sistema vascular, entre outras) (Debergh et al., 1992).

O estudo anatômico de órgãos vegetativos das plântulas cultivadas *in vitro* pode fornecer informações para o controle da morfogênese e auxiliar na eficiência de protocolos de micropropagação.

2.9 Marcadores moleculares RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) e divergência genética

Marcador molecular pode ser definido como todo e qualquer fenótipo decorrente da expressão de um gene, como no caso de proteínas, caracteres morfológicos, ou de um segmento específico de DNA (correspondente a regiões expressas ou não do genoma), cuja sequência e função podem ou não ser conhecidas (Ferreira & Grattapaglia, 1998). Estes são poderosas ferramentas que têm facilitado o estudo de diversas áreas da biologia, pura ou aplicada, cobrindo questões de identificação de cultivares, evolução e genética de populações, entre outras (Symondson & Liddell, 1996).

A utilização de marcadores moleculares na análise genética e no melhoramento de plantas aumentou exponencialmente desde a concepção da tecnologia da reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês *Polymerase Chain Reaction*) desenvolvida por Kary Mullis (Mullis & Faloona, 1987). A reação de PCR fundamenta-se no anelamento e na extensão enzimática de um par de *primers* utilizados como iniciadores, que delimitam a sequência de DNA da fita dupla alvo da amplificação. Esses iniciadores são sintetizados de maneira que suas sequências de nucleotídeos sejam complementares às sequências que flanqueiam a região alvo (Ferreira & Grattapaglia, 1998). O principal avanço trazido pela técnica PCR foi a possibilidade de sintetizar, *in vitro*, milhões de

cópias de um segmento específico de DNA na presença da enzima DNA polimerase.

Entre os vários tipos de marcadores moleculares disponíveis, destacam-se os de maior utilização, RFLP (do inglês, *Restriction Fragment Length Polymorphism*), RAPD (do inglês, *Random Amplified Polymorphic DNA*), AFLP (do inglês, *Amplified Fragment Length Polymorphism*) e os microssatélites ou SSRs (do inglês, *Simple Sequence Repeat*) (Willians et al., 1990).

A técnica de DNA polimórfico amplificado ao acaso (RAPD) (Welsh & McClelland, 1990; Willians et al., 1990) é uma variação do protocolo de PCR, que utiliza apenas um único *primer* com aproximadamente 10 nucleotídeos de comprimento de seqüência arbitrária, que se anela em regiões arbitrárias do genoma e sintetiza múltiplos produtos de amplificação, detectando polimorfismo na ausência de informação específica da seqüência de nucleotídeos do DNA molde (Willians et al., 1990).

O primeiro passo para a utilização desta técnica refere-se à seleção dos *primers* a serem utilizados, cuja escolha deve basear-se na seguinte ordem: revelar diferenças, produzir bandas bem definidas e favorecer um padrão reproduzível (Loxdale et al., 1996).

Marcadores moleculares tipo RAPD comportam-se como dominantes, ou seja, não é possível distinguir se o segmento de DNA amplificado provém de um loco heterozigoto ou homozigoto (dominante) (Carlson et al., 1991; Willians, et al., 1990).

Como desvantagens do método tem-se que, em estudos de filogenia, não é possível distinguir a origem genômica (nuclear ou citoplasmática) dos fragmentos. A homologia das seqüências das bandas com mesma mobilidade no gel não é conhecida (Thormann et al., 1994; Tingey & Tufo, 1993), não sendo possível identificar se bandas com mesmo peso molecular de dois indivíduos

representariam um caráter homólogo (herdado de um ancestral comum) ou homoplástico (caráter que se desenvolveu independentemente dentro da população) (Pornkulwat et al., 1998). Não é possível distinguir alelos heterozigotos dos homozigotos (Carlson et al., 1991; Willians et al., 1990) e a reprodutibilidade do método pode ser influenciada pela enzima *Taq* DNA polimerase utilizada, pela quantidade de $MgCl_2$, pela qualidade do DNA, pelo tipo de termociclador e pelo método de extração de DNA (Cenis et al., 1993; Loxdale & Lushai, 1998; Loxdale et al., 1996; Suazo et al., 1998).

Para o estudo da divergência genética, é necessário o estabelecimento de uma medida (coeficiente) de similaridade/dissimilaridade entre dois indivíduos, sendo este o ponto de partida para várias técnicas de análise multivariada, que permite melhor visualização dos relacionamentos entre os mesmos (Krzanowski, 1998).

Segundo Wier (1990), os métodos de agrupamento utilizam a dissimilaridade ou distância entre indivíduos ou populações para a formação dos grupos. Existem diversos coeficientes de dissimilaridade, tais como distância euclidiana, Jaccard, Nei e Li, concordância simples, *power distance*, *percent disagreement* (porcentagem de discordância).

Estes coeficientes, em sua maioria, são calculados a partir de variáveis binárias representando presença e ausência, com valores de 1 e 0, respectivamente. Marcadores tipo RAPD são incluídos neste tipo de variável.

A escolha do coeficiente apropriado está diretamente relacionada com as suas propriedades. Aspectos como a natureza dos dados e o tipo de análise a ser implementada são igualmente fundamentais para auxiliar na escolha do coeficiente. Assim, alguns dados quantitativos podem ser melhor investigados quando convertidos em dados binários, de modo a reunir todos os valores abaixo e acima de um nível de interesse. Também o método de análise pode limitar a escolha do coeficiente (Alfenas, 1998).

Quando se trata de métodos de agrupamento, a literatura, da mesma forma que nos tipos de coeficientes, também revela uma enorme diversidade de métodos. Segundo Cruz & Regazzi (1994), os métodos de agrupamento mais utilizados têm sido o método do vizinho mais próximo, o método do Vizinho mais distante e o método das médias das distâncias.

O princípio geral de todos os métodos de agrupamento tem sido o de maximizar a similaridade dentro dos grupos e a dissimilaridade entre grupos.

Também conhecido como método da ligação simples ou *single linkage*, o método do vizinho mais próximo inicia-se pela identificação dos dois itens com menor distância relativa entre si, processada na matriz de distância $n \times n$. Esse par de itens é fundido e gera o primeiro grupo. A seguir, são calculadas as distâncias dos $n-2$ itens restantes, com relação a cada um dos dois itens do primeiro grupo, sendo identificada a menor dessas distâncias para a matriz de distância reduzida $(n-1) \times (n-1)$. A redução da dimensão da matriz ocorre em virtude de o primeiro grupo formado ser inserido nela como um único item. Nessa seqüência, o item identificado como o mais próximo do primeiro grupo é fundido a ele para formar um grupo de três itens. O processo se repete até a formação de um único agrupamento.

O método do vizinho mais distante é a antítese do vizinho mais próximo, pois opera com o par mais distante de itens.

No método das médias das distâncias, o critério utilizado para a formação dos grupos é a média das distâncias entre os pares de itens que formam cada grupo, como a própria denominação informa. É conhecido como método da média aritmética entre pares não ponderados (UPGMA, do inglês *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Average*), desenvolvido por Sokal & Michener (1958).

O que há de comum entre todos os três métodos de agrupamento descritos é que eles operam sobre a matriz de distância, dispensando o retorno à matriz de dados originais (Dias, 1998).

O processamento de análises multidimensionais pode ser realizado por meio de *softwares* como, por exemplo, o programa NTSYS – PC 2.0 desenvolvido por Rohlf (1992).


Outra análise que, atualmente vem sendo realizada é a verificação da informatividade do loco e do *primer* na análise de divergência genética (PIC, do inglês *Polymorphic Index Content*). A informatividade do loco p_i é a frequência do alelo p no loco p_i , calculado pela equação: $I = 1 - \sum_i p_i^2$, e a informatividade do *primer* p_{ij} é a frequência do alelo p do loco i , no *primer* j , sendo calculada pela equação: $I = 1 - \sum_i \cdot \sum_j p_{ij}^2$.

Análises tipo *bootstrap* também vem sendo realizadas atualmente e tem por objetivo verificar qual o número mínimo de bandas polimórficas necessárias para que a formação dos grupos seja confiável. Nesta metodologia, são realizadas inúmeras reamostragens, utilizando sempre um número crescente de bandas para obter valores de correlação entre as reamostragens. O método não é limitado pelo número de unidades reamostradas e pode fornecer várias novas estimativas para uma melhor aproximação da distribuição dos grupos no dendograma. Ao invés de formar novas reamostragens através da omissão de uma banda por vez, o *bootstrap* realiza sorteios ao acaso das bandas realizando novas análises até atingir o número máximo de bandas utilizados para a análise de divergência genética. A cada análise são gerados novos valores de correlação e conseqüentemente, novas somas de quadrados dos desvios. O número mínimo de bandas para a formação de agrupamentos é considerado confiável quando os valores de correlação e das somas dos quadrados dos desvios não sofrem variações significativas. O valor máximo de correlação é igual a 1, sendo encontrado quando a análise *bootstrap* utiliza o número máximo de bandas

polimórficas que originou o agrupamento original. Da mesma forma, o valor máximo encontrado para a soma dos quadrados dos desvios é igual a zero (Wier, 1990).

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFENAS, A. C. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microorganismos**. 1998. 574 p. Dissertação (Mestrado em Genética) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- BORGATTO, F.; DIAS, C. T. dos S.; AMARAL, A. F. C.; MELO, M. Calcium, potassium and magnesium treatment of *Chrysanthemum morifolium* cv. “Bi Time” and callogenesis *in vitro*. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 59, n. 4, p. 669-693, Oct./Dec. 2002.
- CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.) **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPQ, 1998. p. 87-132.
- CARLSON, J. D.; WHALON, M. E.; GLAUBITZ, J. C.; LUK, V. W. K.; KAUFFELDT, C.; RUTLEDGE, R. Segregation of random amplified DNA markers in F1 progeny of conifers. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 83, n. 2, p. 194-200, 1991.
- CENIS, J. L.; PEREZ, P.; FERERES, A. Identification of aphid (Homóptera: Aphididae) species and clones by random amplified polymorphic DNA. **Annals of the Entomological Society of America**, Lanham, v. 85, n. 5, p. 545-550, Sept. 1993.
- CHU, C. Y.; HUANG, M. C. *In vitro* formation of gerbera (*Gerbera hybrida* Hort.) plantlets through excised scape culture. **Journal of the Japanese Society for Horticultural Science**, Taiwan, v. 52, n. 1, p. 45-50, 1983.
- CRUZ, C. D.; REGAZZI, A. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Viçosa: UFV, 1994. 390 p.
- DEBERGH, P. C.; MAENE, L. J. A scheme for the commercial propagation of ornamental plants by tissue culture. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 14, n. 4, p. 335-345, 1981.



DEBERGH, P. C.; MAENE, L. J. Pathological and physiological problems related to *in vivo* culture of plant. **Parasitica**, Gembloux, v. 40, n. 1, p. 69-75, 1984.

DEBERGH, P. C.; AITKEN-CHRISTIE, I.; COHEN, D.; GROUT, B. VON ARNOLDS, S.; ZIMMERMAN, R.; ZIV, M. Reconsideration of the term vitrification as used in micropropagation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 30, n. 2, p. 135-140, Aug. 1992.

DESJARDINS, Y.; GOSSELIN, A.; YELLE, S. Acclimatization of *ex vitro* strawberry plantlets in CO₂-enriched environments and supplementary lighting. **Journal of American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 112, n. 5, p. 846-851, Sept. 1987.

DIAS, L. A. S.; KAGEYAMA, P. Y. Multivariate genetic distance and hybrid performance of cacao (*Thebroma cacao*). **Brazil Journal of Genetic**, Ribeirão Preto, v. 20, n. 1, p. 63-70, Mar. 1998.

DREW, R. A. Rapid clonal propagation of papaya *in vitro* from mature fieldgrown trees. **HortScience**, Alexandria, v. 23, n. 3, p. 609-611, June 1988.

ECHEVERRIGARAY, S.; ANDRADE, L. B.; DELAMARE, A. P. L.; ZENI, A, L. B.; CARRER, R. Cultura de tecidos e micropropagação de plantas aromáticas e medicinais. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Biotecnologia na agricultura e na agroindústria**. Guaíba: Agropecuária, 2001. p. 257-276.

FERREIRA, M. E.; GRATAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análises genéticas**. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. p. 220. (EMBRAPA – CENARGEN. Documento, 20).

GASPAR, T.; HOFINGER, M. Auxin metabolism during adventitious rooting. In: DAVIS, T. D.; HAISSING, B. E.; SANKHLA, N. **Adventitious root formation in cuttings**. Portland: Dioscorides, 1988. v. 2, p. 88-101.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture**. Part 1 – The Technology. Edington: Exegetics, 1996. 574 p.

GEORGE, E. F.; SHERRINGTON, P. D. **Plant propagation by tissue culture: handbook and directory of commercial laboratories**. Eversley Exegetics, 1984.

- GERSTENBERGER, K; SIGMUND, I. **European Horticultural Statistics – Non – Edible Products**, Hannover-Germany: Association Internationale des producteurs de L'Horticulture, Institut fur Gartenbauökonomie University, 1980. p. 173. (Institut fur Gartenbauökonomie University, 28).
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.) **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPH, 1998. v. 1, p. 183-260.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.) **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-CBAB, 1998. p. 331-353.
- HEDTRICH, C. M. Production of shoots from leaves and production of *Gerbera jamesonii*. **Gartenbauwissenschaft**, Weihenstephan, v. 44, n. 1, p. 1-3, 1979.
- IBRAFLOR. **Análise conjuntural das exportações de flores e plantas ornamentais do Brasil**. Disponível em: <<http://www.ibraflor.com.br>>. Acesso em: 15 jun. 2005.
- INFOAGRO. **El cultivo de la Gerbera**. Disponível em: <<http://www.infoagro.com>>. Acesso em: 10 maio 2005.
- KRZANOWSKI, W. J. **Principles of multivariate analysis: a user's perspective**. Oxford: Oxford Science, 1998. 563 p.
- LALIBERTE, S.; CHRETIEN, L.; VIETH, J. *In vitro* plantlet production from young capitulum explants of *Gerbera jamesonii*. **HortScience**, Alexandria, v. 20, n. 1, p. 137-139, Feb. 1985.
- LOPES, S. C.; LAMEIRA, O. A.; FORTES, G. R. L.; NOGUEIRA, R. C.; PINTO, J. E. B. P. Enraizamento *in vitro* de mogno (*Swietenia macrophylla* King). **Cerne**, Lavras, v. 7, n. 1, p. 124-128, 2001.
- LOXDALE, H. D.; BROOKES, C. P.; DE BARROS, P. J. Application of novel molecular markers (DNA) in agricultural entomology. In: SYMONDSON, W. O. C.; LIDDELL, J. E. **The ecology of agricultural pests: biochemical approaches**. London: Chapman & Hall, 1996. p. 149-212.
- LOXDALE, H. D.; LUSHAI, G. Molecular markers in entomology. **Bulletin of Entomological Research**, London, v. 88, n. 6, p. 577-600, Dec. 1998.

