

**CULTURA DE TECIDOS EM *GERBERA***

**RITA DE CÁSSIA ALVES NUNES**

**CULTURA DE TECIDOS EM *GERBERA***

**RITA DE CÁSSIA ALVES NUNES**

Dissertação apresentada a Pró Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade o Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Agronomia.

Área de concentração: Produção Vegetal.

Orientador:

Prof. Nelson Barbosa Machado Neto, Dr.

|                |  |
|----------------|--|
| 660.6<br>N972c | <p>Nunes, Rita Cássia Alves<br/>Cultura de tecido em <i>Gérbera</i> / Rita Cássia<br/>Alves Nunes - Presidente Prudente: [s.n.], 2008.<br/>58 f.</p> <p>Dissertação (Mestrado em Agronomia) –<br/>Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE:<br/>Presidente Prudente – SP, 2008.<br/>Bibliografia</p> <p>1. Cultura de tecidos. 2. Biotecnologia. 3.<br/><i>Gerbera</i>. I. Título.</p> |
|----------------|--|

**RITA DE CÁSSIA ALVES NUNES**

**CULTURA DE TECIDOS EM *GERBERA***

Dissertação apresentada a Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Agronomia.

Presidente Prudente, 25 de Abril de 2008.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Nelson Barbosa Machado Neto  
Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE  
Presidente Prudente - SP

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Claudia Pacheco Santos  
Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE  
Presidente Prudente - SP

---

Prof. Dr. Marcilio de Almeida  
Universidade de São Paulo – ESALQ/USP  
Piracicaba - SP

À minha família, tão importante em todos os momentos da minha vida. Minha querida mãe Santina Bernava, a Tina e meus irmãos Ricardo e Renato.

*Ofereço*

Ao soberano *DEUS* pela vida.

*Dedico*

“... se vi mais longe, foi por estar sobre ombros de gigantes”

Sir Isaac Newton (1643-1727)

## AGRADECIMENTOS

*Minha gratidão e admiração ao professor Dr. Nelson Barbosa Machado Neto, pela orientação e amizade durante todo o período de elaboração e de execução deste trabalho;*

*Aos professores do programa de pós-graduação em Agronomia pelos ensinamentos e pela oportunidade de realização do curso;*

*Aos funcionários dos laboratórios do bloco Q (3º piso) da Unoeste – Eliséia de Paulo, Vânia, Cirlene, Edna, Luciana e em especial a Márcia Guaberto, pela amizade e serviços prestados;*

*À Universidade do Oeste Paulista – Unoeste, pela oportunidade de aperfeiçoamento;*

*Ao professor Dr. Osimar de Carvalho Sanches e a técnica Cleo Trevisan do laboratório de patologia, pelo ensinamento das técnicas histológicas;*

*Aos meus amigos Miléia Ricci Pícolo, Leila Pavanelli, Daniel Santa Cruz Damineli, Maria Teresa Portes (Maitê), Brigiane Longui, Diego Minuando, Renato Tadeu Guerreiro e Agnaldo Masao Sato (Satinho) pela troca de experiências e amizade durante esta jornada;*

*A Professora Ms. Daniela Ramos Rodrigues, amiga querida de todas as horas, pelo apoio fundamental no percurso deste desafio;*

*A todos aqueles que contribuíram de alguma forma e em qualquer etapa, para a realização deste trabalho.*

## RESUMO GERAL

### Cultura de tecidos em *Gerbera*

As *Gerberas* são oriundas da África do Sul, pertencem à família *Asteraceae* e são herbáceas dotadas de flores em capítulos. São muito populares e utilizadas como planta decorativa de exterior, flores de corte e como organismo de experimentos. O estado de São Paulo lidera o mercado de flores ornamentais no Brasil. Dentre as várias espécies produzidas pelas empresas brasileiras, a *Gerbera* está inclusa com boa aceitação no mercado. No início do século XX a micropropagação chama a atenção de estudiosos, o pioneiro nesta área foi Haberlandt em 1902 com células de tecidos somáticos. No Brasil os estudos sobre cultura de tecidos começam na década de 50 em São Paulo no Instituto Biológico. O controle químico da diferenciação da parte aérea foi observado em cultura de calo de tabaco. Esta foi a constatação de que o processo de organogênese *in vitro* é controlado por substâncias hormonais sendo que o desenvolvimento de parte aérea, raiz ou calo é determinado pelo balanço entre auxinas e citocininas. Existem substâncias que, quando presentes em pequenas quantidades, retardam ou inibem a oxidação de substratos e podem agir em diferentes níveis da seqüência oxidativa, estas substâncias são denominadas antioxidantes. Os organismos vivos possuem mecanismos naturais de eliminação de radicais livres por intermédio de enzimas ou não, impedindo sua transformação em produtos mais tóxicos para as células. A enzima denominada superóxido dismutase, junto com outras são as principais defesas antioxidantes que atuam nos organismos superiores.

