



Revista Agrária Acadêmica

[Agrarian Academic Journal](#)

Volume 4 – Número 1 – Jan/Fev (2021)



doi: 10.32406/v4n12021/119-134/agrariacad

Balço hormonal auxina/citocinica para multiplicação *in vitro* de genótipos de gérbera.
Hormonal balance auxin/cytocinin for gerbera genotypes *in vitro* multiplication.

[Tarcisio Rangel do Couto](#)^{1,2*}, [João Sebastião de Paula Araujo](#)¹, [João Paulo de Lima Aguiar](#)¹

^{1*} Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Agronomia, Departamento de Fitotecnia, Laboratório de Cultura de Tecidos de Vegetais, Seropédica, RJ. E-mail: tarcisiorcouto@yahoo.com.br

² Universidade Federal Fluminense, *Campus* do Valonguinho, Niterói, RJ.

Resumo

A gérbera é usada como flor de corte e ganhou popularidade como flor ornamental e com grande demanda no mercado mundial de plantas ornamentais. A micropropagação é usada para atender a demanda pelo material de plantios comerciais. Objetivou-se avaliar o efeito dos fitorreguladores BAP e ANA na multiplicação *in vitro* de gérberas. Os explantes foram inoculados em meio de cultura MS contendo diferentes concentrações de BAP (0,0; 2,22; 4,44; 8,88 e 17,76 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e ANA (0,0; 1,34; 2,68 e 5,36 $\mu\text{mol L}^{-1}$). Após oito semanas, avaliou-se o número de brotos formados em cada explante e o comprimento médio dos brotos. Foi possível estabelecer e recomendar uma concentração ideal de BAP e ANA para cada genótipo de gérbera.

Palavras-chave: *Gerbera jamesonii* Bolus Ex. Benzilaminopurina. Ácido naftaleno acético. Brotação.

Abstract

Gerbera is used as a cut flower and has gained popularity as ornamental flower and great demand in the world market for ornamental plants. Micropropagation is used to meet the demand for commercial planting material. The objective was to evaluate the BAP and ANA phytohormones effect gerberas *in vitro* multiplication. The explants were inoculated in MS culture medium containing different concentrations of BAP (0.0; 2.22; 4.44; 8.88 and 17.76 $\mu\text{mol L}^{-1}$) and ANA (0.0; 1.34; 2.68 and 5.36 $\mu\text{mol L}^{-1}$). After eight weeks, the number of shoots formed in each explant and the average length of the shoots were evaluated. Was possible to establish and recommend an ideal concentration of BAP and ANA for each gerbera genotype.

Keywords: *Gerbera jamesonii* Bolus Ex. Benzylaminopurine. Naphthalene acetic acid. Shoots.

Introdução

A técnica de micropropagação permite a clonagem de gérberas de alto valor e de difícil acesso, em um curto período de tempo e em larga escala. Porém, para o êxito desta técnica em gérbera existe a necessidade de protocolos estabelecidos para diferentes cultivares, pois cada cultivar pode responder de maneira diferente às concentrações dos fitorreguladores. Devido a este motivo, inúmeros estudos vêm sendo realizados para que se torne possível estabelecer os mesmos (CHUNG et al., 2016) e com isso garantir a expansão dos cultivos de gérbera no Brasil.

A organogênese no processo de micropropagação é bastante complexa, pois envolve fatores internos e externos, os quais interagem com a fonte do explante e com o meio de cultura utilizado. Basicamente a organogênese acontece por intermédio da otimização entre a citocinina/auxina presente no meio de cultura, e pode responder de forma direta, quando a diferenciação ocorre diretamente do explante, ou indireta, quando a resposta se manifesta primeiramente em forma de calos (CARDOSO; SILVA, 2013; NAZARI et al., 2014).

O balanço de auxinas e citocininas favorável a auxina torna propício ao enraizamento e o balanço inverso promove a formação de parte aérea. Concentrações molares iguais promovem a produção de calos. As auxinas mais usadas são AIA (ácido indol-3-acético), AIB (ácido indol-3-butírico), ANA (ácido naftaleno acético), NOA (ácido β naphoxy-acético) e 2,4-D (ácido diclorofenoxiacético). As auxinas 2,4-D, ANA e AIB são sintéticas e têm efeitos semelhantes às auxinas de ocorrências naturais, sendo mais estáveis à degradação. Em cultura de tecidos, as auxinas têm sido utilizadas para divisão celular e diferenciação radicular (GEORGE et al., 2008; KERBAUY, 2008).

As citocininas de ocorrência natural são encontradas como moléculas livres, não ligadas a nenhuma macromolécula. A síntese de citocinina ocorre em raízes, em embriões em desenvolvimento e em tecidos de galhas da coroa. Muitos compostos químicos com atividade de citocinina têm sido sintetizados e testados. A maioria dos compostos com atividade de citocinina possui uma substituição do N6 da aminopurina. As citocininas são derivadas da adenina (aminopurina) e têm um papel fundamental na diferenciação e regeneração de plantas na maioria das espécies. Induzem a divisão celular, proliferação e morfogênese da parte aérea. As citocininas mais usadas em cultura de tecidos são a cinetina (KIN), benzilaminopurina (BAP), zeatina (ZEA) e thidiazuron (TDZ) (JUNGHANS; SOUZA, 2013; ISLAM et al., 2017; PAWŁOWSKA et al., 2018).

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi comparar o efeito de diferentes combinações de citocinina (BAP) com auxina (ANA) no desenvolvimento *in vitro* de brotos de diferentes genótipos de gérbera.

Material e métodos

O experimento foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais - LCTV - Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro - UFRRJ.

Utilizou-se brotações dos genótipos de gérbera já estabelecidos *in vitro* e enraizados, com cerca de 5,0 cm de altura, recultivados duas vezes, com intervalo de 30 dias cada. O meio de cultura foi composto pelos sais de MS e vitaminas de White (MURASHIGE; SKOOG, 1962) (Phytotechnology Laboratories[®]), contendo 30 g L⁻¹, pH ajustado para 5,8 e 7,5 g L⁻¹ de ágar, sem adição de fitorregulador, a fim de uniformizar as plantas e eliminar resíduos dos fitorreguladores utilizados nas fases anteriores.

O experimento foi implantado no delineamento experimental inteiramente casualizado, no esquema fatorial 7x5x4, sendo sete genótipos de gérbera ('Pacific', 'Igloo', 'Igor', 'Mephisto', GA, GR, GL), cinco concentrações de citocinina – BAP (0,0; 2,22; 4,44; 8,88 e 17,76 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e quatro concentrações de auxina – ANA (0,0; 1,34; 2,68 e 5,36 $\mu\text{mol L}^{-1}$), com quatro repetições. A parcela foi representada por um frasco (120 x 68 mm) com 50 mL de meio de cultura e dois explantes.

O meio de cultura utilizado continham os sais do meio MS e vitaminas de White (Phytotechnology Laboratories®), com 30 g L⁻¹ de sacarose, pH ajustado a 5,8, suplementado com as diferentes combinações dos fitorreguladores propostos, na consistência sólida com 7,5 g L⁻¹ de ágar e autoclavagem por 15 minutos a 1,0 atm. e 121 °C.

Para obtenção dos explantes, as plantas tiveram todas as folhas e raízes retiradas com auxílio de bisturi, para estímulo das gemas axilares, e posteriormente, foram inoculados nos frascos, que foram vedados com filme de polietileno e, em seguida, transferidos à sala de crescimento com fotoperíodo de 16:8 (luz:escuro), irradiância em torno de 35 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fornecida por lâmpadas (OSRAM®, luz do dia). A temperatura e umidade foram registrados diariamente com auxílio de um termohidrógrafo (Instrutherm®). A temperatura média foi de 26,22 °C e a umidade relativa média foi 67,93%.

Após oito semanas de cultivo *in vitro* foram avaliados o número de brotos formados por explante (NBE), comprimento médio dos brotos (CMB). Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, depois de averiguadas a normalidade e homogeneidade. Quando verificada a significância nas interações ou nos fatores, foi aplicado o teste de média de Tukey, adotando-se 1 e 5% de probabilidade.

Para se investigar os níveis dos fitorreguladores dentro de cada genótipo, foi efetuada análise de variância da regressão, depois de processadas a normalidade e homogeneidade. Foram representados apenas com base na significância dos coeficientes de regressão e coeficiente de determinação (R²), adotando-se os níveis até 5% de probabilidade, utilizando-se o teste F. Todas as análises foram feitas pelo software Sisvar®. Os gráficos da regressão foram elaborados com o programa Excel 2013.