- MASCARINI, L. El cultivo de la gerbera en substrato. **Revista Horticultura Internacional**, Lima, n. 19, p. 86-88, 1998.
- McCOWN, B. H. Adventitious rooting of tissue cultured plants. In: DAVIS, T. D.; HAISSING, B. E.; SANKHLA, N. (Ed.). **Adventitious root formation in cuttings**. Portland: Diocorides, 1988. p. 289-302.
- MOHAMED-YASSEEN, Y. Influence of agar and activated charcoal on uptake of gibberellin and plant morphogenesis *in vitro*. **In vitro Cellular and Developmental Biology, Wallington**, v. 37, n. 2, p. 204-205, Mar./Apr. 2001.
- MULLIS, K.; FALOONA, F. Specific synthesis of DNA *in vitro* path a polimerase catalysed chain reaction. **Methods in Enzymology**, New York, v. 55, p. 335-350, 1987.
- MURASHIGE, T.; SERPA, M.; JONES, J. B. Clonal multiplication of gerbera through tissue culture. **HortScience**, Alexandria, v. 9, n. 3, p. 175-180, June 1974.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, Mar. 1962.
- OPTIZ, R. Balanço brasileiro do agronegócio 2004. **Revista Agrobrasil**, v1, n. 1, p. 96-101, dez. 2004.
- PASQUAL, M.; HOFFMANN, A.; RAMOS, J. D. **Cultura de tecidos vegetais: tecnologia e aplicações: introdução: fundamentos básicos**. Lavras: UFLA/FAEPE, 1997. 159 p.
- PAWLOWSKA, H. Trials on gerbera propagation *in vitro*. **Referativnyi Zhurnal**, Moskva, v. 21, n. 2, p. 177-81, 1977.
- PIERIK, R. L. M. **Cultivo *in vitro* de las plantas superiores**. Martins Nijoff, 1990. 326 p.
- 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, v. 3, n. 4, p. 351-357, 1975.

- PIERIK, R. L. M.; SEGERS, T. A. *In vitro* culture of midrib explants of gerbera: adventitious root formation and callus induction. **Zeitschrift fur Pflanzenphysiologie**, Stuttgart, v. 69, n. 3, p. 204-212, 1973.
- PORNKULWAT, S.; SKODA, S. R.; THOMAS, G. D.; FOSTER J. E. Random amplified polymorphic DNA used it identify genetic variation in ecotypes of the European corn borer. **Annals of the Entomological Society of America**, Lanham, v. 91, n. 5, p. 719-725, Sept. 1998.
- ROHLF, F. J. **Numerical taxonomy and multivariate analysis system: Version 1. 70**. New York, 1992. 470 p.
- RUFFONI, B.; DAMIANO, C.; SILVANO, G.; BREGLIANO, R. The sterilization and micropropagation of *Gerbera jamesonii* hybrida. **Annali dell Istituto Sperimentale per la Floricoltura**. San Remo, v. 18, n. 1, p. 21-42, 1987.
- SAWA, K. The culture of pith from rhizome of gerbera *in vitro*. **Agriculture and Horticulture**, Seibundo Sinkoshia, v. 32, n. 3, p. 50-51, 1977.
- SEABROOK, J. E. A. Laboratory culture. In: STABA, E. J. (Ed.). **Plant tissue culture as a source of biochemicals**. Boca Raton: CRP Press, 1980. p. 1-20.
- S & G FLOWERS. *Gerbera jamesonii*. Disponível em: <<http://www.sg-flowers.com>>. Acesso em: 10 maio 2005.
- SMITH, R. M. **Plant tissue culture: techniques and experiments**. San Diego: Academic Press, 1992. 171 p.
- SOKAL, R. R.; MICHENER. C. D. A statistical methods for evaluating systematic relationships. [**University Science Bulletin**], Kansas, v. 38, p. 1409-1438, 1958.
- SUAZO, A.; McTIERNAM, R.; HALL, H. G. Differences between african and european honey bee in random amplified polymorphic DNA. **Journal of Heredity**, Cary, v. 80, n. 1, p. 32-36, Jan./Feb. 1998.
- SYMONDSON, W. O. C.; LIDDELL, J. E. **The ecology of agricultural pests: biochemical approaches**. London: Chapman & Hall, 1996. 517 p.

TEIXEIRA, J. B. Limitações ao processo de cultivo *in vitro* de espécies lenhosas. EMBRAPA-DF. Disponível em: <[http://www. redbio. org/portal/encuentros](http://www.redbio.org/portal/encuentros)>. Acesso em: 08 mar. 2004.

THORMANN, C. E.; FERREIRA, M. E.; CAMARGO L. E. A.; TIVANG, J. G.; OSBORN, T. C. Comparison of RFLP and RAPD markers to estimating genetic relationship within and among cruciferous species. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 88, n. 8, p. 973-980, Sept. 1994.

TINGEY, S. V.; TUFO, J. P. DEL. Genetic analysis with random amplified polymorphic DNA marked. **Plant Physiology**, Rockville, v. 101, n. 2, p. 349-352, Apr. 1993.

TORRES, A. C.; BARBOSA, N. V. DOS R.; WILLADINO, L.; GUERRA, M. P.; FERREIRA, C. F.; PAIVA, S. A. V. de. **Meio e condições de incubação para a cultura de tecidos de plantas: formulações de meio de cultura de tecidos de plantas**. 19 p. Brasília-DF, 2001. 19 p. (Circular técnica, n. 24).

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; FERREIRA, A. T. Retrospectiva da cultura de tecidos de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.) **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPH, 1998. v. 1, p. 11-20.

WELSH, L.; McCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary *primers*. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 18, n. 24, p. 7213-7218, Dec. 1990.

WETMORE, R. H.; RIER, J. P. Experimental induction of vascular tissues in callus of angiosperms. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 50, n. 5, p. 418-430, May 1963.

WIER, B. S. **Genetic data analysis: methods for discrete population genetic data**. Massachusetts, Sunderland: Sinauer, 1990. 377 p.

WILLIAMS, J. G. K.; KUBERLIK, A. R.; LIVAK, K. L.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. V. DNA polymorphism amplified with arbitrary *primers* are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 18, n. 22, p. 6531-6535, Nov. 1990.

ZIMMERMAN, R. H. Micropropagation of fruit plants. **Acta Horticulturae**, Wageningen, n. 120, p. 217-222, 1981.

ZIMMERMAN, R. H. Micropropagation of woody plants: Post tissue culture aspects. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v. 227, p. 261-267, Mar. 1989.

ZIV, M. *In vivo* hardening and acclimatization of tissue plants. In: WITHERS, L. A.; ALDERSON, P. G. (Ed.). **Plant tissue culture and its agricultural applications**. London: Butterworths, 1987. p. 187-196.

**CAPÍTULO II: CONTROLE DA CONTAMINAÇÃO NO
ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE CAPÍTULOS FLORAIS DE
*Gerbera jamesonii***

1 RESUMO

REZENDE, Rodrigo Kelson Silva. Controle da contaminação no estabelecimento *in vitro* de capítulos florais de *Gerbera jamesonii*. In: **Aspectos do cultivo *in vitro* e divergência genética em gérbera (*Gerbera jamesonii*)**. 2005, p.28 – 40. (Mestrado em Agronomia/Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

A micropropagação vem sendo aplicada com sucesso para a propagação em larga escala de um grande número de espécies ornamentais. Nesse processo, a desinfestação de explantes é uma das etapas fundamentais para o sucesso do cultivo *in vitro*. Objetivou-se estabelecer um protocolo eficiente de desinfestação de capítulos florais de gérbera pela utilização de diferentes concentrações de hipoclorito de sódio, combinadas com diferentes tempos de imersão. Foram coletados capítulos florais de *Gerbera jamesonii* cv. Jaguar Red, com duas ou três fileiras de flores abertas, tendo sido retiradas as lígulas e todas as flores do centro do capítulo. Os capítulos foram imersos em álcool etílico 70% (v/v) durante 1 minuto e submetidos a diferentes tratamentos, combinando diferentes concentrações de hipoclorito de sódio (1%; 1,5% e 2% de cloro ativo) com três tempos de imersão (30, 45 e 60 minutos), adotando-se o esquema fatorial 3 X 3, mais o controle. Posteriormente, cada capítulo foi lavado em água destilada por três vezes, cortado radialmente em quatro partes e inoculadas em meio MS sólido, com 50% de sua concentração original e suplementado com 6,0 mg L⁻¹ de BAP, 0,5 mg L⁻¹ de AIA, 30 g L⁻¹ de sacarose, tendo seu pH ajustado para 6,0. O experimento foi mantido em sala de crescimento a 25 ± 2°C de temperatura, por um período de 4 semanas, na ausência de luz e, posteriormente, 4 semanas sob fotoperíodo de 16 horas e irradiância de fótons de 43 μmol m⁻² s⁻¹. Obtiveram-se 83% de capítulos sadios com brotações, quando os mesmos foram imersos durante 60 minutos em 2% de cloro ativo, indicando ser esse o tratamento a ser adotado para a desinfestação dessa espécie.

* Comitê Orientador: Luciano Vilela Paiva – UFLA (Orientador), Renato Paiva (Co-Orientador) – UFLA.

2 ABSTRACT

REZENDE, Rodrigo Kelson Silva. Control of contamination during *in vitro* establishment of capitulum explants of *Gerbera jamesonii*. In: *Aspects of the in vitro cultivation and genetic divergence in gerbera (Gerbera jamesonii)*. 2005, p.28 - 40. (Master Program in Agronomy/Plant Physiology) - Federal University of Lavras, Lavras, MG. *

Micropropagation has been applied successfully to propagate in large scale a great number of ornamental species. In this process of explants desinfection the main step to achieve the success of this system. This work aimed to establish an efficient protocol to desinfect gerbera capitulum explants by using different concentrations of sodium hypochlorite, combined with different periods of immersion. Capitulum explants of *Gerbera jamesonii* cv. Jaguar Red were collected with two or three whorls of open flowers, with ligules and all central flowers being removed. The capitulum explants were immersed in ethanol 70% (v/v) for 1 minute and applied to different treatments, combining different concentrations of sodium hypochlorite (1; 1,5 and 2% of active chlorine) with three periods of immersion (30, 45 and 60 minutes) a factorial 3 X 3, plus the control. Thus, each capitulum explants was rinsed three times in distilled water by three times, symmetric divided in four fragments and inoculated in MS solid medium, at 50% of your original concentration and supplied with 6,0 mg L⁻¹ of BAP, 0,5 mg L⁻¹ of IAA, 30 g L⁻¹ of sucrose, and the pH adjusted to 6,0. The experiment was maintained in growth chamber at 25 ± 2°C for a period of 4 weeks, in the absence of light and later 4 weeks under photoperiod 16 hours and 43 mmol m⁻² s⁻¹ of photon irradiation. It was obtained 83% of healthy capitulum explants with shoots, when the same ones were immersed for 60 minutes at 2% of active chlorine, suggesting this is the best treatment to be adopted for the desinfection of this species.

* Guidance Committee: Luciano Vilela Paiva – UFLA (Adviser), Renato Paiva (Co-Adviser) – UFLA.

3 INTRODUÇÃO

A aplicação da técnica de propagação vegetativa *in vitro* em várias espécies freqüentemente encontra problemas de contaminação no início das culturas (Murashige, 1977). Esses se agravam nos trópicos úmidos, onde o clima favorece a proliferação de microrganismos (Enjaric et al., 1988).

A contaminação em cultura de tecidos pode originar-se de duas fontes: microrganismos presentes na superfície ou no interior do explante, ou por meio de falhas nos métodos de assepsia. Assim, o meio de cultura pode desenvolver flora endofítica de diversas espécies que incluem vírus, viróides, bactérias e fungos.

No estabelecimento da cultura, dependendo do tipo de explante usado, microrganismos superficiais e endofíticos podem ser levados para a cultura *in vitro*. A maioria dos microrganismos pode ser eliminada via cultura de meristema, enquanto, a partir de folhas, pecíolos ou explantes nodais, muitos ou quase todos os microrganismos, podem ser levados para a cultura (Cassells et al., 1988).

O descontaminante mais utilizado na cultura de tecidos é o hipoclorito de sódio ou de cálcio, diluído em água com cerca de 1% de cloro ativo. Para melhorar o contato com a superfície do explante, o tratamento com hipoclorito é freqüentemente precedido por uma lavagem em álcool. O etanol remove parcialmente ceras hidrofíticas e resinas que protegem os microrganismos do contato com o descontaminante (Bonga & Von Aekas, 1992).

Neste trabalho, optou-se pela utilização de capítulos florais de gérbera como fonte inicial de explantes para o cultivo *in vitro*. Dessa forma, reduziu-se o número de plantas matrizes, bem como evitou-se a destruição das mesmas.

Objetivou-se estabelecer um protocolo eficiente de desinfestação de capítulos florais de gérbera por meio da utilização de diferentes concentrações de hipoclorito de sódio, combinadas com diferentes tempos de imersão.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas, no setor de Fisiologia Vegetal do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, MG.

4.1 Material vegetal

Plantas matrizes de *Gerbera jamesonii* cv. Jaguar Red foram cedidas pela empresa Multiflores, localizada em Lavras, MG.

Foram coletados capítulos florais, com duas ou três fileiras de flores abertas, tendo sido retiradas as lígulas e todas as flores do centro do capítulo.

4.2 Controle da contaminação no estabelecimento *in vitro* de capítulos florais

Após a coleta, os capítulos foram lavados em água corrente com auxílio de peneira durante 10 minutos e, posteriormente, em água destilada, durante 2 minutos.

Os capítulos foram imersos em álcool etílico 70% (v/v), durante 1 minuto e submetidos a diferentes tratamentos, combinando diferentes concentrações de hipoclorito de sódio (1%; 1,5% e 2% de cloro ativo) com três tempos de imersão (30, 45 e 60 minutos) adotando-se o esquema fatorial 3 X 3, mais o controle, totalizando 10 tratamentos e 12 repetições, contendo um explante em cada recipiente (Tabela 1).

TABELA 1 Tratamentos obtidos por meio da interação entre diferentes concentrações de hipoclorito de sódio e diferentes tempos de imersão. UFLA, Lavras, MG, 2005.

Tratamento	Hipoclorito de sódio (% de cloro ativo)	Tempo de imersão (min)
T0	0	0
T1	1,0	30
T2	1,0	45
T3	1,0	60
T4	1,5	30
T5	1,5	45
T6	1,5	60
T7	2,0	30
T8	2,0	45
T9	2,0	60

Posteriormente, cada capítulo foi lavado em água destilada por três vezes, cortado radialmente em quatro partes e inoculados em meio MS (Murashige & Skoog, 1962) sólido, com 50% de sua concentração original e suplementado com 6,0 mg L⁻¹ de BAP, 0,5 mg L⁻¹ de AIA, 30 g L⁻¹ de sacarose, tendo seu pH ajustado para 6,0 ± 0,1, antes da adição do ágar, utilizando-se KOH ou HCl 0,1 N (Arelló, 1998). A esterilização dos meios de cultura foi feita por autoclave, à temperatura de 121°C e à pressão de 1,05 kg.cm⁻², durante 20 minutos.

Os recipientes contendo os explantes foram mantidos em sala de crescimento a 25 ± 2°C de temperatura, por um período de 4 semanas, na ausência de luz e, posteriormente, 4 semanas sob fotoperíodo de 16 horas e irradiância de fótons de 43 μmol m⁻² s⁻¹. Após 30 dias da inoculação, avaliou-se visualmente a porcentagem de explantes saudáveis.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Controle da contaminação no estabelecimento *in vitro* de capítulos florais

Os resultados revelam considerável variação na porcentagem de explantes saudáveis durante a imersão de capítulos florais de gérbera em hipoclorito de sódio (Figura 1).

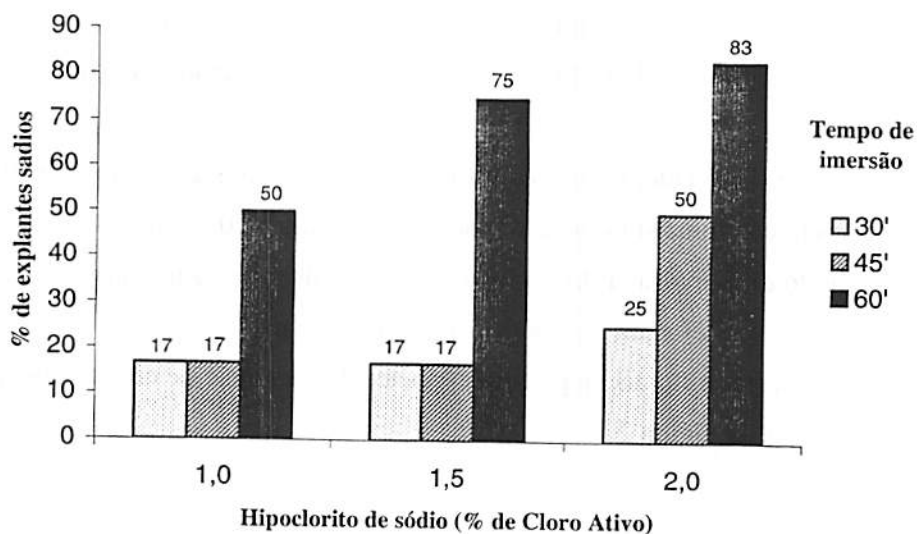


FIGURA 1 Porcentagem de explantes saudáveis obtidos por meio da interação entre diferentes concentrações de hipoclorito de sódio e diferentes tempos de imersão. UFLA, Lavras, MG, 2005.

Com base nos resultados observados neste experimento, sugere-se que se utilize o hipoclorito de sódio (2,0% de cloro ativo) durante um período de 60 minutos para a desinfestação de capítulos florais de gérbera, promovendo a obtenção de 83% de explantes saudáveis.

Vários autores utilizaram o hipoclorito de sódio, com sucesso, para a desinfestação de capítulos florais.

Pierik et al. (1975), trabalhando com micropropagação de gérbera por meio de capítulos florais utilizaram o hipoclorito de sódio (1,5% de cloro ativo) durante 90 minutos, resultando em apenas 5% a 10% de contaminação.

Laliberte et al. (1985) empregaram a mesma metodologia descrita anteriormente para desinfestação de capítulos florais de gérbera, sem, no entanto, mencionar a eficiência da mesma. Já Barbosa (1991) obteve uma eficiência de 75% na desinfestação de capítulos florais de gérbera cv. Appel Bloesem, utilizando hipoclorito de sódio (1,5% de cloro ativo) por vinte minutos.

Por outro lado, Radice & Marconi (1998) desinfestaram capítulos florais de gérbera com uma solução de hipoclorito de sódio a 20%, durante 20 minutos e bicloreto de mercúrio a 0,1% (solução aquosa) durante 10 minutos. Os autores também não mencionam a eficiência da metodologia.

Capítulos florais de gérbera estabelecidos em meio de cultura podem ser visualizados na Figura 2.

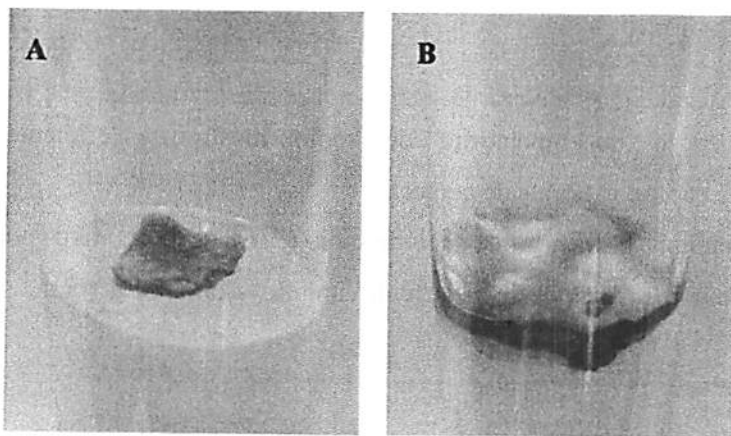


FIGURA 2 Capítulos florais de gérbera estabelecidos *in vitro*, após serem tratados com hipoclorito de sódio (2,0% de cloro ativo) durante 60 minutos, sem contaminação (A) e contaminado por fungo (B). UFLA, Lavras, MG, 2005.

6 CONCLUSÕES

A utilização do hipoclorito de sódio mostrou-se eficiente na desinfestação de capítulos florais de gérbera.

Recomenda-se utilizar hipoclorito de sódio (2,0% de cloro ativo) por um período de 60 minutos para a desinfestação de capítulos florais de gérbera.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARELLO, E. F. Gérbera (*Gerbera jamesonii* Bolus ex Hook). In: TOMBOLATO, A. F. C.; COSTA, A. M. M. **Micropropagação de plantas ornamentais**. Campinas: Instituto Agronômico, 1998. p. 29-31. (Boletim técnico, 174).
- BARBOSA, M. H. P. **Propagação *in vitro* de *Gerbera jamesonii* Bolus ex Hook através de capítulos jovens**. 1991. 48 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras, MG.
- BONGA, J. M.; VON ADEKAS, P. ***In vitro* culture of tree**. The Netherlands: Kluwer Academic Publish, 1992. 236 p. (Forestry Science, v. 38).
- CASSELLS, A. C.; HARMEY, M. A.; CARNEY, B. F. Problems posed by cultivable bacterial endophytes in the establishment of axenic culture of *Pelargonium domesticum*: the use of *Xantomonas pelargonii*-specific ELISA, DNA probes and culture indexing in the screening of antibiotic treated and untreated donor plant. **Acta Horticulturae**, Wageningen, n. 225, p. 153-162, 1988.
- ENJARIC, F.; CARRON, M. P.; LARDET, L. Contamination of primary cultures in tropical areas: the case of *Hevea brasiliensis*. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v. 225, p. 57-65, 1988.
- LALIBERTE, S.; CHRETIEN, L.; VIETH, J. ***In vitro* plantlet production from young capitulum explants of *Gerbera jamesonii***. **HortScience**, Alexandria, v. 20, n. 1, p. 137-139, Feb. 1985.
- MURASHIGE, T. Plant cell culture as horticultural practices. **Acta Horticulturae**, Amsterdam, n. 78, p. 17-30, 1977.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497. Mar. 1962.

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, v. 3, n. 4, p. 351-357, 1975.

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

**CAPÍTULO III: ASPECTOS DO CULTIVO *IN VITRO* A PARTIR DE
CAPÍTULOS FLORAIS E DA ANATOMIA FOLIAR DE *Gerbera*
*jamesonii***

1 RESUMO

REZENDE, Rodrigo Kelson Silva. Aspectos do cultivo *in vitro* a partir de capítulos florais e da anatomia foliar de *Gerbera jamesonii*. In: **Aspectos do cultivo *in vitro* e divergência genética em gérbera (*Gerbera jamesonii*)**. 2005, p.41 – 71. (Mestrado em Agronomia/Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

Este trabalho teve por objetivo determinar um protocolo de micropropagação por organogênese indireta a partir de capítulos florais de gérbera, avaliar o efeito de diferentes doses de ANA no enraizamento *in vitro*, bem como aclimatizar as plântulas desenvolvidas *in vitro* e comparar as características anatômicas de folhas de gérbera obtidas *in vitro* com as folhas mantidas em condições *in vivo*. Capítulos florais de gérbera foram inoculados em meio MS sólido, com 50% de sua concentração original e suplementado com 6,0 mg L⁻¹ de BAP, 0,5 mg L⁻¹ de AIA, 30 g L⁻¹ de sacarose, tendo seu pH ajustado para 6,0. As brotações obtidas, apresentando, em média, 3 a 4 folhas, foram inoculadas em meio MS sólido com 50% de sua concentração original suplementados com diferentes concentrações de ANA (0,0; 2,0 e 4,0 mg L⁻¹), 30 g L⁻¹ de sacarose e 1 g L⁻¹ de carvão ativado, e pH 5,6 ± 0,1. Após serem mantidas por 30 dias no meio de cultura para enraizamento, as plântulas foram transferidas para tubetes contendo substrato e foram cobertas com saco plástico. Para a realização dos estudos anatômicos, folhas completamente expandidas foram coletadas ao acaso de plantas matrizes de gérbera mantidas em casa de vegetação e das plântulas obtidas pelo cultivo *in vitro*. Obtiveram-se em média, 3,2 brotações e 6,6 folhas a partir da indução de calos em capítulos florais de gérbera. Foi observada a formação de raízes na ausência e na presença de ANA, obtendo-se 100% de enraizamento. A suplementação do meio de cultura com doses crescentes de ANA promoveu um aumento linear no número de raízes e comprimento médio de raízes. As plântulas provenientes do cultivo *in vitro* apresentaram uma taxa de 100% de sobrevivência na aclimatização. As estruturas foliares desenvolvidas *in vivo* apresentaram as epidermes adaxial e abaxial, parênquimas paliçádico e esponjoso mais espessos que no cultivo *in vitro*. O sistema vascular observado em folhas produzidas *in vivo* é mais desenvolvido que *in vitro*. Não foi observada a ocorrência de vitrificação em plântulas de gérbera cultivadas *in vitro*.

* Comitê Orientador: Luciano Vilela Paiva – UFLA (Orientador), Renato Paiva (Co-Orientador) – UFLA.

2 ABSTRACT

REZENDE, Rodrigo Kelson Silva. Aspects of the *in vitro* cultivation from capitulum explants and of the foliar anatomy of *Gerbera jamesonii*. In: **Aspects of the *in vitro* cultivation and genetic divergence in gerbera (*Gerbera jamesonii*)**. 2005, p.41 - 71. (Master Program in Agronomia/Fisiologia Vegetal) - Federal University of Lavras, Lavras, MG. *

This work had the objective to establish a micropropagation protocol for indirect organogenesis from capitulum explants of gerbera, to evaluate the effect of different levels of NAA in the *in vitro* rooting, as well as to acclimatize the seedlings developed *in vitro* and to compare the anatomical characteristics of leaves of gerbera obtained *in vitro* with the leaves maintained *in vivo* conditions. Capitulum explants of gerbera were inoculated in MS solid medium at 50% of your original concentration and supplied with 6,0 mg L⁻¹ of BAP, 0,5 mg L⁻¹ of IAA, 30 g L⁻¹ of sucrose, being the pH adjusted to 6,0. The resulting shoots, showing on average of 3 to 4 leaves were inoculated in MS solid medium at 50% of your original concentration supplied with different concentrations of NAA (0,0; 2,0 and 4,0 mg L⁻¹), 30 g L⁻¹ of sucrose and 1 g L⁻¹ of activated charcoal, and pH 5,6 ± 0,1. After 30 days in the medium to promote rooting, they were transferred to planting tubes containing substrate and covered with plastic bag. To carry out anatomical studies, complete expanded leaves were randomly collected from plants maintained at greenhouse and seedlings obtained by *in vitro* cultivation. The mean values were 3,2 for shoots and 6,6 for leaves starting from the induction of callus in gerbera capitulum explants. The formation of roots was observed in the presence and absence of NAA, obtaining 100% of rooting. The supplementation of NAA to the medium promoted a linear increase in the number of roots and in the mean length of roots. Seedlings from the *in vitro* cultivation showed a rate of 100% of survival in the acclimatization. The foliar structures developed *in vivo* showed adaxial epidermis, palisade parenchyma, spongy parenchyma and abaxial epidermis thicker than in the *in vitro* cultivation. The vascular system observed in leaves produced *in vivo* is more developed than *in vitro*. It was not observed the effect of vitrification in seedlings of gerbera cultivated *in vitro*.

* Guidance Committee: Luciano Vilela Paiva – UFLA (Adviser), Renato Paiva (Co-Adviser) – UFLA.

3 INTRODUÇÃO

A micropropagação vem sendo aplicada com sucesso para a propagação em larga escala de um grande número de espécies ornamentais, podendo ser realizada por organogênese ou embriogênese somática.

A micropropagação via embriogênese somática envolve o desenvolvimento de embriões a partir de células somáticas embriologicamente competentes *in vitro* (Ahuja, 1992).

Segundo Hicks (1980), a organogênese *in vitro* envolve uma variedade de seqüências complexas de desenvolvimento, resultantes da manipulação experimental de partes de uma planta, culminando na formação de primórdios de órgãos ou plantas inteiras.

Quando a organogênese ocorre a partir de tecidos do explante ou de pequenas proliferações dos mesmos, ainda sobre o explante inicial sem a formação do calo, denomina-se organogênese direta. A via indireta é caracterizada quando a organogênese ocorre a partir de calos isolados do explante inicial (Stirmart, 1986).

A organogênese envolve a diferenciação de brotações e raízes durante o desenvolvimento vegetal. Frequentemente, as brotações são induzidas em um meio de cultura enriquecido com citocininas e, subseqüentemente estas brotações são enraizadas em um meio contendo auxina.

Segundo Grattapaglia & Machado (1998), das citocininas comercialmente disponíveis, a 6-benzilaminopurina (BAP), é a que, em geral apresenta melhores resultados *in vitro* para promover a multiplicação de diversas espécies, sendo utilizada em aproximadamente 60% dos meios, seguida da cinetina (KIN), com cerca de 23%.

As auxinas mais utilizadas para a indução de raiz *in vitro* são AIA, ANA e AIB, sendo estes normalmente utilizados em baixas concentrações no meio de cultura (George & Sherrington, 1984; Zimmerman, 1981).