Resultados

A análise de variância mostrou efeito significativo das diferentes combinações dos fitorreguladores BAP e ANA testados (Tabela 1).

Tabela 1 - Resumo da análise de variância para a número de brotos por explante (NBE) de sete genótipos de gérbera após oito semanas de cultivo *in vitro* em diferentes concentrações de BAP e ANA.

Fontes de Variação	GL	Quadrado Médio
		NBE
Genótipo (GEN)	6	211,052976*
BAP	4	7752,440179*
ANA	3	909,492262*
GEN x BAP	24	166,001637*
GEN x ANA	18	171,633929*
BAP x ANA	12	302,969940 ^{ns}
GEN x BAP x ANA	72	105,446677 ^{ns}
Erro	420	23,961310
Total	559	
CV (%)		32,28
Média Geral		15,16

*Significativo pelo teste F (P≤0,05); ns – Não significativo pelo teste F (P≤0,05).

A variável NBE foi significativa para o fator genótipo, BAP, ANA (Figura 1) e as interações (Tabelas 2, 3 e 4).

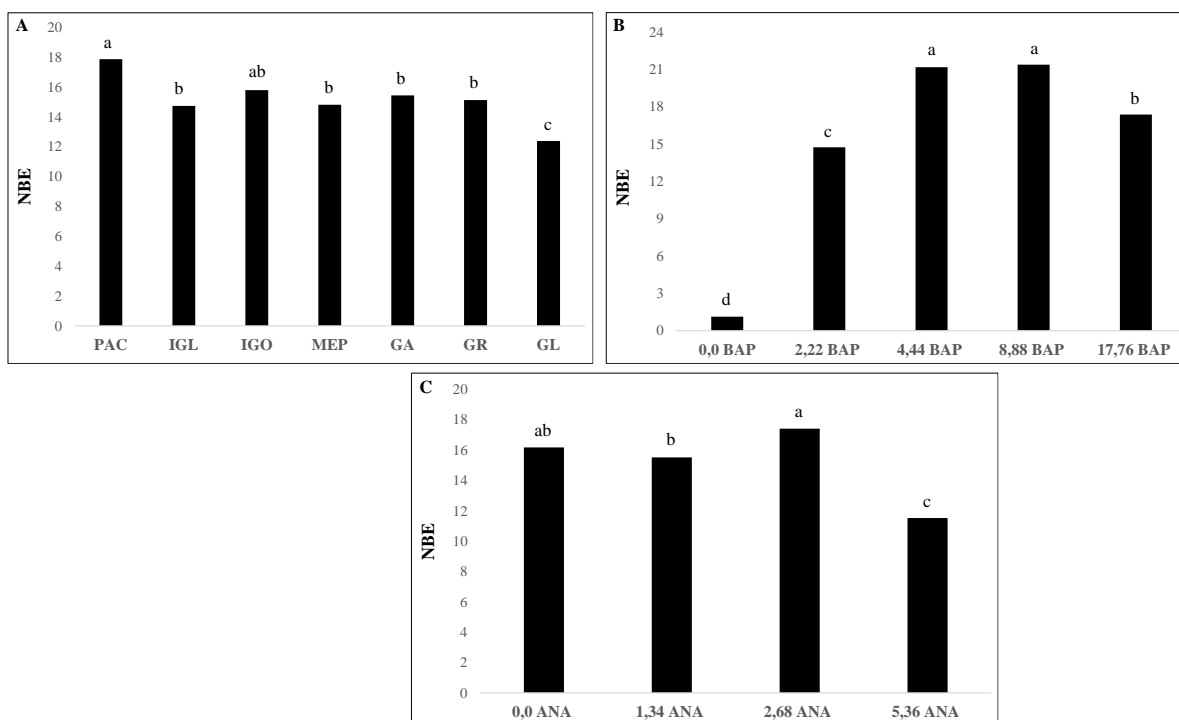


Figura 1 - Média do número de brotos por explante (NBE) nos fatores genótipo (A), BAP, em $\mu\text{mol L}^{-1}$ (B) e ANA, em $\mu\text{mol L}^{-1}$ (C), obtidos após oito semanas de cultivo *in vitro*.

Legenda: PAC-‘Pacific’, IGL-‘Igloo’, IGO-‘Igor’, MEP-‘Mephisto’, GA-gérbera amarela, GR-gérbera rosa, GL-gérbera laranja. As letras diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Observou-se na figura 1A que os genótipos demonstraram respostas diferentes para NBE nas combinações de BAP e ANA testadas, sendo que o genótipo ‘Pacific’ apresentou o mesmo número de brotos que ‘Igor’ e maior número de brotos que os demais genótipos.

Com relação ao fator BAP, a figura 1B mostra diferença entre as concentrações utilizadas para NBE, com destaque para 4,44 e 8,88 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de BAP, que foram estatisticamente iguais e superiores as demais. A ausência de BAP foi a que produziu o menor NBE e as concentrações 2,22 e 17,76 $\mu\text{mol L}^{-1}$ foram estatisticamente iguais para NBE.

Para o fator ANA, a figura 1C mostra que os tratamentos com ausência de auxina e 2,68 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de ANA foram estatisticamente iguais para NBE e a concentração de 5,36 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de ANA apresentou a menor produção de brotos.

A tabela 2 apresenta o resultado da interação genótipo x BAP para a variável NBE.

De acordo com a tabela 2, no tratamento com ausência de BAP não houve diferença entre os genótipos. Na concentração de 2,22 $\mu\text{mol L}^{-1}$ BAP, o genótipo ‘Igor’ apresentou o maior NBE. Com 4,44 $\mu\text{mol L}^{-1}$ BAP, os genótipos ‘Pacific’, ‘Igor’, ‘Mephisto’, GA e GR foram iguais estatisticamente para NBE. Com 8,88 $\mu\text{mol L}^{-1}$ BAP, ‘Pacific’ foi superior aos demais genótipos para NBE e na concentração 17,76 $\mu\text{mol L}^{-1}$ BAP, ‘Pacific’, ‘Igloo’, ‘Mephisto’, GA, GR e GL foram iguais para NBE.

Tabela 2 - Resumo da interação genótipo x BAP para número de brotos por explante obtido após oito semanas de cultivo *in vitro* dos sete genótipos de gérbera.

Tratamentos	BAP ($\mu\text{mol L}^{-1}$)				
	0,0	2,22	4,44	8,88	17,76
'Pacific'	1,187 aD	15,562 abC	21,062 abcB	33,750 aA	17,812 abBC
'Igloo'	1,187 aC	10,937 bB	19,562 bcA	22,187 bA	19,812 aA
'Igor'	1,125 aC	19,812 aA	21,687 abcA	22,00 bA	14,312 bB
'Mephisto'	1,187 aC	15,125 abB	22,625 abA	17,750 bcB	17,375 abB
GA	1,187 aC	14,625 bB	24,750 aA	20,812 bA	15,812 abB
GR	1,062 aC	14,250 bB	18,375 abcAB	21,875 bcA	20,062 aA
GL	1,000 aB	12,937 bA	16,750 cA	14,812 cA	16,437 abA

Médias seguidas pelas letras minúsculas na coluna e maiúscula na linha diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Também pela tabela 2 e dentro de cada genótipo, em 'Pacific' a melhor concentração para NBE foi 8,88 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de BAP. Em 'Igloo' (4,44; 8,88 e 17,76 $\mu\text{mol L}^{-1}$ BAP) foram iguais estatisticamente para NBE. Em 'Igor' (2,22; 4,44 e 8,88 $\mu\text{mol L}^{-1}$ BAP) foram iguais estatisticamente para NBE. Em 'Mephisto' a melhor concentração para NBE foi com 4,44 $\mu\text{mol L}^{-1}$ BAP. Para GA, 4,44 e 8,88 $\mu\text{mol L}^{-1}$ BAP foram iguais para NBE. Em GR (4,44; 8,88 e 17,76 $\mu\text{mol L}^{-1}$ BAP) foram iguais estatisticamente para NBE e em GL somente a ausência de BAP não se igualou às demais concentrações.

A tabela 3 apresenta o resultado da interação genótipo x ANA para a variável NBE.

Conforme a tabela 3, no tratamento com ausência de ANA os genótipos 'Pacific', 'Igloo', 'Igor' e 'Mephisto' foram iguais e superiores para NBE. Na concentração de 1,34 $\mu\text{mol L}^{-1}$, os genótipos 'Pacific' e GA foram superiores aos demais para NBE. Com 2,68 $\mu\text{mol L}^{-1}$ os genótipos 'Pacific', 'Igloo', 'Igor' e GA foram iguais e superiores para NBE e para concentração 5,36 $\mu\text{mol L}^{-1}$, 'Pacific', 'Mephisto', GR e GL foram iguais e superiores para NBE.

Tabela 3 - Resumo da interação genótipo x ANA para número de brotos por explante (NBE) obtido após oito semanas de cultivo *in vitro* dos sete genótipos de gérbera.

Tratamentos	ANA ($\mu\text{mol L}^{-1}$)			
	0,0	1,34	2,68	5,36
'Pacific'	16,05 abB	21,95 aA	21,25 aA	12,25 abB
'Igloo'	15,90 abB	12,75 cdBC	21,05 aA	9,25 bC
'Igor'	17,35 abA	16,65 bcA	19,70 abA	9,45 bB
'Mephisto'	19,95 aA	13,75 cdB	11,75 dB	13,80 abB
GA	15,05 bA	18,50 abA	17,85 abcA	10,35 bB
GR	14,85 bA	14,15 bcdA	16,20 bcdA	15,30 aA
GL	14,15 bA	10,95 dA	14,15 cdA	10,30 bA

Médias seguidas pelas letras minúsculas na coluna e maiúscula na linha diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Dentro de cada genótipo, em 'Pacific' 1,34 e 2,68 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de ANA foram superiores para NBE. Em 'Igloo', a melhor concentração para NBE foi com 2,68 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de ANA. Para 'Igor', a ausência de ANA, 1,34 e 2,68 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de ANA foram superiores para NBE. Em 'Mephisto' a ausência de ANA proporcionou o maior NBE. Em GA a ausência de ANA, 1,34 e 2,68 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de ANA foram superiores para NBE. E, em GR e GL não houve diferença significativa entre os tratamentos.

Para se verificar a tendência de resposta das diferentes concentrações de BAP e ANA, foi realizado a análise de variância da regressão para cada genótipo de gérbera (dados não mostrados) e os significativos foram apresentados. Assim, foi possível identificar e recomendar a melhor concentração para as variáveis analisadas. A análise de regressão dos níveis de citocinina e auxina testados para o genótipo ‘Pacific’ está apresentada na figura 2.

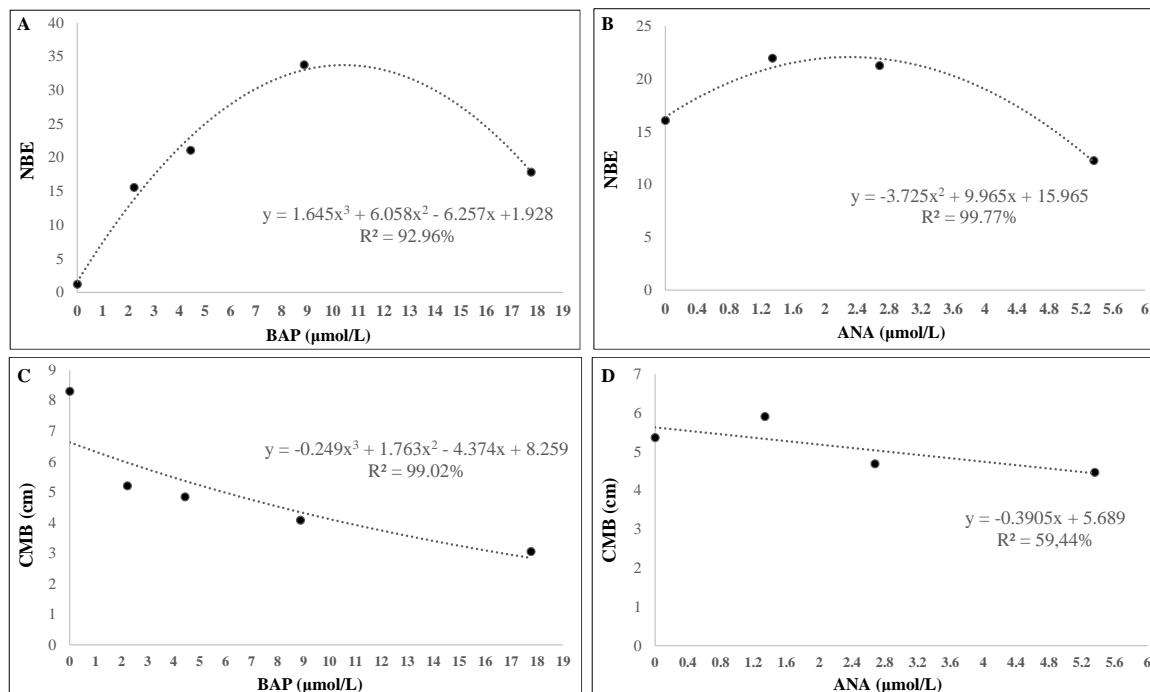


Figura 2 - Regressão polinomial dos valores médios do número de brotos por explante (NBE) e comprimento médio do broto (CMB) do genótipo ‘Pacific’ submetido a diferentes níveis de citocininas (A e C) e auxinas (B e D) após oito semanas de cultivo *in vitro*.

Para o genótipo ‘Pacific’, verificou-se que a resposta foi cúbica (Figura 2A) para os diferentes níveis de BAP na variável NBE, com a melhor concentração observada em $8,88 \mu\text{mol L}^{-1}$, que produziu em média 33,75 brotos após oito semanas de cultivo *in vitro*. Para ANA a resposta foi quadrática (Figura 2B), sendo que a concentração de $1,34 \mu\text{mol L}^{-1}$ propiciou a maior quantidade média de brotos (21,95).

Para a variável CMB, a resposta foi cúbica (Figura 2C) para BAP, com o maior valor do tamanho do broto na ausência de BAP ao meio de cultura. E para ANA a resposta foi linear negativa, ou seja, o aumento dos níveis de ANA (Figura 2D) causou a diminuição do CMB, assim como verificado para BAP.

A análise de regressão dos níveis de citocinina e auxina testados para o genótipo ‘Igloo’ está apresentada na figura 3.

Em ‘Igloo’, observou-se que a resposta foi quadrática (Figura 3A) para a variável NBE nos diferentes níveis de BAP testados, com a maior produção média de brotos constatada na concentração de $8,88 \mu\text{mol L}^{-1}$ (22,18). Entretanto, pela equação de regressão de BAP, com uma concentração de $11,54 \mu\text{mol L}^{-1}$, seria possível obter valor máximo de 28,84 brotos. Na figura 3B verificou-se uma resposta cúbica nos diferentes níveis de ANA para NBE, com a maior produção média de brotos obtidos na concentração de $2,68 \mu\text{mol L}^{-1}$ (21,05).

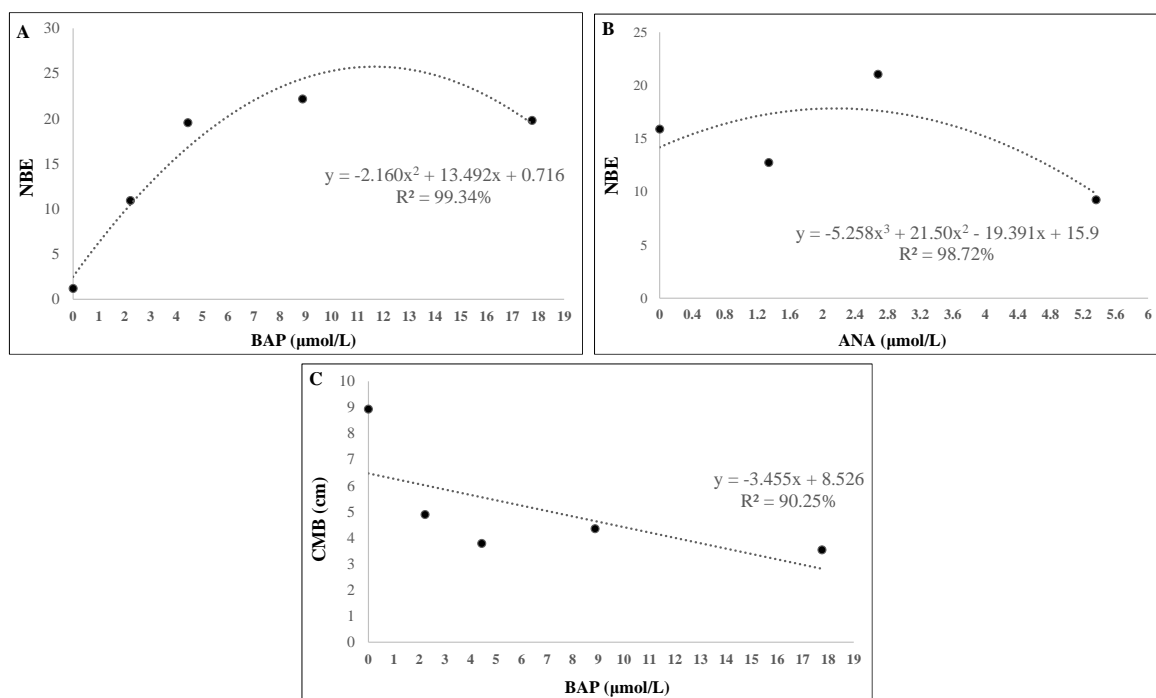


Figura 3 - Regressão polinomial dos valores médios do número de brotos por explante (NBE) e comprimento médio de brotos (CMB) do genótipo 'Igló' submetido a diferentes níveis de citocininas (A e C) e auxina (B) após oito semanas de cultivo *in vitro*.