Certas espécies enraizam com dificuldade, ou não enraizam, mesmo na presença de auxinas e algumas espécies até dispensam o uso de auxinas no seu enraizamento (Rohr & Hanus, 1987). Alguns compostos podem ser adicionados ao meio de cultivo para auxiliar a indução da rizogênese. Uma das substâncias mais utilizadas é o carvão ativado em concentrações que variam em torno de 0,1% a 2% (p/v).

O carvão ativado é utilizado para estimular a condição de escuro no qual as raízes normalmente se desenvolvem. Em termos químicos, o carvão ativado exerce um efeito de retenção de alguns componentes do meio de cultivo, como a fixação de citocininas residuais liberadas pelos tecidos vegetais e compostos tóxicos inibidores do enraizamento. O carvão ativado pode fixar também auxinas e reter fenóis oxidantes, sendo, de forma geral, benéfico, promovendo o alongamento das raízes (Drew, 1988; Mohamed-Yasseen, 2001).

Após a etapa de enraizamento, as plântulas devem ser aclimatizadas para terem condições de sobreviver em ambiente com alta luminosidade e baixa umidade. A aclimatização envolve o transplântio da plântula da condição *in vitro* para a casa de vegetação que, geralmente, consiste de uma fase crítica e que pode ser um fator limitante para o processo de micropropagação de algumas espécies (Torres et al., 1998).

A avaliação das mudanças estruturais que ocorrem em um tecido ou órgão formado em condições *in vitro* é de grande valia para se descobrir a real eficiência do processo organogênético e a funcionabilidade do novo órgão, tornando-se pré-requisito indispensável para o desenvolvimento de protocolos de micropropagação de plantas (Soares, 2003).

Os objetivos do presente trabalho foram: a) determinar um protocolo de micropropagação por organogênese indireta a partir de capítulos florais de gérbera, b) avaliar o efeito de diferentes doses de ANA no enraizamento *in vitro* de gérbera, c) aclimatizar as plântulas desenvolvidas *in vitro* e d) comparar as características anatômicas de folhas de gérbera obtidas *in vitro* com as folhas mantidas em condições *in vivo*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos 4.1 e 4.2 foram realizados no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas, no setor de Fisiologia Vegetal do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, MG.

O experimento 4.3 foi realizado no Laboratório de Anatomia e Histologia Vegetal, do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, MG.

4.1 Organogênese indireta a partir de capítulos florais de gérbera

Plantas matrizes de *Gerbera jamesonii* cv. Jaguar Cream foram cedidas pela empresa Multiflores, localizada em Lavras, MG.

Foram coletados capítulos florais, com duas ou três fileiras de flores abertas, tendo sido retiradas as lígulas e todas as flores do centro do capítulo.

Após a coleta, os capítulos foram imersos em hipoclorito de sódio (2,0% de cloro ativo), por um período de 60 minutos.

Posteriormente, cada capítulo foi lavado em água destilada por três vezes, cortado radialmente em quatro partes que foram inoculadas em meio MS (Murashige & Skoog, 1962) sólido, com 50% de sua concentração original e suplementado com $6,0 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP, $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de AIA, 30 g L^{-1} de sacarose. Seu pH foi ajustado para $6,0 \pm 0,1$, antes da adição do ágar, utilizando-se KOH ou HCl 0,1 N (Arellano, 1998). A esterilização dos meios de cultura foi feita por autoclave, à temperatura de 121°C e à pressão de $1,05 \text{ kg.cm}^{-2}$, durante 20 minutos.

O experimento, constituído de 50 tubos de ensaio com 1 explante por tubo, foi mantido em sala de crescimento a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ de temperatura por um período de 4 semanas, na ausência de luz e, posteriormente, 4 semanas sob fotoperíodo de 16 horas e irradiância de fótons de $43 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

A avaliação da percentagem de capítulos florais com formação calos foi feita aos 30 e 60 dias após a inoculação, por meio de análise visual.

Foi avaliado também, por análise visual, o número médio de brotações e folhas por explante, 80 dias após a inoculação.

4.2 Efeito de diferentes doses de ANA no enraizamento *in vitro* de brotações

Brotações obtidas a partir de capítulos florais *in vitro* de *Gerbera jamesonii* cv. Jaguar Cream, obtidas no experimento 4.1, apresentando em média 3 a 4 folhas, foram inoculadas em meio de cultura MS sólido, com 50% de sua concentração original e contendo diferentes concentrações de ANA (0,0; 2,0 e $4,0 \text{ mg L}^{-1}$), 3% de sacarose e 0,1% de carvão ativado, tendo o pH ajustado para $5,6 \pm 0,1$. Após a inoculação, os explantes foram mantidos em sala de crescimento a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ de temperatura sob fotoperíodo de 16 horas e irradiância de fótons de $43 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Utilizou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado, com 10 repetições por tratamento. Trinta dias após a inoculação, foi avaliada a percentagem de enraizamento das brotações, por meio de análise visual. Das plantas que apresentaram enraizamento, coletaram-se os dados de número de raízes por explante e o comprimento de raízes, que foram submetidos à análise de variância, com realização do teste de F. Em caso de observação de diferenças significativas, efetuaram-se análises de regressão.

4.3 Aclimatização de plântulas

Plântulas desenvolvidas *in vitro*, a partir do experimento 4.2, foram utilizadas como material vegetal.

Após serem mantidas por 30 dias no meio de cultura para enraizamento, as plântulas foram transferidas para tubetes contendo o substrato comercial 30/10, da empresa Vida Verde.

Após a transferência, as plântulas foram cobertas com sacos plásticos para manter a umidade semelhante à encontrada nas condições *in vitro*, e mantidas em sala de aclimatização sob fotoperíodo de 12 horas e irradiância de fótons igual a $60\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Após um período de 14 dias, avaliou-se a taxa de sobrevivência das plântulas, levando-se em consideração o aspecto visual e o estado hídrico das mesmas.

4.4 Anatomia de folhas produzidas por cultivo *in vivo* e *in vitro*

Folhas completamente expandidas foram coletadas ao acaso, de plantas matrizes de *Gerbera jamesonii* cv. Jaguar Cream, mantidas em casa de vegetação na empresa Multiflores, localizada em Lavras, MG e das plântulas obtidas pelo cultivo *in vitro*, na ocasião de transferência das mesmas para a sala de aclimatização. As folhas foram conservadas em álcool 70% (v/v).

De cada tratamento, foram escolhidas ao acaso, cinco plantas e, de cada uma foi retirada uma folha, da qual foram extraídos segmentos de $0,5\text{cm}^2$ da região mediana. Os estudos anatômicos foram realizados com base no exame microscópico de seções obtidas à mão livre. As seções foram clarificadas em solução de hipoclorito de sódio 50% (v/v do produto comercial), por um período de 3 a 5 minutos e três lavagens em água destilada. Em seguida, o material foi

neutralizado em solução de ácido acético 1% (v/v) por 1 minuto, repetindo-se as lavagens com água destilada (Johansen, 1940; Sass, 1951). A coloração dos cortes anatômicos foi efetuada pelo processo de dupla coloração com safranina-azul de astra (Bukatsh, 1972). Finalmente, foram montadas lâminas semipermanentes do material obtido com água glicerinada 50% (v/v).

As lâminas confeccionadas com os cortes anatômicos foram utilizadas para a realização de medições de espessura das epidermes adaxial e abaxial e dos parênquimas esponjoso e paliádico, com auxílio de lente ocular micrométrica em microscópio de campo claro Carl Zeiss-amjlival. Posteriormente, estas lâminas foram fotomicrografadas utilizando-se um microscópio Olympus BX 60 e filme ASA 100 colorido.

As medições de espessura foram analisadas utilizando-se delineamento inteiramente casualizado com cinco repetições por tratamento, sendo cada repetição composta por três medidas. As médias foram comparadas pelo teste de F.

Os cortes anatômicos também foram avaliados visualmente para verificar a ocorrência ou não de vitrificação em plântulas cultivadas *in vitro*.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Organogênese indireta a partir de capítulos florais de gérbera

Pela análise da Figura 1 observa-se que 76% dos capítulos florais de gérbera formaram calos 30 dias após a inoculação, e que não houve formação de calos após este período.

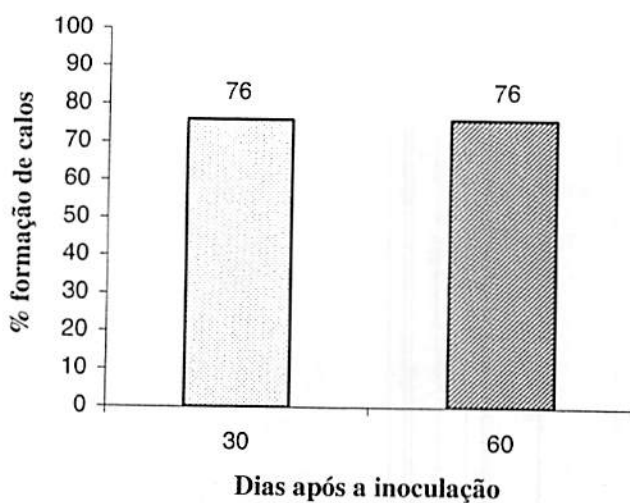


FIGURA 1 Porcentagem de capítulos florais de *Gerbera jamesonii* cv. Jaguar Cream com formação de calos, em função dos dias após a inoculação. UFLA, Lavras, MG, 2005.

O aspecto visual de um calo obtido 30 dias após a inoculação do explante inicial está ilustrado na Figura 2.

Gomes (1999) relata que as auxinas têm sido amplamente utilizadas nos meios de cultivo para a indução de calos e que a interação entre auxinas e citocininas tem sido amplamente utilizada. Santana (2003) relata que o sinergismo entre auxinas e citocininas é crítico para o controle da morfogênese *in vitro*.

Pierik et al. (1975) também obtiveram indução de calos em capítulos florais de gérbera, deixando-os armazenados 30 dias no escuro e 30 dias na presença de luz. No entanto, os autores não comentam os valores obtidos para cada período.

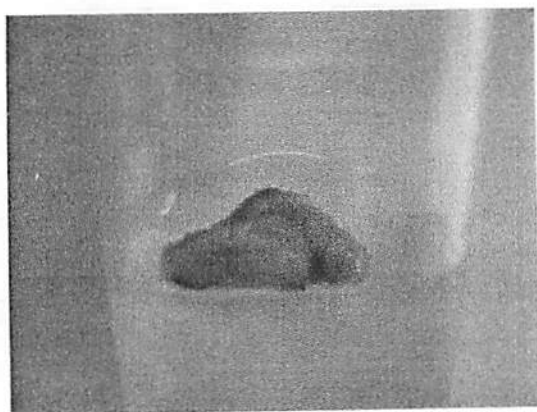


FIGURA 2 Aspectos de calos de *Gerbera jamesonii* cv. Jaguar Cream obtidos a partir de capítulos florais, 30 dias após a inoculação. UFLA, Lavras, MG, 2005.

Os resultados para o número médio de brotações e folhas, avaliados aos 80 dias após a inoculação dos explantes em meio de cultura, são mostrados no gráfico da Figura 3.

Obtiveram-se em média, 3,2 brotações e 6,6 folhas por explante, a partir da indução de calos em capítulos florais de gérbera.

Esse resultado infere na alta capacidade da gérbera em formar brotos e folhas a partir da indução de calos em capítulos florais, o que viabiliza a micropropagação da cultura.

A imagem da Figura 4 evidencia a formação de brotações e folhas a partir da indução de calos em capítulos florais de gérbera.

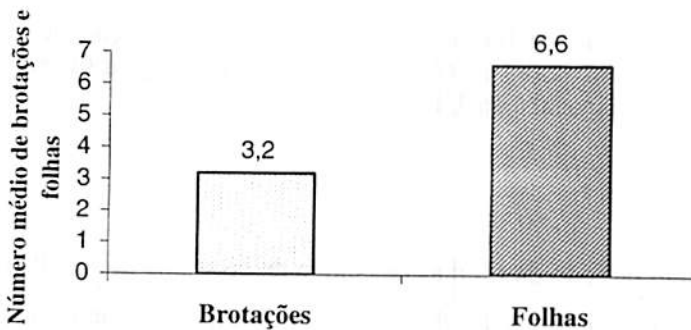


FIGURA 3 Número médio de brotações e folhas obtidos a partir da indução de calos em capítulos florais de *Gerbera jamesonii* cv. Jaguar Cream, aos 80 dias após a inoculação. UFLA, Lavras, MG, 2005.



FIGURA 4 Formação de brotos e folhas a partir da indução de calos em capítulos florais de *Gerbera jamesonii* cv. Jaguar Cream, 80 dias após a inoculação. UFLA, Lavras, MG, 2005.

Após um período de 60 dias de cultivo de capítulos florais, Pierik et al. (1975) encontraram a formação de 3 brotos por explante e esse número foi aumentado para 4 com aumento do tempo de cultivo variando de 80 a 100 dias.

Olivera et al. (2000) obtiveram diferentes respostas organogênicas para a fase de indução de brotos de *Gerbera jamesonii* com vários reguladores de crescimento. Utilizando, por exemplo, 8,8 μ molar de BA (benziladenina), os autores conseguiram 5,4 brotos e 10,8 folhas por explante.

O meio de cultura sugerido por Arello (1998) mostrou-se eficiente para promover a morfogênese de brotos e folhas *in vitro*.

De maneira geral, a suplementação do meio de cultura com diferentes tipos e concentrações de reguladores de crescimento tem influência direta no processo da morfogênese *in vitro* (Grattapaglia & Machado, 1998).

5.2 Efeito de diferentes doses de ANA no enraizamento *in vitro* de brotações

Obteve-se 100% de enraizamento das brotações, tanto na ausência (tratamento controle) como na presença de ANA (Figura 5).

Verificando-se a análise de variância (Tabela 1), observa-se que houve diferenças significativas com relação ao número de raízes e comprimento médio de raízes, em função das concentrações de ANA empregadas.

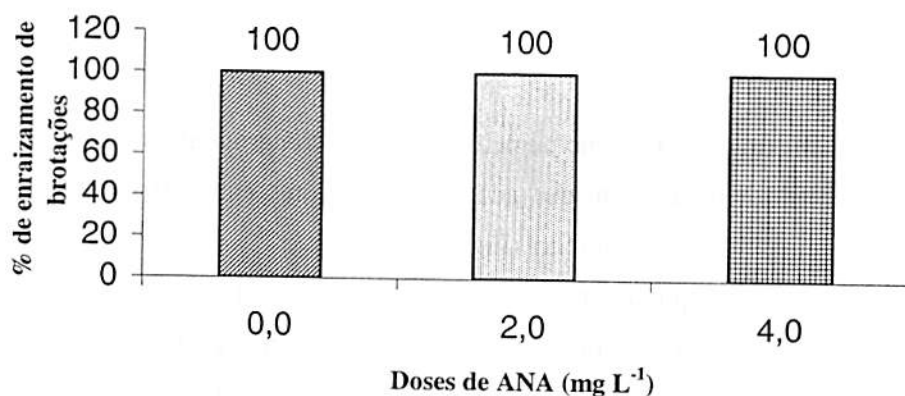


FIGURA 5 Porcentagem de enraizamento de brotações de *Gerbera jamesonii* cv. Jaguar Cream, em função de diferentes concentrações de ANA. UFLA, Lavras, MG, 2005.

TABELA 1 Resumo da análise de variância para número de raízes/explante e comprimento médio de raízes (cm) em brotações de *Gerbera jamesonii* cv. Jaguar Cream, em função de diferentes concentrações de ANA. UFLA, Lavras, MG, 2005.

Fonte de variação	GL	Quadrados médios	
		Nºraízes/explante	Comprimento médio de raízes (cm)
Concentração ANA	2	25,6333*	6,9053*
Resíduo	27	1,0407	0,4825
CV (%)		31,55	16,43

* Significativo a 1% de probabilidade, pelo teste de F.

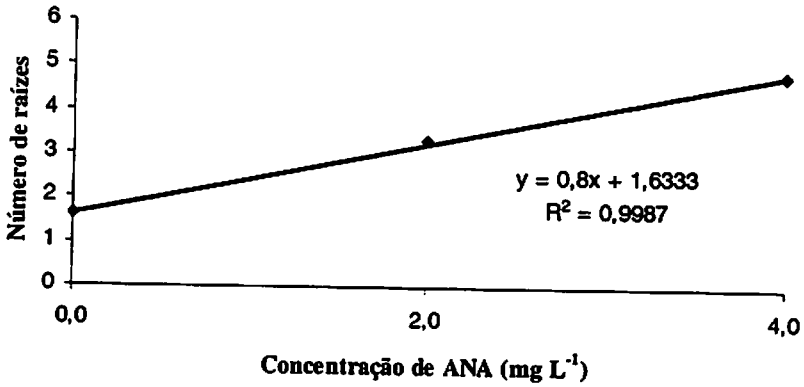
Um aumento linear no número de raízes e comprimento médio de raízes foi observado à medida em que adotaram-se maiores concentrações de ANA suplementadas ao meio de cultura (Figura 6).

No entanto, possivelmente doses de ANA superiores a 4,0 mg L⁻¹ podem aumentar a eficiência do processo, promovendo posteriormente uma estabilização e até mesmo decréscimo do número de raízes e comprimento médio de raízes. Para isso, experimentos futuros devem ser realizados.

O aspecto visual de uma plântula de gérbera em meio de cultura para indução de enraizamento e enraizada *in vitro* pode ser observado na Figura 7.

Barbosa (1991), utilizando o meio MS com metade das concentrações dos sais e suplementado com diferentes doses de ANA (0,0; 0,5; 1,0; 2,0 e 5,0 mg L⁻¹), obteve plântulas com 2,5cm de comprimento médio de raízes de *Gerbera jamesonii* cv. Appel Bloesem, 40 dias após a inoculação dos explantes em meio de cultura.

A



B

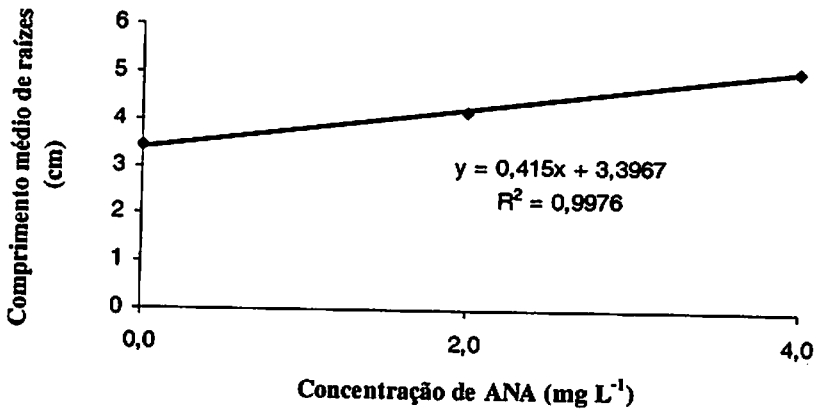


FIGURA 6 Número de raízes/explante (A) e comprimento médio de raízes (cm) (B) em brotações de *Gerbera jamesonii* cv. Jaguar Cream, em função de diferentes concentrações de ANA. UFLA, Lavras, MG, 2005.

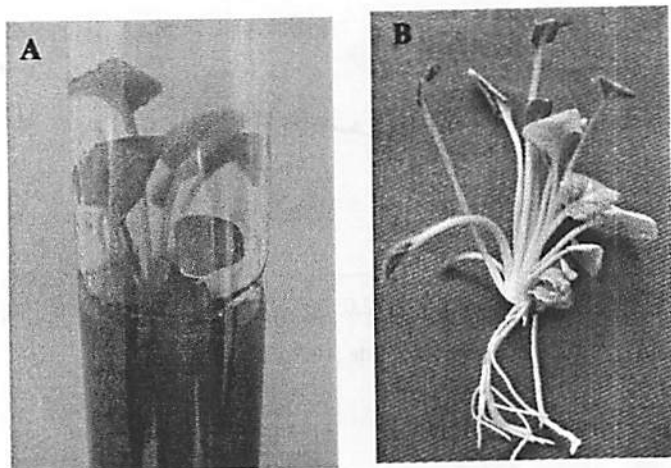


FIGURA 7 (A) - Plântula de *Gerbera jamesonii* cv. Jaguar Cream em meio de cultura para enraizamento, suplementado com $4,0 \text{ mg L}^{-1}$ de ANA. (B) - Plântula enraizada em condições *in vitro*. UFLA, Lavras, MG, 2005.

Pierik & Sprenkels (1984) trabalharam com as cultivares Fleur e Florence, utilizando o meio MS suplementado com AIA nas concentrações variando de 3 a 10 mg L^{-1} e ANA a 1 ou 3 mg L^{-1} . Os autores observaram que o ANA proporcionou 100% de enraizamento, com mais raízes por broto, para ambas as cultivares, em 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.

Laliberte et al. (1985) trabalhando com duas cultivares de gérbera, conseguiram 100% de enraizamento dos brotos em todas as concentrações de AIA ($0,00$; $0,05$; $0,10$; $0,30$; $0,50$ e $1,0 \text{ mg L}^{-1}$) estudadas. Por outro lado, Murashige et al. (1974) obtiveram 90% e 100% de plântulas enraizadas somente com níveis mais elevados de AIA, 3 e 10 mg L^{-1} , respectivamente. Esse

resultado foi observado por Petru & Matous (1984), conseguindo com nível mais elevado de AIA ($8,0 \text{ mg L}^{-1}$), 100% de enraizamento.

5.3 Aclimatização de Plântulas

A observação do aspecto visual e do estado hídrico das plantas durante o período de aclimatização indica que a metodologia descrita no tópico 4.3 foi eficiente, já que a absorção e a perda de água mostraram-se completamente reguladas, não sendo observado estado de murcha durante o período mais crítico da aclimatização. O percentual de sobrevivência foi de 100%.

Santana (2003), visando a aclimatização de plântulas de *Annona glabra* L., utilizou garrafas plásticas tipo *pet* para a manutenção da umidade relativa alta no microambiente, obtendo um percentual de sobrevivência também de 100%.

Santos (2004), fazendo o uso da mesma metodologia descrita anteriormente, também obteve sucesso na aclimatização de plântulas de pequi.

Olivera et al. (2000) relatam que a aclimatização de plântulas de gérbera foi afetada de forma significativa pelo efeito residual dos tratamentos usados durante a fase de indução de brotações e enraizamento *in vitro*, observando que, em geral, os tratamentos com cinetina propiciaram melhores resultados de sobrevivência (86,7% – 92,5%) em comparação com os de BA (benziladenina). Isso indica que a qualidade das plântulas produzidas *in vitro* repercutiu na sua capacidade de aclimatização, pois, como dito anteriormente, as produzidas mediante o uso de cinetina apresentaram melhores características qualitativas.

Aspectos gerais das plântulas de *Gerbera jamesonii* cv. Jaguar Cream aos 14 dias após a aclimatização podem ser visualizados na Figura 8.



FIGURA 8 Plântulas de *Gerbera jamesonii* cv. Jaguar Cream em aclimatização. UFLA, Lavras, MG, 2005.

5.4 Anatomia de folhas produzidas por cultivo *in vivo* e *in vitro*

Nas seções transversais das nervuras centrais de folhas de gérbera, observaram-se diferenças anatômicas entre os tecidos. As folhas do cultivo *in vitro* apresentaram feixes vasculares do tipo colateral pouco diferenciados, ao

contrário do cultivo *in vivo*, nos quais estes se apresentam em maior número e grau de diferenciação.

Santos (2001) observou que a nervura central de folhas de cafeeiro (*Coffea arabica* 'Rubi' e *Coffea canephora* 'Apoatã'), obtidas pelo cultivo *in vitro* apresentou células do xilema em menor número, tamanho e espessura que as células do xilema da nervura central de folhas cultivadas *in vivo*.

Em ambos os cultivos, a organização dos tecidos do parênquima cortical da nervura central é composta por células heterodimensionais, tornando-se mais evidente no cultivo *in vitro*. O número de células do parênquima cortical é maior no cultivo *in vivo* que no *in vitro* (Figura 9 A e C).

Quanto às seções transversais das lâminas foliares de gérbera, observou-se que, em ambos os cultivos (*in vivo* e *in vitro*), o mesofilo já se encontra diferenciado nos dois tipos de parênquima clorofiliano (parênquima paliçádico e parênquima esponjoso ou lacunoso). O mesofilo é dorsiventral, apresentando parênquima paliçádico na face superior da lâmina foliar (adaxial) e parênquima esponjoso na face inferior (abaxial) (Figura 9 B e D).

No cultivo *in vivo*, o parênquima paliçádico é constituído de uma a duas camadas de células compactas e alongadas e o parênquima esponjoso ou lacunoso é constituído de sete a oito camadas de células. Já no cultivo *in vitro*, o parênquima paliçádico apresenta-se também com uma ou duas camadas de células, mas em menor grau de diferenciação. O parênquima esponjoso é constituído de seis a sete camadas de células.

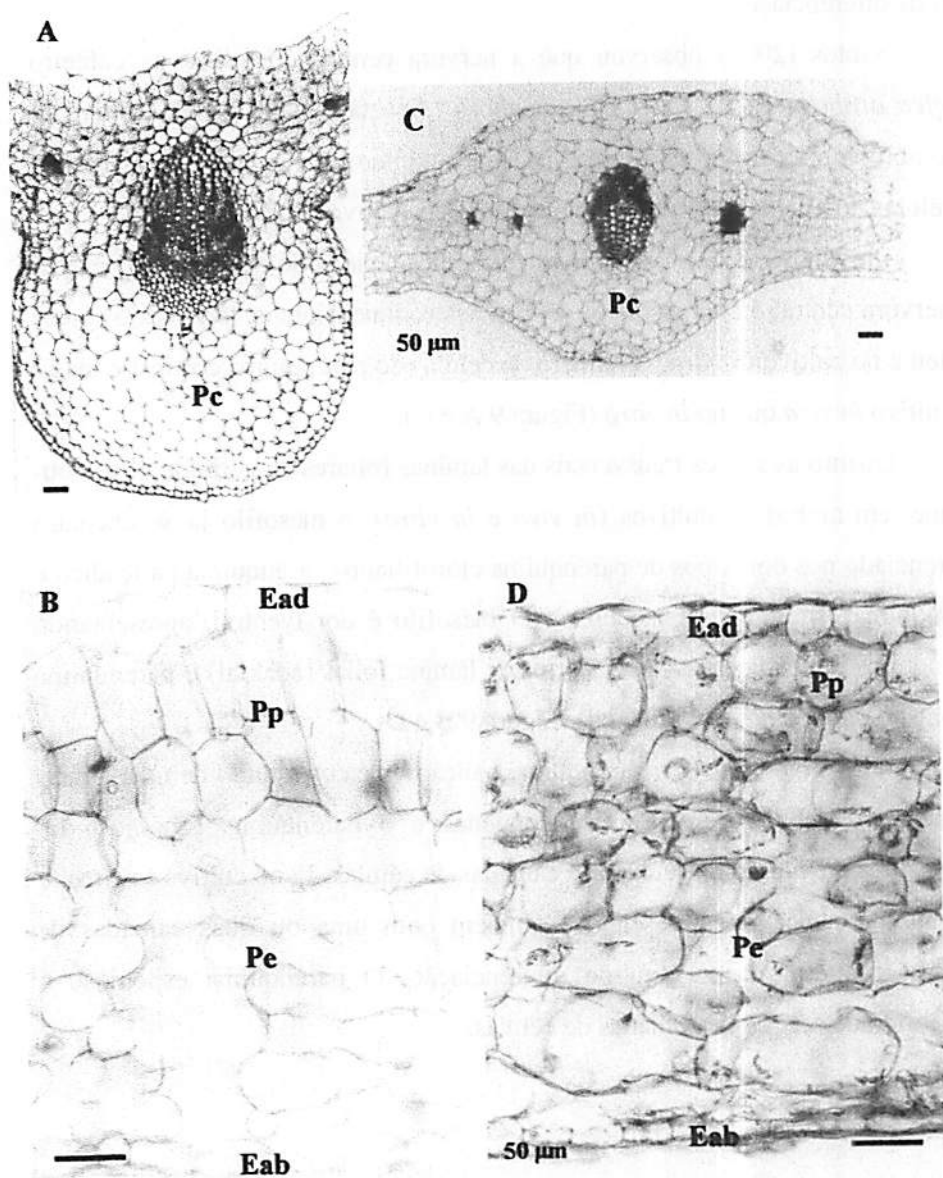


FIGURA 9 Seções transversais da nervura central e lâminas foliares obtidas de folhas de gérbera cultivada *in vivo* (A e B) e *in vitro* (C e D), evidenciando parênquima cortical (Pc), epiderme adaxial (Ead), parênquima paliádico (Pp), parênquima esponjoso (Pe) e epiderme abaxial (Eab). UFLA, Lavras, MG, 2005

Santos (2001) trabalhou com lâminas foliares de cafeeiro (*Coffea arabica* “Rubi” e *Coffea canephora* “Apoatã”), obtidas por cultivo *in vivo* e *in vitro*. Na cultivar Rubi, a autora observou um parênquima esponjoso formado de cinco a seis camadas de células nas folhas obtidas *in vitro* e de oito camadas de células nas folhas obtidas *in vivo*. Na cultivar Apoatã, a autora observou o parênquima esponjoso com quatro camadas de células nas folhas obtidas *in vitro* e de nove a dez camadas de células nas folhas obtidas *in vivo*.