Para a variável CMB, foi obtida uma resposta linear negativa (Figura 3C) nos níveis de BAP, ou seja, o aumento dos níveis de BAP causou a redução do CMB. Essa mesma resposta também foi vista no genótipo 'Pacific'. Para os níveis de ANA dessa variável, a análise de variância da regressão não mostrou diferença significativa entre os níveis testados. Assim, as concentrações de auxina demonstraram a mesma resposta para este genótipo.

A análise de regressão dos níveis de citocinina e auxina testados para o genótipo 'Igor' está apresentada na figura 4.

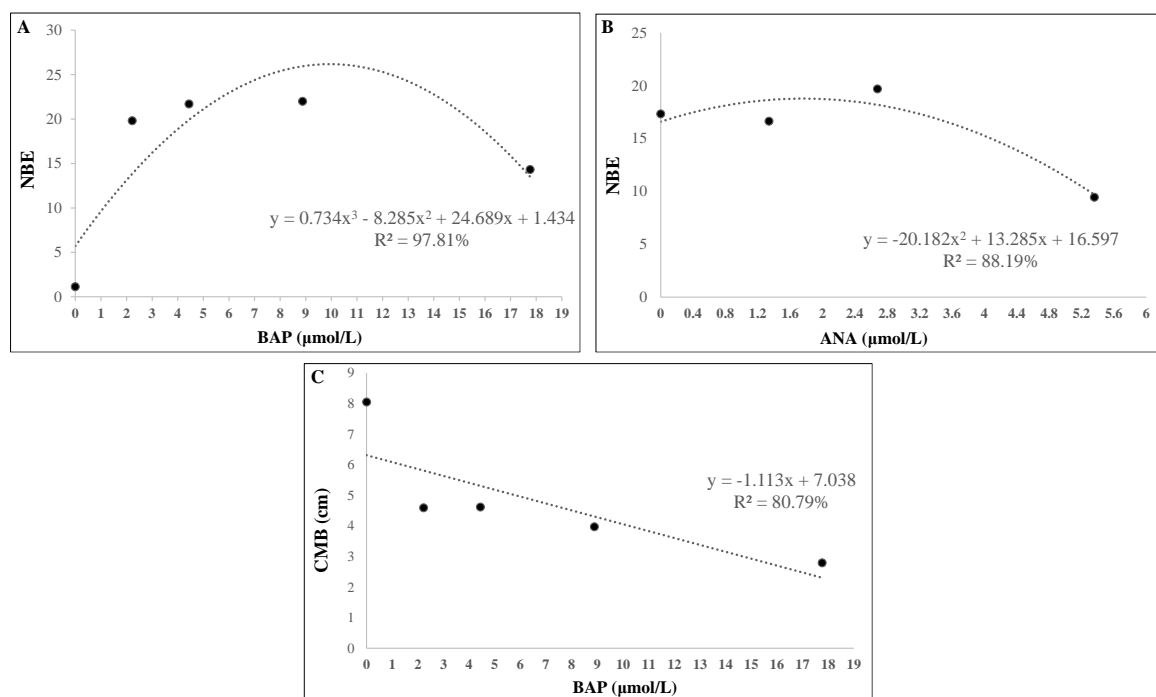


Figura 4 - Regressão polinomial dos valores médios do número de brotos por explante (NBE) e comprimento médio de brotos (CMB) do genótipo 'Igor' submetido a diferentes níveis de citocininas (A e C) e auxina (B) após oito semanas de cultivo *in vitro*.

Para ‘Igor’, na figura 4A, a resposta para os níveis de BAP foi cúbica, sendo encontrado o maior NBE (22 brotos) na concentração de $8,88 \mu\text{mol L}^{-1}$. Porém, pela equação de regressão de BAP, com uma concentração de $9,77 \mu\text{mol L}^{-1}$, seria possível obter valor máximo de 24,20 brotos. Nos níveis de ANA a resposta foi quadrática (Figura 4B), com a maior produção média de brotos (19,7) na concentração de $2,68 \mu\text{mol L}^{-1}$.

Para variável CMB, a resposta nos diferentes níveis de BAP foi linear negativa (Figura 4C), sendo constatado a mesma resposta dos genótipos anteriores. Assim como foi verificado no genótipo ‘Igloo’, a análise de variância da regressão também não mostrou diferença significativa entre os níveis de ANA testados para a variável CMB.

A análise de regressão dos níveis de citocinina e auxina testados para o genótipo ‘Mephisto’ está apresentada na figura 5.

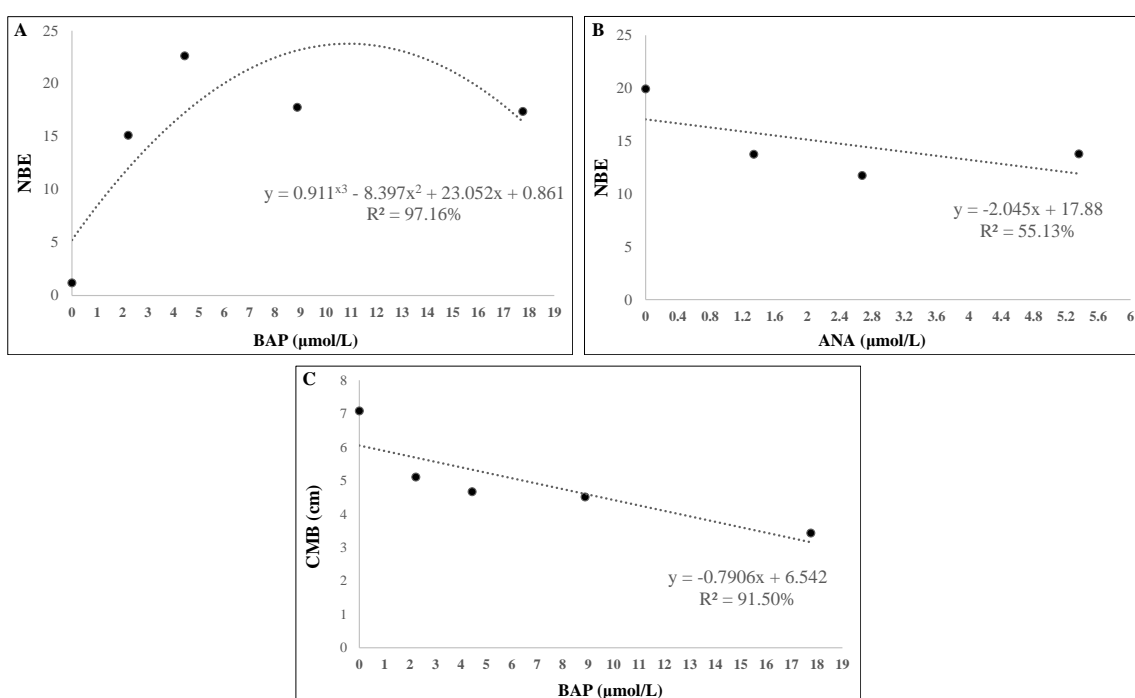


Figura 5 - Regressão polinomial dos valores médios do número de brotos por explante (NBE) e comprimento médio de brotos (CMB) do genótipo ‘Mephisto’ submetido a diferentes níveis de citocininas (A e C) e auxina (B) após oito semanas de cultivo *in vitro*.