Fidelis (1998) observou que o mesofilo de folhas de mama-cadela (*Brosimum guadichaudii* Tréc.) cultivadas *in vitro* apresentou de três a quatro estratos de células. No entanto, estas não possuíam diferenças no formato, impossibilitando a distinção dos parênquimas paliçádico e esponjoso.

Nota-se ainda que, em ambas as condições de cultivo, as epidermes abaxial e adaxial são compostas por apenas uma camada de células (epiderme uniestratificada), revestidas pela cutícula, sendo esta mais espessa nas folhas de plantas cultivadas *in vivo*.

Fidelis (1998) observou que a superfície adaxial das lâminas foliares de mama-cadela obtidas *in vitro* e *in vivo* apresentavam também uma camada de células.

A presença da cutícula no cultivo *in vitro* é fator importante na micropropagação, uma vez que evita a perda excessiva de água da planta para o ambiente e, conseqüentemente, favorece a sobrevivência das plântulas micropropagadas durante o processo de aclimatização na condição *ex vitro*.

As medidas das espessuras da epiderme adaxial e abaxial e parênquimas paliçádico e esponjoso das folhas de gérbera diferiram de forma significativa entre os cultivos *in vivo* e *in vitro* (Tabela 2).

Todas as variáveis analisadas: epiderme adaxial, parênquima paliçádico, parênquima esponjoso e epiderme abaxial apresentaram espessura

significativamente menor para o cultivo *in vitro* em comparação com o cultivo *in vivo* (Tabela 3).

TABELA 2 Análise de variância para espessura da epiderme adaxial, parênquima paliçádico, parênquima esponjoso e epiderme abaxial de folhas formadas por cultivo *in vivo* e *in vitro* de *Gerbera jamesonii* cv. Jaguar Cream. UFLA, Lavras, MG, 2005.


Fontes de variação	GL	QM			
		Epiderme adaxial	Parênquima paliçádico	Parênquima esponjoso	Epiderme abaxial
Tipo de cultivo	1	160,083000*	726,192000*	2561,328000*	45,387000*
Erro	28	2,796429	15,590571	20,227821	0,991286
CV (%)		7,84	5,93	3,33	6,08

* Significativo a 1% de probabilidade, pelo teste de F.

TABELA 3 Efeito do tipo de cultivo (*in vivo* e *in vitro*) sobre a espessura da epiderme adaxial, do parênquima paliçádico, do parênquima esponjoso e epiderme abaxial de lâminas foliares de *Gerbera jamesonii* cv. Jaguar Cream. UFLA, Lavras, MG, 2005.

Tipo de cultivo	Espessuras médias observadas (μm)			
	Epiderme adaxial	Parênquima paliçádico	Parênquima esponjoso	Epiderme abaxial
<i>In vivo</i>	23,64 a	71,55 a	144,48 a	17,61 a
<i>In vitro</i>	19,02 b	61,71 b	126,00 b	15,15 b

* Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem entre si, a 1% de probabilidade, pelo teste de F.



Em estudos anatômicos de murici-pequeno, Nogueira (2003) também encontrou espessuras significativamente menores de epiderme adaxial, parênquima paliçádico e epiderme abaxial para o cultivo *in vitro*, em relação ao cultivo *in vivo*.

Soares (2003), trabalhando com propagação *in vitro* do ingazeiro, encontrou espessuras significativamente menores de parênquima paliçádico, parênquima esponjoso e epiderme abaxial para o cultivo *in vitro*, em relação ao cultivo *in vivo*.


Entretanto, folhas de arnica (*Lychnophora pinaster*) oriundas de cultivo *in vivo* apresentaram-se menos espessas que as cultivadas *in vitro* e aclimatizadas (Souza, 2003).

Pela análise dos cortes anatômicos (Figura 9 C e D), verifica-se que não ocorreu vitrificação em plântulas de gérbera cultivadas *in vitro*, uma vez que não foi observada nenhuma desordem anatômica, como por exemplo: hipertrofia do parênquima, grandes espaços intercelulares, hipolignificação do sistema vascular, entre outros.

A utilização do meio de cultura para o cultivo *in vitro* de gérbera sugerido por Arello (1998), no qual a concentração dos sais do meio MS (Murashige & Skoog, 1962) é reduzida pela metade, possivelmente teve influência direta na não ocorrência de vitrificação.

Pasqual et al. (1997) relatam que muitos fatores contribuem para a indução de vitrificação, tais como: fatores ambientais, baixa transpiração dos explantes, potencial hídrico do meio, composição dos macro e micronutrientes no meio, reguladores de crescimento, entre outros.

Sato (1994) trabalhou com três clones (II, III e 800X) de *Gerbera jamesonii*, procurando evidenciar a ocorrência de vitrificação variando a suplementação do meio de cultura com diferentes concentrações de nitrogênio. O clone II apresentou, em média, 24% de vitrificação *in vitro*, o clone III



apresentou 54%, enquanto que o clone 800X não apresentou vitrificação. A autora observou que doses elevadas de nitrogênio favorecem a vitrificação.

Conforme Daguim & Letouzé (1986), a vitrificação é diretamente associada a níveis de nitrato de amônio no meio de cultura.

6 CONCLUSÕES

O meio de cultura sugerido por Arello (1998) é eficiente para promover a indução de calogênese e a morfogênese *in vitro* de brotos e folhas a partir de capítulos florais de *Gerbera jamesonii* cv. Jaguar Cream.

Não houve diferença na porcentagem de formação de calos, em função do tempo de cultivo.

Obtiveram-se em média, 3,2 brotações e 6,6 folhas por explante a partir da indução de calos em capítulos florais de gérbera.

Foi observada a formação de raízes na ausência e presença de ANA, obtendo-se 100% de enraizamento.

A suplementação do meio de cultura com doses crescentes de ANA promoveu um aumento linear no número de raízes e comprimento médio de raízes, sendo que doses mais elevadas devem ser testadas futuramente.

As plântulas provenientes do cultivo *in vitro* apresentaram uma taxa de 100% de sobrevivência na aclimatização.

As estruturas foliares desenvolvidas *in vivo* apresentam epiderme adaxial, parênquima paliçádico, parênquima esponjoso e epiderme abaxial mais espessos que no cultivo *in vitro*.

O sistema vascular observado em folhas produzidas *in vivo* é mais desenvolvido que *in vitro*.

Não foi observada a ocorrência de vitrificação em plântulas de gérbera cultivadas *in vitro*.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHUJA, M. R. **Micropropagation of wood plants**. London: Kluwe Academic Publishers, 1992. v. 41, 507 p.

ARELLO, E. F. **Gérbera (*Gerbera jamesonii* Bolus ex Hook)**. In: TOMBOLATO, A. F. C.; COSTA, A. M. M. **Micropropagação de plantas ornamentais**. Campinas: Instituto Agronômico, 1998. p. 29-31. (Boletim técnico, 174).

BARBOSA, M. H. P. **Propagação *in vitro* de *Gerbera jamesonii* Bolus ex Hook através de capítulos jovens**. 1991. 48 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras, MG.

BUKATSH, F. **Benerkemgem zeir doppelfarbeing astrablau-safranina**. *Mikrokosmos*, Stuttgart, v. 61, p. 255, 1972.

DAGUIM, F.; LETOUZÉ, R. **Ammonium – indiced vitrification in cultured tissues**. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v. 66, n. 1, p. 94-98, Jan. 1986.

DREW, R. A. **Rapid clonal propagation of papaya *in vitro* from mature fieldgrown trees**. *HortScience*, Alexandria, v. 23, n. 3, p. 609-611, June 1988.

FIDELIS, I. **Micropropagação de *Brosimum guadichaudii* Tréc. (Mama-Cadela) uma espécie considerada medicinal**. 1998. 109 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

GEORGE, E. F.; SHERRINGTON, P. D. **Plant propagation by tissue culture: handbook and diretory of commercial laboratories**. Eversley Exegtics, 1984.

GOMES, G. A. C. **Propagação *in vitro* de moreira (*Maclura tinctoria*)**. 1999. 92 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. **Micropropagação**. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.) **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPq, 1998. v. 1, p. 183-260.

- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.) **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-CBAB, 1998. p. 331-353.
- HICKS, G. S. Patterns of organ developmental in plant tissue culture and the problem of organ determination. **The Botanical Review**, New York, v. 46, n. 1, p. 1-23, Mar. 1980.
- JOHANSEN, B. A. **Plant microtechnique**. New York: Mc Graw-Hill, 1940. 433 p.
- LALIBERTE, S.; CHRETIEN, L.; VIETH, J. *In vitro* plantlet production from young capitulum explants of *Gerbera jamesonii*. **HortScience**, Alexandria, v. 20, n. 1, p. 137-139, 1985.
- MOHAMED-YASSEEN, Y. Influence of agar and activated charcoal on uptake of gibberellin and plant morphogenesis *in vitro*. **In vitro Cellular and Developmental Biology**, Wallingford, v. 37, n. 2, p. 204-205, Mar./Apr. 2001.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, Mar. 1962.
- MURASHIGE, T.; SERPA, M.; JONES, J. B. Clonal multiplication of gerbera through tissue culture. **HortScience**, Alexandria, v. 9, n. 3, p. 175-180, June 1974.
- NOGUEIRA, R. C. **Propagação *in vitro*, análises anatômicas e bioquímicas de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.)**. 2003. 88 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- OLIVERA, V. Z. ; GUTIÉRREZ, M. A. .; GUTIÉRREZ, J. A.; ANDRADE, M. Cultivo *in vitro* de gerbera (*Gerbera jamesonii* H. Bolus) y su aclimatación en invernadero. **Bioagro**, La Prata, v. 12, n. 3, p. 75-80, 2000.
- PASQUAL, M.; HOFFMANN, A.; RAMOS, J. D. **Cultura de tecidos vegetais: tecnologia e aplicações: introdução: fundamentos básicos**. Lavras: UFLA/FAEPE, 1997. 159 p.
- PETRU, E.; MATOUS, J. *In vitro* cultures of gerbera (*Gerbera jamesonii* Bolus). **Zahradnictvi**, Prague, v. 11, n. 4, p. 309-314, 1984.

- PIERIK, R. L. M.; JANSEN, J. L. M.; MAASDAM, A.; BINNENDIJK, C. M. Optimization of gerbera plantlet production from excised capitulum explants. *Scientia Horticulturae*, Wageningen, v. 3, n. 4, p. 351-357, 1975.
- PIERIK, R. L. M.; SPRENKELS, P. A. Improvement of the rooting of gerbera *in vitro* by NAA. *Vakblad voor de Bloemisterij*, Wageningen, v. 39, n. 21, p. 45, 1984.
- ROHR, R.; HANUS, D.; Vegetative propagation of wavy grain sycamore maple. *Canadian Journal of Forestry Research*, Ottawa, v. 17, n. 5, p. 418-420, May 1987.
- SANTANA, J. R. F. Controle da morfogênese *in vitro* em algumas espécies de *annonaceae*. 2003. 237 p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- SANTOS, B. R. Micropropagação de pequizeiro (*Caryocar brasiliense* Camb.) 2004. 239 p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- SANTOS, C. G. Micropropagação e caracterização bioquímico-anatômica em *Coffea arabica* e *Coffea canephora*. 2001. 110 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- SASS, J. *Botanical microtechnique*. Iowa: Iowa College, 1951. 228 p.
- SATO, A. Y. Propagação de gébera de vaso através da cultura de tecidos. 1994. 95 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras, MG.
- SOARES, G. de A. Aspectos do cultivo *in vitro* do ingazeiro [*Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC) T. D. Penn.]. 2003. 90 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal)- Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- SOUZA, A. V. de. Propagação *in vitro* e aspectos anatômicos de arnica [*Lychnophora pinaster* (Mart.)]. 2003. 126 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- STIRMART, D. P. Commercial micropropagation of florist flower crops. In: ZIMMERMAN, R. H. et al. (Ed.) *Tissue culture as a plant production systems for horticultural crops*. Dordrecht: Martinus Nijhoff Publishers, 1986. p. 301-315.

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; FERREIRA, A. T. Retrospectiva da cultura de tecidos de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.) **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPH, 1998. v. 1, p. 11-20.

ZIMMERMAN, R. H. Micropropagation of fruit plants. *Acta Horticulturae*, Wageningen, n. 120, p. 217-222, 1981.

**CAPÍTULO IV: ESTUDO DA DIVERGÊNCIA GENÉTICA ENTRE
CULTIVARES DE *Gerbera jamesonii* POR MEIO DE MARCADORES
RAPD**

1 RESUMO

REZENDE, Rodrigo Kelson Silva. Estudo da divergência genética entre cultivares de *Gerbera jamesonii* por meio de marcadores RAPD. In: **Aspectos do cultivo *in vitro* e divergência genética em gérbera (*Gerbera jamesonii*)**. 2005, p.72 – 91. (Mestrado em Agronomia/Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

No processo de produção comercial de mudas de gérbera, a cor da flor é uma das principais características morfológicas de interesse agrônômico. No entanto, quando utiliza-se sementes para a obtenção massal de plantas matrizes via cultura de tecidos, torna-se difícil prever quais cores serão expressas pelas flores de plantas oriundas do cultivo *in vitro*, devido à alogamia da espécie. A utilização de marcadores moleculares pode contribuir para o estudo de divergência genética entre diferentes cultivares de gérbera, baseado na cor da flor como característica morfológica. Nesse contexto, o objetivo desse trabalho foi analisar a divergência genética entre seis cultivares de *Gerbera jamesonii* ('Jaguar Yellow', 'aguar Cream', 'Jaguar Lemon', 'Jaguar Salmon Pastels', 'Jaguar Red', 'Jaguar Deep Rose'). A análise de divergência genética entre as cultivares de gérbera foi realizada utilizando-se 21 *primers*, os quais amplificaram 37 fragmentos polimórficos de DNA. Foram obtidos valores de correlação por análise tipo *bootstrap* e os valores de PIC para os *primers* utilizados. Uma matriz quadrada foi gerada, contendo as distâncias genéticas entre os genótipos analisados. Esta matriz foi utilizada para construir um dendograma utilizando-se o programa NTSYS- PC 2.0, que agrupou os genótipos segundo o método UPGMA. Através dos valores de correlação obtidos, verificou-se que a utilização de 37 bandas polimórficas foi suficiente para estabelecer as distâncias genéticas entre as cultivares em estudo, pois a partir de 25 bandas polimórficas não houve diferenças significativas nos valores das distâncias genéticas ou no agrupamento das cultivares no dendograma. As cultivares de *Gerbera jamesonii* foram separadas em dois grupos distintos, a 44% de similaridade genética. A maior similaridade genética encontrada (56%) foi entre as cultivares Jaguar Yellow e Jaguar Lemon. Os resultados demonstram que marcadores RAPD podem ser utilizados na separação de plântulas de *Gerbera jamesonii* oriundas do cultivo *in vitro*, com base na coloração da flor.

* Comitê Orientador: Luciano Vilela Paiva – UFLA (Orientador), Renato Paiva (Co-Orientador) – UFLA.