Em ‘Mephisto’, verificou-se uma resposta cúbica para os níveis de BAP testados (Figura 5A). Para NBE a melhor concentração vista foi encontrada quando se utilizou $4,44 \mu\text{mol L}^{-1}$ (22,62 brotos). Todavia, pela equação de regressão de BAP, com uma concentração de $10,65 \mu\text{mol L}^{-1}$, seria possível obter valor máximo de 24,78 brotos. Os níveis de ANA exibiram resposta linear negativa (Figura 5B) com a melhor concentração encontrada para NBE na ausência da auxina (19,95).

Como verificado anteriormente nos genótipos, a variável CMB mostrou uma redução quando se aumentou a concentração de BAP, apresentando uma resposta linear negativa (Figura 5C) e os níveis de ANA não diferiram estatisticamente entre si.

A análise de regressão dos níveis de citocinina e auxina testados para o genótipo GA está apresentada na figura 6.

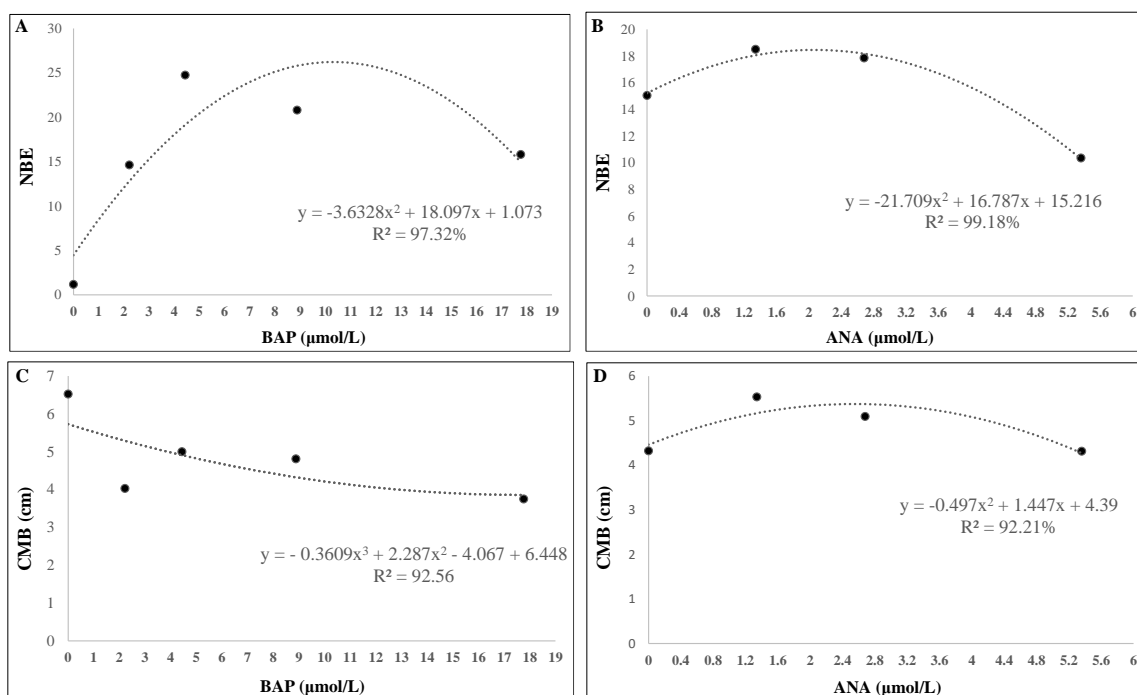


Figura 6 - Regressão polinomial dos valores médios do número de brotos por explante (NBE) e comprimento médio de brotos (CMB) do genótipo GA submetido a diferentes níveis de citocininas (A e C) e auxinas (B e D) após oito semanas de cultivo *in vitro*.

No genótipo GA a resposta para os níveis de BAP foi quadrática (Figura 6A), sendo observado o maior NBE (24,75) na concentração de 4,44 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de BAP. Contudo, pela equação de regressão de BAP, com uma concentração de 10,21 $\mu\text{mol L}^{-1}$, seria possível obter valor máximo de 25,85 brotos. Para ANA, verificou-se uma resposta quadrática (Figura 6B) com a redução de NBE quando houve aumento dos níveis de auxina. Neste caso, a concentração de 1,34 $\mu\text{mol L}^{-1}$ foi a que mais contribuiu para produção média de brotos (18,5).

Para variável CMB, observou-se uma resposta cúbica nos níveis de BAP (Figura 6C), com a redução do comprimento do broto à medida que se aumentou a concentração de BAP. A resposta foi quadrática nos níveis de ANA (Figura 6D), com a melhor concentração para a variável CMB quando se utilizou 1,34 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

A análise de regressão dos níveis de citocinina e auxina testados para o genótipo GR está apresentada na figura 7.

No genótipo GR, verificou-se uma resposta quadrática nos níveis de BAP (Figura 7A), com a melhor concentração observada para NBE quando se utilizou 4,44 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (21,875 brotos). Mas, pela equação de regressão de BAP, com uma concentração de 11,54 $\mu\text{mol L}^{-1}$, constatou-se que seria possível obter valor máximo de 26,28 brotos. Para os níveis de ANA a análise de variância da regressão mostrou que os mesmos não foram significativos, ou seja, a adição ou não de auxina não tem influência sobre a produção de brotos.

Para a variável CMB, a resposta dos níveis de BAP foi quadrática (Figura 7B), com a redução do comprimento dos brotos à medida que se aumentou a concentração de BAP. A resposta também foi quadrática para os níveis de ANA (Figura 7C), com a melhor concentração observada para a variável CMB (4,8 cm) quando foi utilizado 2,68 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Entretanto, pela equação de regressão de ANA, com uma concentração de 1,88 $\mu\text{mol L}^{-1}$, seria possível obter brotos com 4,9 cm.

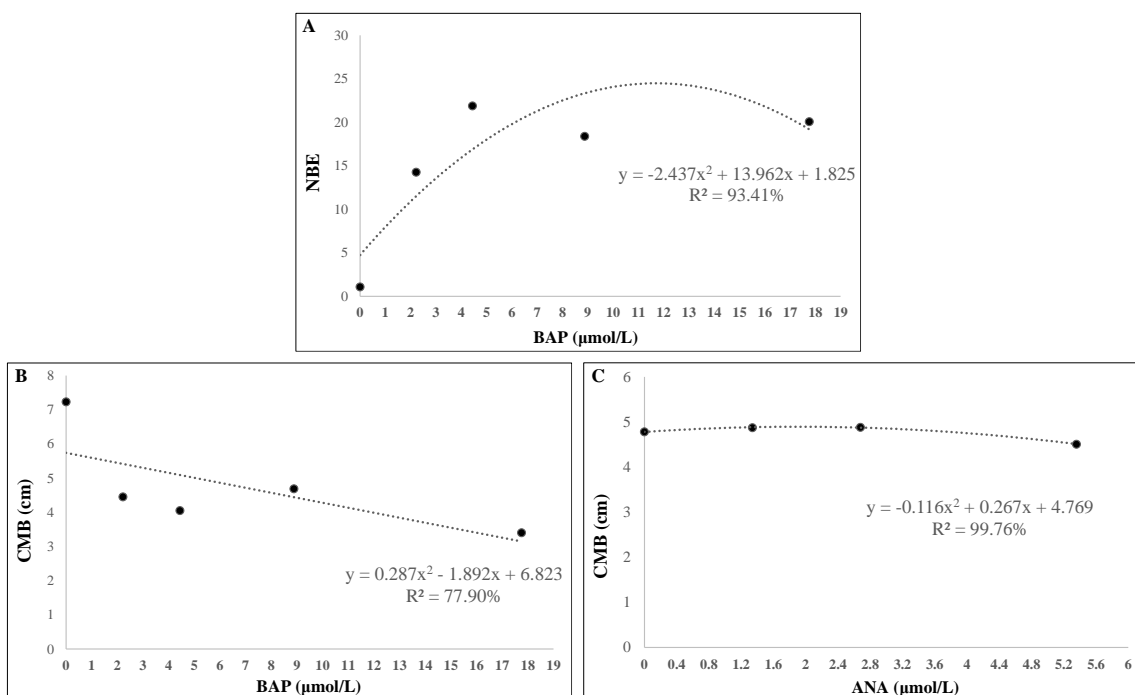


Figura 7 - Regressão polinomial dos valores médios do número de brotos por explante (NBE) e comprimento médio de brotos (CMB) do genótipo GR submetida a diferentes níveis de citocininas (A e B) e auxina (C) após oito semanas de cultivo *in vitro*.