2 ABSTRACT

REZENDE, Rodrigo Kelson Silva. Study of the genetic divergence among cultivars of *Gerbera jamesonii* by RAPD markers. In: **Aspects of the *in vitro* cultivation and genetic divergence in gerbera (*Gerbera jamesonii*)**. 2005, p.72 - 91. (Master Program in Agronomy/Plant Physiology) - Federal University of Lavras, Lavras, MG. *

During the commercial production of gerbera seedlings, flower color is one of the main morphological aspect that has an agronomic interest. However, when seeds are used to obtain plants by tissue culture, it becomes difficult to foresee which color will be expressed by the flowers of plants originated from *in vitro* cultivation, due to allogamy of the species. The use of molecular markers can contribute to study genetic divergence among different cultivars of gerbera, based on the color of the flower as morphologic characteristic. In that context, the objective of this work was to analyze the genetic divergence among six cultivars of *Gerbera jamesonii* (Jaguar Yellow, Jaguar Cream, Jaguar Lemon, Jaguar Salmon Pastels, Jaguar Red, Jaguar Deep Rose). The analysis of genetic divergence among cultivars of gerbera it was done using 21 *primers*, which amplified 37 DNA polymorphic fragments. It was obtained correlation values by *bootstrap* analysis and PIC values for the used *primers*. A square matrix was generated, containing the genetic distances among the analyzed genotypes. This matrix was used to construct a dendrogram using the NTSYS - PC 2.0 software clustered genotypes according to the UPGMA method. Based on the correlation values, the use of 37 polimorfic bands were sufficient to establish genetic distances among cultivars once that with the use of more than 25 polimorfic bands, no significative differences in genetic distances values or in cultivars grouping in dendrogram were observed. Cultivars of *Gerbera jamesonii* were separate at two different groups, at a level of 44% of genetic similarity. The largest genetic similarity found (56%) was between cultivars Jaguar Yellow and Jaguar Lemon. The results demonstrated that RAPD markers can be used to separate seedlings of *Gerbera jamesonii* originating from the *in vitro* cultivation, based on the flower color.

* Guidance Committee: Luciano Vilela Paiva – UFLA (Adviser), Renato Paiva (Co-Adviser) – UFLA.

3 INTRODUÇÃO

Muitas pesquisas com gérbera têm sido conduzidas procurando estudar características de interesse agrônômico envolvidas no processo de produção, como o preparo e manejo do solo, o uso de compostos orgânicos e químicos, qualidade de flores, produtividade, armazenamento, entre outras. No entanto, poucos estudos têm sido feitos utilizando-se marcadores moleculares.

No processo de produção comercial de mudas de gérbera via cultura de tecidos, as sementes podem ser utilizadas como fonte de explantes, visando à obtenção massal de plantas matrizes. Devido à alogamia da espécie, torna-se difícil prever quais cores serão expressas pelas flores de plantas oriundas do cultivo *in vitro*.

A utilização de marcadores moleculares pode contribuir para o estudo de divergência genética entre diferentes cultivares de gérbera, baseado na cor da flor como característica morfológica, auxiliando no processo de separação de plantas durante o processo de produção comercial de mudas.

Marcadores moleculares, como o RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), são poderosas ferramentas que têm facilitado o estudo de diversas áreas da biologia, pura ou aplicada, cobrindo questões de identificação de cultivares, evolução e genética de populações, análises de características quantitativas em genética de populações, entre outras (Symondson & Liddell, 1996).

O objetivo deste trabalho foi analisar a divergência genética entre seis cultivares de *Gerbera jamesonii*, por meio de marcadores RAPD.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado no Laboratório Central de Biologia Molecular (LCBM) da Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, MG.

4.1 Estudo da divergência genética entre cultivares de *Gerbera jamesonii* por meio de marcadores RAPD

4.1.1 Material vegetal

Plantas matrizes de seis cultivares de *Gerbera jamesonii* ('Jaguar Yellow', 'Jaguar Cream', 'Jaguar Lemon', 'Jaguar Salmon Pastels', 'Jaguar Red', 'Jaguar Deep Rose') foram cedidas pela empresa Multiflores, localizada em Lavras, MG (Figura 1).

4.1.2 Extração e quantificação do DNA genômico

Para a extração do DNA, cerca de 0,5g de tecido foliar fresco foi triturado em N₂ líquido, utilizando-se pistilo e almofariz até a obtenção de um fino pó. Em seguida, microtubos gelados foram preenchidos com todo o pó macerado. Imediatamente, 600 µL de tampão de extração (2% CTAB (p/v), 0,1 mol/L Tris-HCl pH 8,0, 1,4 mol/L NaCl, 0,02 mol/L EDTA pH 8,0, 1% sarcosil (p/v), 1% PVP (p/v), 0,2% β- mercaptoetanol (v/v) pré-aquecido a 65°C, foram adicionados e misturados ao triturado foliar. Esta mistura foi mantida em banho-maria a 65°C, por 1 hora, com homogeneização a cada 10 minutos, visando o contato do tampão com o material vegetal. Após este período, a mistura foi deixada em temperatura ambiente por 5 minutos.

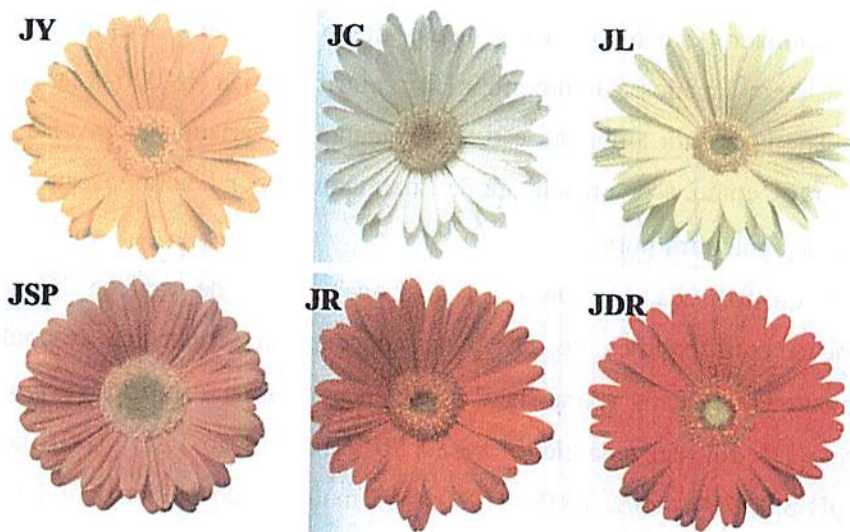


FIGURA 1 Cultivares de *Gerbera jamesonii*, evidenciando a variabilidade de cores. (JY – ‘Jaguar Yellow’; JC – ‘Jaguar Cream’; JL – ‘Jaguar Lemon’; JSP – ‘Jaguar Salmon Pastels’; JR – ‘Jaguar Red’; JDR – ‘Jaguar Deep Rose’). Fonte: Adaptado de S & G Flowers (2005).

Em seguida, 1 volume (600 μL) de solução de clorofórmio : álcool isoamílico (24:1) foi adicionado e o tubo foi levemente agitado por 10 minutos, visando à emulsificação das fases. A separação das fases orgânica e aquosa foi realizada por centrifugação a 18.000 x g, por 5 minutos, à temperatura ambiente, tendo sido o sobrenadante (fase aquosa) transferido para um novo microtubo. A lavagem do sobrenadante com clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) foi realizada novamente, seguindo os mesmos volumes, tempos de agitação e centrifugação. Após a segunda lavagem, a fase aquosa foi transferida para um novo microtubo e 900 μL de isopropanol gelado foram adicionados para que o DNA fosse precipitado. O microtubo foi, então, invertido levemente, para aumentar a precipitação e incubado por 30 minutos a -20°C . Após este período, a solução foi centrifugada a 18.000 x g por 10 minutos à temperatura ambiente e o

sobrenadante foi descartado por inversão; 300 μL de etanol 70% (v/v) gelado foram adicionados e o tubo foi levemente girado para que o sedimento e as paredes fossem lavados. O microtubo foi centrifugado a 18.000 x g por 3 minutos à temperatura ambiente e o sobrenadante descartado por inversão. O sedimento foi, então, seco em câmara de fluxo laminar por 1 hora e ressuspenso em 30 μL de água ultra-pura.

A quantificação do DNA foi realizada em gel de agarose 1% pela comparação com padrões de DNA de concentração conhecida e com o equipamento GeneQuant[®] (Amershan, BioSciences). Para a quantificação em gel de agarose 1%, foi realizada eletroforese a 70 V em tampão TAE (0,001 mol/L EDTA pH 8,0; 0,04 mol/L TRIS pH 8,0; 0,02 mol/L ácido acético) por 1 hora. Após a eletroforese, o gel foi incubado em solução de brometo de etídio (0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por 15 minutos, lavado por 10 minutos em água corrente, sendo visualizado sob luz ultravioleta e fotografado no equipamento EDAS 290 (Kodak[®]). A quantificação das amostras de DNA (expressas em $\text{ng}/\mu\text{L}$) por densidade ótica a 260nm e a medição da qualidade da amostra a 280nm de comprimento de onda (λ) foram realizadas através do equipamento GeneQuant[®] (Amershan, BioSciences).

De posse das concentrações de cada amostra, o DNA foi diluído em água ultra-pura até a concentração de trabalho de 10 $\text{ng}/\mu\text{L}$, tendo a solução estoque sido armazenada a -20°C e a solução de trabalho mantida a 4°C .

4.1.3 Amplificação via RAPD

As reações de amplificação foram realizadas em termociclador modelo Mastercycler (Eppendorf, Hamburg, Germany), utilizando-se um programa com desnaturação inicial a 95°C , por 2 minutos, seguido por desnaturação a 94°C , por 1 minuto, anelamento a 36°C , por 1 minuto e extensão a 72°C , por 2 minutos. Os

passos de desnaturação, anelamento e extensão foram repetidos 34 vezes e, em seguida, a reação foi finalizada por uma extensão a 72°C por 7 minutos. O volume final de cada reação de amplificação foi de 10µL, contendo 50ng de DNA, 20mmol/L Tris-HCl pH 8,4, 50mmol/L KCl, 1,5mmol/L MgCl₂, 200µmol/L de cada um dos dNTPs, 0,50µmol/L do *primer* RAPD correspondente e 0,5 unidades (U) de enzima *Taq* DNA polimerase (Invitrogen®). Os fragmentos amplificados foram separados em gel de agarose 1% (m/v), com eletroforese a 70V em tampão TAE (0,001mol/L EDTA pH 8,0; 0,04mol/L TRIS pH 8,0; 0,02mol/L ácido acético) por 2 horas. Após a eletroforese, o gel foi incubado em solução de brometo de etídio (0,5µg/mL) por 20 minutos, lavado por 10 minutos em água corrente, sendo visualizado sob luz ultravioleta e fotografado no equipamento EDAS 290 (Kodak®).

Foram utilizados os seguintes *primers* RAPD da série Operon: OPA-01, OPA-02, OPA-03, OPA-04, OPA-05, OPA-07, OPA-08, OPA-09, OPA-12, OPA-14, OPA-15, OPA-16, OPA-17, OPA-18, OPA-19, OPA-20, OPB-01, OPB-02, OPB-04, OPB-06, OPB-07, OPB-08, OPB-10, OPC-04, OPC-06, OPC-07, OPC-08, OPC-09, OPG-02, OPG-03 e OPG-12.

4.1.4 Análise estatística dos dados moleculares

A presença ou a ausência de bandas RAPD foram marcadas por meio de interpretações visuais dos géis fotografados. Os dados foram transformados em matriz de 1 (presença) e 0 (ausência) de todos os genótipos e posições dos fragmentos marcados.

A estimativa de similaridade entre os genótipos foi feita por meio do programa NTSYS – PC 2.0 (Rohlf, 1992). Os valores de distância genética

calculados, baseados no coeficiente de Jaccard (Anderberg, 1973), utilizam a seguinte equação:

$$D_{ij} = 1 - (B_{ij}/M_{ij})$$

em que:

D_{ij} = distância entre os genótipos i e j ;

B_{ij} = número de bandas comuns a i e j ; e

M_{ij} = número total de bandas analisadas em i e j .

Uma matriz quadrada foi gerada, contendo as distâncias genéticas entre os genótipos analisados. Esta matriz foi utilizada para construir um dendograma, utilizando-se o programa NTSYS – PC 2.0 (Rohlf, 1992), que agrupou os genótipos segundo o método da média aritmética entre pares não ponderados (UPGMA, do inglês *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Average*), desenvolvido por Sokal & Michener (1958).

Cada agrupamento do dendograma foi avaliado pela análise de *bootstrap* utilizando 10.000 amostragens pelo programa BOOD 3.2 (Coelho, 2000). A técnica de *bootstrap* realiza a repetição da experiência, o que seria desejável na prática, se tal fosse possível. As observações são escolhidas de forma aleatória e as estimativas calculadas novamente.

Para verificar o número mínimo de marcadores polimórficos necessários para gerar uma matriz de distância genética, foi utilizada a metodologia descrita por Efron (1981) e implementado pelo programa GQMol (www.ufv.br/dbg/gqmol/gqmol.htm). Seja $X = (X_1, \dots, X_n)$ a amostra contendo N observações. Constrói-se B amostras $X^{*(1)}, \dots, X^{*(B)}$ de comprimento N cada, construídas a partir da população finita (X_1, \dots, X_n) que corresponde a amostrar com substituição a partir do conjunto X .

A diversidade genética do loco ou PIC (*Polymorphic Index Content*) é uma estimativa utilizada para a avaliação do poder discriminatório de um loco. A maior informatividade de uma classe de marcadores define sua maior eficiência em detectar polimorfismos entre dois indivíduos (Rafalski et al., 1996).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Divergência genética entre cultivares de *Gerbera jamesonii* por meio de marcadores RAPD

5.1.1 Marcadores RAPD

De um total de 31 *primers* testados, 21 foram capazes de amplificar fragmentos bem definidos e apresentar um padrão de bandas polimórficas entre as cultivares analisadas. Os 21 *primers* selecionados geraram 62 bandas das quais 37 foram polimórficas (60%). A informatividade desses *primers* variou de 0,83 (OPA - 20) a 0,28 (OPA - 02, OPA - 15 e OPC - 09) (Tabela 1).

TABELA 1 *Primers* RAPD, seus respectivos números de produtos amplificados, PIC (*Polymorphic Index Content*) e número de bandas polimórficas obtidas em seis cultivares de gérbera. UFLA, Lavras, MG, 2005.

<i>Primer</i>	Nº de produtos amplificados	PIC	Nº de bandas polimórficas
OPA-01	3	0,44	1
OPA-02	3	0,28	1
OPA-04	3	0,68	2
OPA-05	3	0,44	1
OPA-07	3	0,44	1
OPA-08	3	0,64	2
OPA-09	3	0,68	2
OPA-12	3	0,44	1
OPA-14	3	0,67	3
OPA-15	3	0,28	1

Tabela 1. Cont.

OPA-16	2	0,50	1
OPA-19	3	0,80	3
OPA-20	4	0,83	3
OPB-02	2	0,68	2
OPB-06	3	0,69	2
OPB-08	4	0,78	3
OPC-04	3	0,81	3
OPC-07	3	0,44	1
OPC-09	2	0,28	1
OPG-03	4	0,64	2
OPG-12	2	0,44	1

Kwon et al. (2001), trabalhando com 24 cultivares de gérbera, conduziram um estudo para analisar características morfológicas, como cor da flor, tipo de flor, diâmetro floral e talo floral. Eles encontraram um total de 57 bandas polimórficas amplificadas por 36 *primers* via RAPD. No entanto, os autores não encontraram relações genéticas entre as características morfológicas estudadas, havendo uma relação muito inconsistente entre marcadores moleculares e características morfológicas. A primeira hipótese é que se torna praticamente impossível identificar genes específicos relacionados com características morfológicas, visto que as cultivares usadas nesse estudo têm grande variabilidade genética. A outra possibilidade é que muitos genes localizados em diferentes cromossomos podem ser responsáveis por características morfológicas, tais como cor da flor e tipo de flor.

A ocorrência de polimorfismo entre as cultivares pode ser observada, por exemplo, ao se amplificarem as preparações de DNA com o oligonucleotídeo OPA – 04 (Figura 2).

A falta de fragmentos polimórficos pode ser observada, por exemplo, com a utilização do oligonucleotídeo OPB – 04 (Figura 3).

Kwon et al. (2001) encontraram muitas bandas polimórficas para diferentes cultivares de gérbera, mas estas bandas não se referem à cor de flores ou ao tipo de flor.

Wiering & de Vlaming (1984) verificaram que pelo menos 35 genes são responsáveis pela cor da flor em petúnia. Talvez a coloração das flores em gérbera seja controlada por vários genes, como o que é relatado para petúnia.

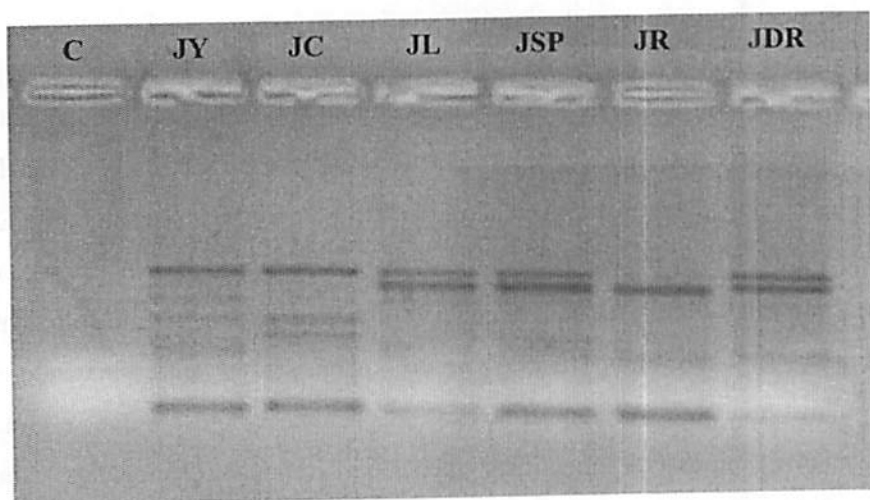


FIGURA 2 Padrões moleculares obtidos utilizando o *primer* OPA-04 via RAPD, em gel de agarose 1,0 %. C - Controle Negativo; JY - 'Jaguar Yellow'; JC - 'Jaguar Cream'; JL - 'Jaguar Lemon'; JSP - 'Jaguar Salmon Pastels'; JR - 'Jaguar Red'; JDR - 'Jaguar Deep Rose'. UFLA, Lavras, MG, 2005.

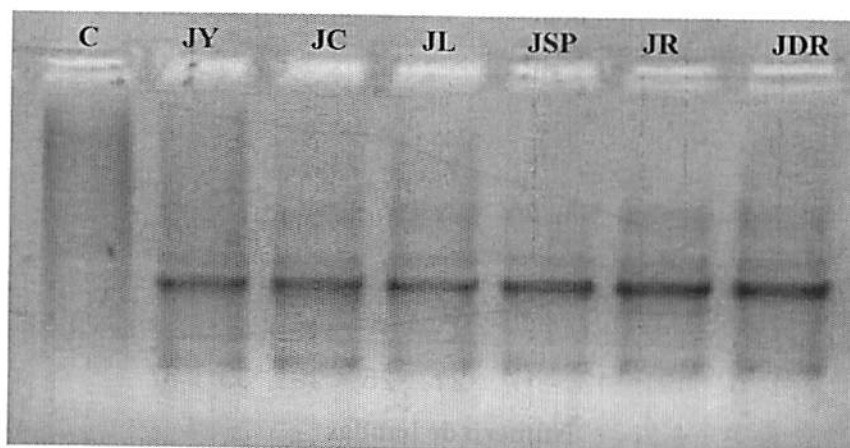


FIGURA 3 Padrões moleculares obtidos utilizando o *primer* OPB-04 via RAPD, em gel de agarose 1,0 %. C - Controle Negativo; JY - 'Jaguar Yellow'; JC - 'Jaguar Cream'; JL - 'Jaguar Lemon'; JSP - 'Jaguar Salmon Pastels'; JR - 'Jaguar Red'; JDR - 'Jaguar Deep Rose'. UFLA, Lavras, MG, 2005.

5.1.2 Análise da divergência genética

As 37 bandas polimórficas foram consideradas suficientes para uma adequada avaliação da divergência, uma vez que nas análises de número ótimo de marcadores realizadas verificou-se que a correlação entre as matrizes de distância aproximou-se de 1 e a soma dos quadrados dos desvios foi reduzida pra 0,10, a partir da utilização de 25 bandas polimórficas (Figura 4). Assim, o aumento do número de bandas não alterou significativamente a estimativa da distância genética entre os indivíduos estudados.

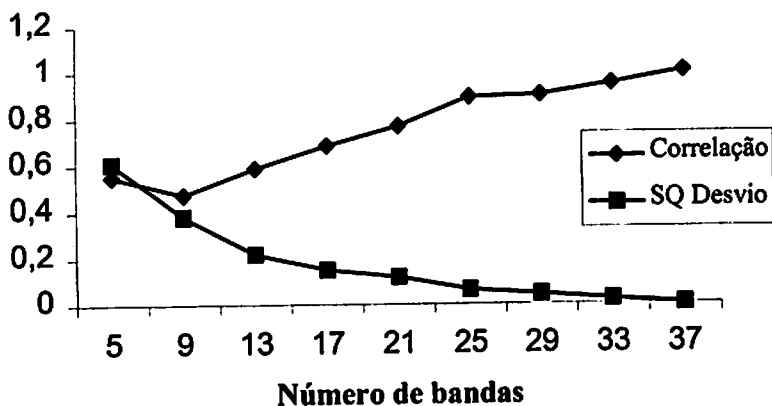


Figura 4 Análise do número mínimo de marcadores RAPD para a estimativa das distâncias genéticas entre 6 cultivares de gérbera, utilizando números crescentes de bandas polimórficas. UFLA, Lavras, MG, 2005.

Uma matriz de zero e um foi construída a partir da análise das 37 bandas polimórficas e serviu de base para o cálculo das similaridades genéticas entre as cultivares de *Gerbera jamesonii*, (Tabela 2). A similaridade genética média das 15 estimativas obtidas foi de 44%, com amplitude de 28% a 56%.

O coeficiente de dissimilaridade genética para as seis cultivares de gérbera analisadas foi de 56%, podendo ser explicado pela alogamia da espécie, ocasionando grande variabilidade genética.

O agrupamento das seis cultivares de *Gerbera jamesonii*, com base na matriz das distâncias genéticas pelo método UPGMA, é apresentado em forma de dendograma (Figura 5). A maior similaridade genética encontrada foi entre as cultivares Jaguar Yellow e Jaguar Lemon (56%).

TABELA 2 Matriz de similaridades genéticas (%) entre seis cultivares de *Gerbera jamesonii*, obtidas a partir de dados de marcadores RAPD e expressas pelo complemento aritmético do coeficiente de Jaccard. JY – ‘Jaguar Yellow’; JC – ‘Jaguar Cream’; JL – ‘Jaguar Lemon’; JSP – ‘Jaguar Salmon Pastels’; JR – ‘Jaguar Red’; JDR – ‘Jaguar Deep Rose’. UFLA, Lavras, MG, 2005.

	JY	JC	JL	JSP	JR	JDR
JY	0					
JC	55	0				
JL	56	49	0			
JSP	41	21	50	0		
JR	44	45	42	41	0	
JDR	52	54	45	32	28	0

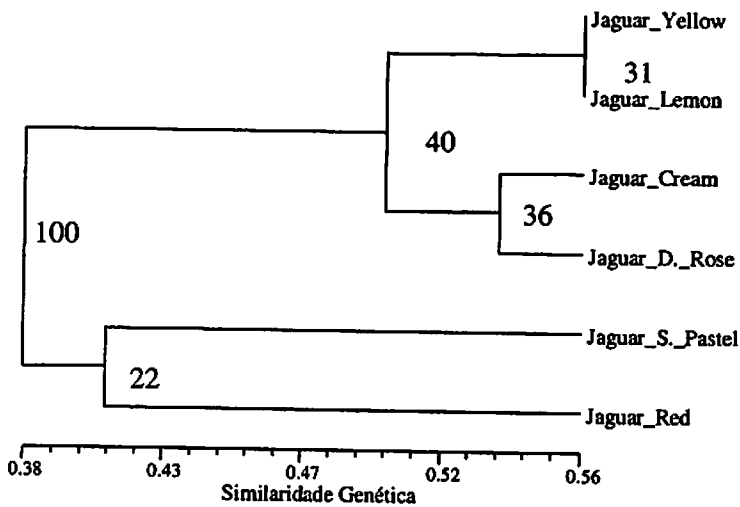


FIGURA 5 Dendrograma representando as distâncias genéticas obtidas com base em marcadores RAPD, entre seis cultivares de *Gerbera jamesonii*, gerado pelo método UPGMA. A consistência de cada agrupamento foi determinada pela análise de *bootstrap*. UFLA, Lavras, MG, 2005.

Considerando-se a separação do agrupamento a 44% de similaridade genética, obtiveram-se 2 grupos distintos. A Tabela 3 apresenta as cultivares que compõem cada grupo.

O grupo I e II são formados por quatro e duas cultivares respectivamente.

A respeito do grupo I, percebe-se a formação de dois subgrupos. O subgrupo IA inclui as cultivares Jaguar Yellow e Jaguar Lemon, enquanto o grupo IB é formado pelas cultivares Jaguar Cream e Jaguar Deep Rose. O grupo II é formado pelas cultivares Jaguar Salmon Pastels e Jaguar Red.

TABELA 3 Agrupamento de seis cultivares de *Gerbera jamesonii*, a 44% de similaridade genética. JY – ‘Jaguar Yellow’; JC – ‘Jaguar Cream’; JL – ‘Jaguar Lemon’; JSP – ‘Jaguar Salmon Pastels’; JR – ‘Jaguar Red’; JDR – ‘Jaguar Deep Rose’.UFLA, Lavras, MG, 2005.

Grupos	Cultivares
I	IA: JY, JL // IB: JC, JDR
II	JSP, JR

Kwon et al. (2001) encontraram um coeficiente de similaridade de 72%, variando de 50% a 90%, para 24 cultivares de gérbera estudadas, sendo 90% a maior similaridade genética encontrada para as cultivares “Sardana”, (flores vermelhas/brancas) e “Tamara” (flores laranjas). As 24 cultivares foram agrupadas em cinco grupos distintos.

Verificou-se que marcadores RAPD podem ser utilizados para estudos de divergência genética entre diferentes cultivares de gérbera, baseados na coloração da flor como característica morfológica.

Quando utiliza-se sementes como fonte inicial de explantes para o cultivo *in vitro*, torna-se difícil prever quais cores de flor serão expressas, devido à alogamia da espécie. O emprego de marcadores RAPD pode auxiliar na separação de plantas oriundas do cultivo *in vitro*, baseado na coloração da flor durante o processo de produção comercial de mudas de gérbera.

6 CONCLUSÕES

Os marcadores RAPD foram eficientes no estudo da divergência genética entre as diferentes cultivares de *Gerbera jamesonii* analisadas.

As cultivares de *Gerbera jamesonii* foram separadas em dois grupos distintos, a 44% de similaridade genética.

A maior similaridade genética encontrada (56%) foi entre as cultivares Jaguar Yellow e Jaguar Lemon.

Marcadores RAPD podem ser utilizados na separação de plântulas de *Gerbera jamesonii* oriundas do cultivo *in vitro*, com base na coloração da flor.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERBERG, M. R. Cluster analysis for applications. New York: Academic press, 1973.
- COELHO, A. S. G. BOOD: avaliação de dendogramas baseados em estimativas de distâncias/similaridades genéticas através do procedimento de *bootstrap*. Goiânia: UFG, 2000. (Software).
- EFFRON, B. The *bootstrap*, the jackknife, and other resampling plans, Philadelphia: Society of Indian Applied Mathematics, 1981. 138p.
- RAFALSKI, D. J. A.; VOGEL, J. M.; MORGANTTE, M.; POWELL, W.; ANDRE, C.; TINGEY, S. V. Generating and using DNA markers in plant. In: BIRREN, B.; LAI, E. *Nonmammalian genomic analysis: a practical guide*. New York, 1996. p. 75-134.
- KWON, O.; KIM, H.; KIM, K.; PARK, S.; YOUNG, B.; LEE, J.; CHUNG, Y. Morphological characteristics and genetic variation of *Gerbera hybrida* (Hort). *Journal Plant Biotechnology*, Daejeon, v. 3, n. 3, p. 145-149, Sept. 2001.
- ROHLF, F. J. Numerical taxonomy and multivariate analysis system: Version 1.70. New York, 1992. 470 p.
- S & G FLOWERS. *Gerbera jamesonii*. Disponível em: <<http://www.sgflovers.com>>. Acesso em: 10 maio 2005.
- SOKAL, R. R.; MICHENER, C. D. A statistical methods for evaluating systematic relationships. [University Science Bulletin], Kansas, v. 38, p. 1409-1438, 1958.
- SYMONDSO, W. O. C.; LIDDELL, J. E. The ecology of agricultural pests: biochemical approaches. London: Chapman & Hall, 1996. 517 p.
- WIERING, H.; DE VLAMING, P. Genetics of flower and pollen colours. In: K. SINK, C. (Ed.) *Petunia*. Berlin: Springer-Verlag, 1984. p. 49-75.