A análise de regressão dos níveis de citocinina e auxina testados para o genótipo GL está apresentada na figura 8.

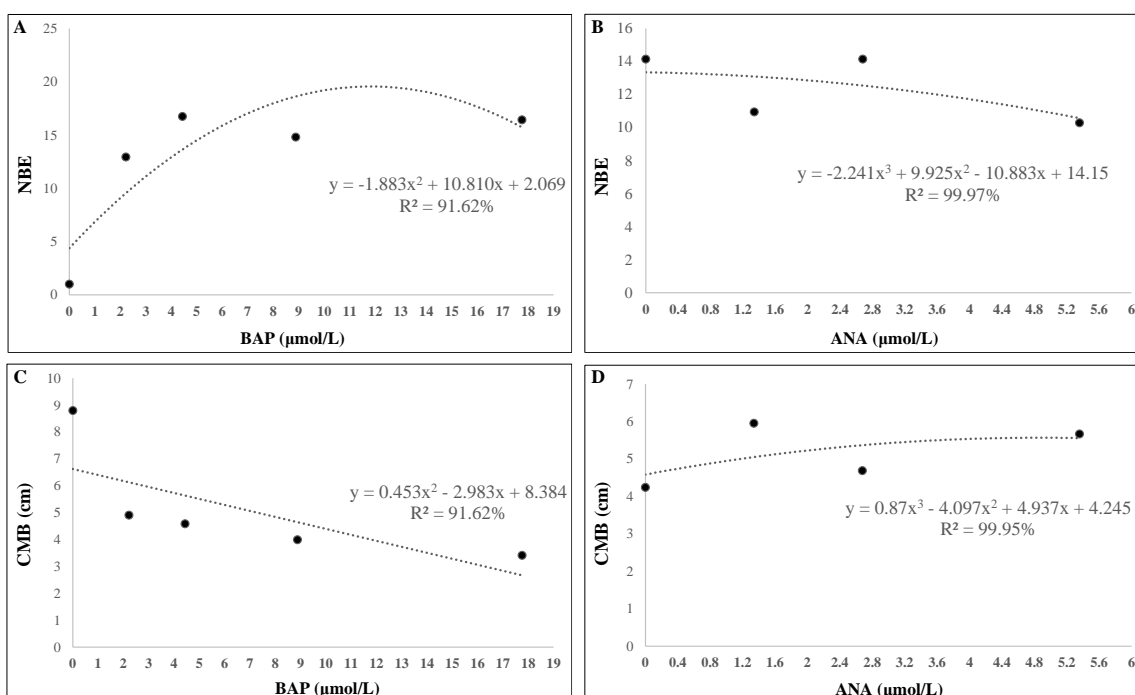


Figura 8 - Regressão polinomial dos valores médios do número de brotos por explante (NBE) e comprimento médio de brotos (CMB) do genótipo GL submetido a diferentes níveis de citocininas (A e C) e auxinas (B e D) após oito semanas de cultivo *in vitro*.

Para a variável NBE, a resposta dos níveis de BAP foi quadrática (Figura 8A), com o maior valor notado (16,75) nessa variável quando foi utilizado $4,44 \mu\text{mol L}^{-1}$ de BAP. Porém, de acordo com a equação de regressão de BAP, a uma concentração de $11,54 \mu\text{mol L}^{-1}$, seria possível obter valor máximo de 19,26 brotos. Nos níveis de ANA a resposta foi cúbica (Figura 8B). Deve-se atentar

que dois níveis tiveram médias de NBE iguais quando ausência de ANA (14,18 brotos) e a concentração $2,68 \text{ mg L}^{-1}$ (14,15). Neste caso, a ausência de auxina teria a mesma resposta se ela fosse adicionada ao meio de cultura.

O resultado para a variável CMB foi quadrático nos níveis de BAP (Figura 8C). Como foi observado em todos os genótipos anteriores, o aumento da concentração da citocinina testada provocou uma redução do tamanho dos brotos. Para os níveis de ANA a resposta foi cúbica (Figura 8D), sendo que a concentração de $1,34 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ exibiu maior CMB.

Discussão

O crescimento e a morfogênese de plantas *in vitro* são regulados pela interação e pelo equilíbrio entre os fitorreguladores fornecidos no meio de cultura e o crescimento pelas substâncias produzidas endogenamente nas células das plantas cultivadas (GEORGE et al., 2008). A multiplicação *in vitro* em gérbera depende das combinações auxina/citocinina, de modo que o procedimento de regeneração em brotos deve ser otimizado para cada cultivar trabalhada (PAWŁOWSKA et al., 2018).

O aumento nas concentrações relativas de BAP produziu diferentes respostas para o percentual de explantes responsivos nos genótipos estudados. Assim, em alguns genótipos é possível que as concentrações mais elevadas de BAP tenham interagido com o nível endógeno de citocininas, e assim tenham causado efeito fitotóxico, inibindo a diferenciação celular (KERBAUY, 2008). Por outro lado, em outros genótipos, o suprimento exógeno mais elevado favoreceu à indução da organogênese. É possível que o nível endógeno de citocininas e, ou a quantidade de receptores hormonais sejam baixo, nestes genótipos, necessitando de maiores concentrações exógenas de BAP.

Com relação ao balanço hormonal, diversos trabalhos com diferentes combinações de citocininas e auxinas foram examinadas para obter indução de brotos e proliferação de vários tipos de genótipos de gérbera e corroboraram com os resultados desta pesquisa.

Sato et al. (2001) avaliaram a multiplicação *in vitro* da gérbera de vaso e relataram maior produção de brotos utilizando $8,88 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de BAP e ausência de auxina.

Kumar e Kanwar (2007) estudaram o balanço hormonal auxina/citocinina na conversão de brotos a partir de calos da gérbera de vaso e obtiveram maior produção de brotos quando foi utilizado $4,44 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de BAP e ausência de auxina.

Armas et al. (2002) realizaram seus estudos de micropropagação com a gérbera 'Paolo' em um laboratório comercial (biofábrica) e recomendaram que a combinação $8,88 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de BAP + $3,71 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de AIA foi a que proporcionou a maior produção de brotos.

Sousa e Miranda (2006) compararam o efeito de diferentes combinações de auxina (AIB, 0,0; 0,25 e $2,46 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$) com duas fontes de citocinina (BAP e cinetina, 0,0; 2,22; 4,44; 8,88 e $17,76 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$) na multiplicação *in vitro* do genótipo 'Ornela'. Os autores verificaram que a combinação de $2,22 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de BAP com qualquer concentração da auxina foi a mais eficiente na multiplicação e produção de brotos.

Nazari et al. (2014) estudaram o efeito do balanço hormonal ANA/BAP na multiplicação *in vitro* da gérbera 'Royal Soft Pink' e perceberam que as combinações $8,88 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de BAP + $1,07 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de ANA proporcionou a maior proliferação dos brotos. Nunes et al. (2015) avaliaram a resposta dos fitorreguladores BAP e ANA em diversas concentrações nos explantes foliares da gérbera de vaso 'Cherry', para a obtenção de calos para posterior estudo de micropropagação. Assim, relataram que as melhores combinações dos fitorreguladores para obtenção de calos friáveis foram

4,44/5,36 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de BAP/ANA e 4,44/10,74 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de BAP/ANA. Os autores relataram ainda que a organogênese é controlada pela concentração e balanço auxina/citocinina existentes em meio de cultura sendo a citocinina ativa na indução e regeneração de parte aérea das plântulas e inibindo a formação de raízes. Por outro lado, estimula a formação de gemas axilares, o que leva a formação de calos comandada pela auxina.

Mohamed e Özzambakb (2014) encontraram resultados diferentes desta pesquisa com relação ao aumento dos níveis de BAP. Nos genótipos testados neste experimento o aumento do nível diminuiu a produção de brotos, já os autores declararam que as gérberas ‘Ameretto’, ‘Red Bull’ e ‘Yanara’ produziram mais brotações na combinação de 22,20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de BAP + 0,54 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de ANA. Os autores também notaram repostas diferentes entre as gérberas de seus estudos, e entre as mesmas, ‘Red Bull’ foi a mais produtiva na combinação anteriormente citada.

Mishra et al. (2014) avaliaram o balanço hormonal auxina/citocinina na multiplicação *in vitro* das gérberas ‘Tamara’ e ‘Panamá’. Em suas pesquisas, testaram diferentes combinações das citocininas (BAP, cinetina e TDZ) e das auxinas (ANA, AIB e AIA) e constataram a maior taxa de multiplicação *in vitro* com a combinação 8,88 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de BAP + 5,71 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de AIA.

Neste experimento o enraizamento foi alto em todos os tratamentos sem adição de BAP e em todas as concentrações de ANA utilizadas, sem diferença significativa entre os sete genótipos de gérbera. Tal fato demonstra que a espécie estudada é de fácil enraizamento.

Verificou-se que a presença da auxina aumentou a incidência do número de raízes, bem como reduziu o tempo necessário para o seu início. Deve-se considerar também, que as plantas do tratamento controle (ausência de BAP e ANA) também tiveram raiz, mas em menor quantidade e tamanho, entretanto sem diferença significativa para os outros tratamentos, demonstrando que existiu um nível endógeno de auxina nas brotações e que estimulou o enraizamento. No presente estudo, a ocorrência de indução de raízes aumentou com a elevação das concentrações de auxina, mas começou a diminuir seguindo um nível ótimo.

Com respeito ao comprimento médio dos brotos, observou-se que nos tratamentos com ausência de BAP os brotos tiveram maior valor, quando comparados com os tratamentos que apresentaram BAP. Isso se deve ao efeito inibitório da citocinina no crescimento e desenvolvimento da brotação (quebra da dominância apical), induzindo maior número de brotos, mas com tamanho pequeno (GANTAIT et al., 2010).

Nazari et al. (2014) obtiveram maior CMB da gérbera ‘Royal Soft Pink’, quando foi utilizado 2,68 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de ANA e sem adição de BAP. Os autores declararam que os aumentos dos níveis de ANA estimularam a formação de calos, fato também visto com genótipos desta pesquisa.

Islam et al. (2017) estudaram a multiplicação *in vitro* de diferentes genótipos de gérbera (‘Spark’, ‘Melonepink’, ‘Alabanda’, ‘Aladin’, ‘Kristen’, ‘Wink’, ‘Pepe’, ‘Silvester’, ‘Sonata’) em diferentes combinações de BAP e ANA. Os autores relataram diferentes repostas entre as gérberas, e que em cada genótipo o balanço auxina/citocinina foi diferente para NBE. Em geral, destacaram que a concentração de 8,88 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de BAP + 1,34 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de ANA foi a que proporcionou maior quantidade média de brotos nos genótipos. Enfatizaram ainda que os resultados obtidos nos estudos estão relacionados com as características fisiológicas e morfológicas das células vegetais e que, variam em função de fatores genéticos de cada indivíduo, fatores ligados aos caracteres originados durante a ontogênese e, por último, do estímulo do ambiente.

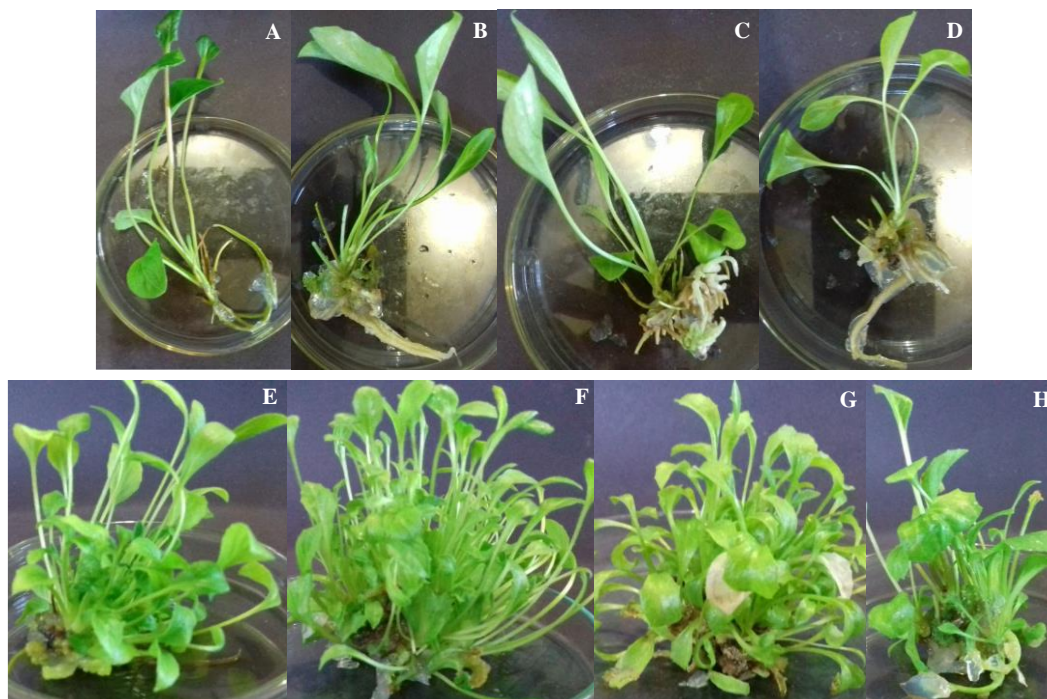
Em todos os genótipos testados, verificou-se que a adição de BAP proporcionou a proliferação de brotos *in vitro* até certo ponto considerado ideal, e posteriormente a maior concentração provocou a redução da proliferação. Esses resultados são consistentes com a afirmação de Rodrigues e Kerbauy

(2009), que relataram que elevadas concentrações de citocininas podem reduzir a multiplicação e tamanho das brotações no cultivo *in vitro*.

É interessante notar que os maiores comprimentos de brotos, por sua vez, foram obtidos em meio de cultura sem suplementação com fitorreguladores. Possivelmente, a concentração endógena de fitohormônios dos genótipos estudados seja suficiente para estimular o crescimento dos brotos formados. Essa constatação ratifica a teoria de que a indução ou a inibição dos processos morfogênicos *in vitro* dependem do balanço e da interação entre as substâncias de crescimento endógenas e exógenas (JUNGHANS; SOUZA, 2013). Assim, sugere-se que após a multiplicação, os brotos dos genótipos sejam transferidos para meio de cultura sem fitorreguladores, para promoção de seu crescimento.

De modo geral, diferenças no balanço hormonal auxina/citocinina nos genótipos de gérbera foi constatado. Nesse caso, vários fatores são considerados como responsáveis pelas diferentes respostas organogênicas verificadas nos distintos genótipos. Dentre estes, destaca-se que no processo de regeneração, explantes com intensidades variadas de determinação celular adquirem nova competência, por meio da ação de sinais químicos (balanço hormonal auxina/citocinina), que ativam seletivamente determinado grupo de genes (epigênese), ocorrendo diferentes respostas na formação de calos, gemas, brotos e, ou embriões (RODRIGUES; KERBAUY, 2009). Além disso, para George et al. (2008), houve a inibição do alongamento após a indução do BAP, pois a citocinina promove a cauligênese e inibe o alongamento.

Neste contexto, a figura 10 apresenta o exemplo do balanço hormonal auxina/citocinina obtido na gérbera 'Pacific' com as concentrações (BAP+ANA), representando assim, os demais genótipos estudados nesta pesquisa.



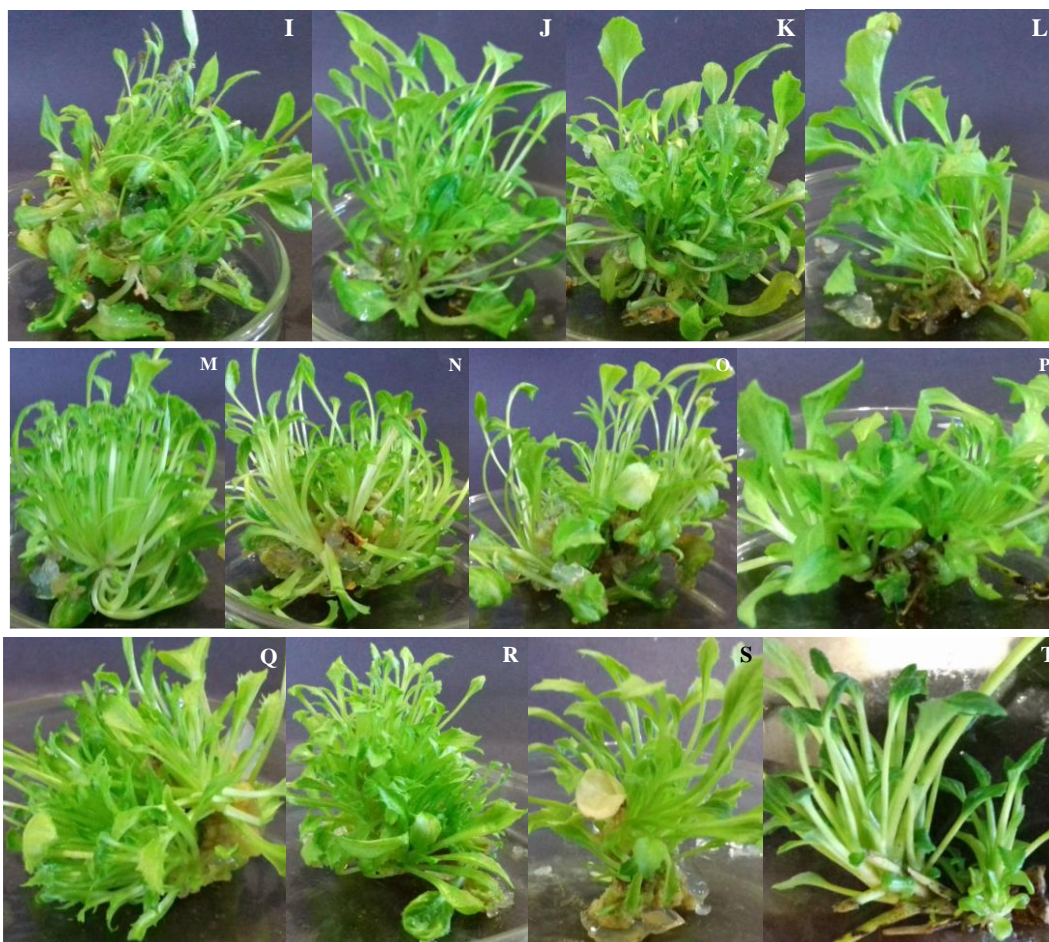


Figura 10 - Concentração BAP+ANA ($\mu\text{mol L}^{-1}$) na micropropagação do genótipo 'Pacific' após oito semanas de cultivo *in vitro*. (A) 0,0 + 0,0; (B) 0,0 + 1,34; (C) 0,0 + 2,68; (D) 0,0 + 5,36; (E) 2,22 + 0,0; (F) 2,22 + 1,34; (G) 2,22 + 2,68; (H) 2,22 + 5,36; (I) 4,44 + 0,0; (J) 4,44 + 1,34; (K) 4,44 + 2,68; (L) 4,44 + 5,36; (M) 8,88 + 0,0; (N) 8,88 + 1,34; (O) 8,88 + 2,68; (P) 8,88 + 5,36; (Q) 17,76 + 0,0; (R) 17,76 + 1,34; (S) 17,76 + 2,68; (T) 17,76 + 5,36. Fonte: Os autores.

Conclusões

Os balanços de BAP e ANA ideais para cada genótipo de gérbera são variáveis, portanto, não deve ser recomendado de forma genérica. Para os genótipos estudados as recomendações são:

Genótipo	BAP ($\mu\text{mol L}^{-1}$)		ANA ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	
	Multiplificação	Enraizamento	Multiplificação	Enraizamento
'Pacific'	8,88	0,0	1,34	0,0
'Igloo'	11,54	0,0	2,68	0,0
'Igor'	9,77	0,0	2,68	0,0
'Mephisto'	10,65	0,0	0,0	0,0
GA	10,21	0,0	1,34	1,34
GR	11,54	0,0	0,0	1,88
GL	11,54	0,0	0,0	1,34

Agradecimentos

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) e ao Curso de Pós-Graduação em Fitotecnia. À Universidade Federal Fluminense (UFF) e aos floricultores que doaram as gérberas para a realização da pesquisa de doutorado do primeiro autor.

Referências bibliográficas

- ARMAS, P.M.; PEÑALVER, D.A.; SÁNCHEZ, N.A.; SÁNCHEZ, D.D.; FLEITES, L.G. Micropropagación de *Gerbera jamesonii* H. Bolus. **Biotecnología Vegetal**, v. 2, n. 3, p. 169-178, 2002.
- CARDOSO, J.C.; SILVA, J.A.T. Gerbera micropropagation. **Biotechnology Advances**, v. 1, n. 1, p. 1-14, 2013.
- CHUNG, M.; KIM, M.B.; CHUNG, Y.M.; NOU, I.; KIM, C.K. *In vitro* shoot regeneration and genetic transformation of the gerbera (*Gerbera hybrida* Hort.) cultivar 'Gold Eye'. **Plant Biotechnology Journal**, v. 43, p. 255-260, 2016.
- GANTAIT, S.; MANDAL, N.; BHATTACHARYYA, S.; DAS, P.K. An elite protocol for accelerated quality-cloning in *Gerbera jamesonii* Bolus cv. Sciella. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 46, p. 537-548, 2010.
- GEORGE, E.F.; HALL, M.A.; DE KLERK, G. (Org.). **Plant Propagation by Tissue Culture**. 3rd ed. Dordrecht, The Netherlands: Springer, v. 1, 2008, 504p.
- ISLAM, M.M.; MAMUN, A.A.; DASH, P.K.; KUNDU, R.R.; AKTER, J. A sustainable technique of rapid multiplication of gerbera (*Gerbera jamesonii*) using *in vitro* seed culture. **International Journal of Current Research**, v. 9, n. 8, p. 55326-55329, 2017.
- JUNGHANS, T.G.; SOUZA, A.S. **Aspectos práticos da micropropagação de plantas**. 2^a ed. Brasília, DF: Embrapa, 2013, 407p.
- KERBAUY, G.B. **Fisiologia Vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008, 452p.
- KUMAR, S.; KANWAR, J.K. Plant regeneration from cell suspensions in *Gerbera jamesonii* Bolus. **Journal of Fruit and Ornamental Plant Research**, v. 15, p. 157-166, 2007.
- MISHRA, S.J.; CHANDRA, R.; PRASAD, L.; PATEL, R.K. Influence of some phytohormones based culture medium on *in vitro* multiplication of gerbera (*Gerbera jamesonii*). **HortFlora Research Spectrum**, v. 3, n. 1, p. 65-68, 2014.
- MOHAMED, S.A.; ÖZZAMBAKB, M.E. Shoot regeneration capacity of *in vitro* cultures of some Gerbera (*Gerbera jamesonii* Bolus) explants. **Sudanese Journal of Agricultural Sciences**, v. 1, p. 24-29, 2014.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 1, p. 473- 497, 1962.
- NAZARI, F.; KHOSH-KHUI, M.; AZADI, P.; SALEHI, H.; NIAZI A. Growth regulators affected *in vitro* propagation of pot gerbera (*Gerbera jamesonii* cv. Royal Soft Pink). **International Journal of Agriculture and Biosciences**, v. 3, n. 4, p. 85-189, 2014.
- NUNES, R.C.A.; VIANA, R.S.; MACHADO NETO, N.B. Atividade enzimática da superóxido dismutase em resposta aos fitorreguladores em *Gerbera jamesonii*. **Comunicata Scientiae**, v. 6, n. 1, p. 83-89, 2015.
- PAWŁOWSKA, B.; ŻUPNIK, M.; SZEWCZYK-TARANIEK, B.; CIOĆ, M. Impact of LED light sources on morphogenesis and levels of photosynthetic pigments in *Gerbera jamesonii* grown *in vitro*. **Horticulture, Environment, and Biotechnology**, v. 59, n. 1, p. 115-123, 2018.
- RODRIGUES, M.A.; KERBAUY, G.B. Meristemas: fontes de juventude e plasticidade no desenvolvimento vegetal. **Hoehnea**, v. 36, n. 4, p. 525-549, 2009.

SATO, A.Y.; PINTO, J.E.B.P.; MORAIS, A.R.; LAMEIRA, O.A.; CASTRO, N.E.A. efeito de diferentes níveis de nitrogênio, em presença ou ausência de benzilaminopurina, na multiplicação de gérbera (*Gerbera* sp.) de vaso. **Ciência & Agrotecnologia**, v. 25, n. 5, p. 1071-1078, 2001.

SOUSA, C.M.; MIRANDA, R.M. Otimização do balanço entre auxina e citocinina para multiplicação *in vitro* de *Gerbera jamesonii* var. 'Ornela'. **Agronomia**, Seropédica, v. 40, n. 1-2, p. 66-72, 2006.

Recebido em 28 de janeiro de 2021
Aceito em 14 de março de 2021