Palavras chave: Cultura de tecido; Biotecnologia; *Gerbera*

## ABSTRACT GERAL

### ***Gerbera* Tissue culture**

*Gerbera*, from South Africa, belongs to *Asteraceae* family. They are herbaceous with flowers grouped in a head inflorescence. They are very popular and used as decorative garden plant, cut flowers and as experimental organism. São Paulo state leads the market of Brazilian ornamental flowers. Among the species produced by Brazilian companies, *Gerbera* is one of the very well accepted into the market. In the beginning XX<sup>th</sup> century micro propagation calls the attention of scientists; the pioneer was Haberlandt in 1902 with somatic cells. The studies on tissue culture, in Brazil, started at the 50's in São Paulo Biological Institute. The chemical control of the differentiation of the aerial part was observed in culture of tobacco callus. This was the observation that the *in vitro* organogenesis process is controlled by hormonal substances that control the development in canopy, root or callus depending on the balance between auxins and cytokines. Some substances, even when in small amounts, delay or inhibit the substratum oxidation and can act at different levels on the oxidative sequence, these substances are called antioxidants. The living organisms possess natural scavenging mechanisms, enzymatically or not, of free radicals, not allowing their transformation in more toxic products for the cells. The enzyme superoxide dismutase, together with others is the main antioxidant defences that act in eukaryotic organisms.

Key words: Tissue culture; Biotechnology; *Gerbera*

## LISTA DE ABREVIÇÕES

|                               |  |
|-------------------------------|--|
| ANA                           | ácido naftaleno acético                          |
| NOA                           | ácido $\beta$ naphthoxy-acético                  |
| $O^{2-}$                      | ânion ou radical superóxido                      |
| atm                           | atmosfera  |
| BAP                           | benzilaminopurina                                |
| EDTA                          | etilenodiamino tetraacetato                      |
| g                             | grama  |
| g/L                           | grama por litro                                  |
| °C                            | grau Celsius                                     |
| $HO^{\bullet}$                | hidroxila  |
| $\mu$ L                       | microlitro                                       |
| $\mu$ M                       | micromolar                                       |
| mg/L                          | miligrama por litro                              |
| mM                            | milimolar  |
| M                             | molar  |
| MS                            | Murashige e Skoog                                |
| $\eta$ m                      | nanômetro  |
| NBT                           | nitro blue tetrazólium                           |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | peróxido de Hidrogênio                           |
| pH                            | potencial de Hidrogênio                          |
| Mn SOD                        | superóxido dimutase dependente de manganês       |
| SOD                           | superóxido dismutase                             |
| CuZn SOD                      | superóxido dismutase dependente de cobre e zinco |

## SUMÁRIO

|   |    |
|---|----|
| 1 INTRODUÇÃO GERAL.....   | 11 |
| 1.1 Histórico.....  | 11 |
| 1.2 Produção e Comercialização de Flores.....   | 13 |
| 1.3 Cultura de Tecidos.....   | 14 |
| 1.4 Reguladores do Crescimento Vegetal.....   | 17 |
| 1.5 Embriogênese Somática.....  | 18 |
| 1.5.1 Embriogênese direta.....  | 19 |
| 1.5.2 Embriogênese indireta.....  | 19 |
| 1.6 Antioxidantes.....  | 19 |
| 1.6.1 Superóxido dismutase.....   | 20 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....   | 22 |
| <br>  |    |
| 2 ARTIGO I: CALOGÊNESE EM EXPLANTES FOLIARES DE GÉRBERA<br>DE VASO (( <i>Gerbera Jamesonii</i> )).....  | 25 |
| RESUMO.....   | 25 |
| ABSTRACT.....   | 25 |
| 2.1 Introdução.....   | 26 |
| 2.2 Material e Métodos.....   | 31 |
| 2.3 Resultados e Discussão.....   | 32 |
| 2.4 Conclusão.....  | 38 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....   | 40 |
| <br>  |    |
| 3 ARTIGO II: AVALIAÇÃO DO ÁCIDO $\beta$ NAPHYTOX-ACÉTICO NA<br>FORMAÇÃO DE CALOS EM SEGMENTOS FOLIARES DE <i>GERBERA</i><br>( <i>Gérbera Jamesoni</i> )i..... | 45 |
| RESUMO.....   | 45 |
| ABSTRACT.....   | 45 |
| 3.1 Introdução.....   | 46 |
| 3.2 Material e Métodos.....   | 48 |
| 3.3 Resultados e Discussão.....   | 49 |
| 3.4 Conclusão.....  | 55 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....   | 56 |

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

### 1.1 Histórico

A *Gerbera* ocorre naturalmente na América do Sul, África, Madagascar e na Ásia tropical. A primeira descrição botânica foi publicada por Joseph Dalton Hooker no *Curtis Botanical Magazine* de 1889, descrevendo a *Gerbera jamesonii*, uma espécie sul-africana hoje conhecida por margarida-do-Transvaal.

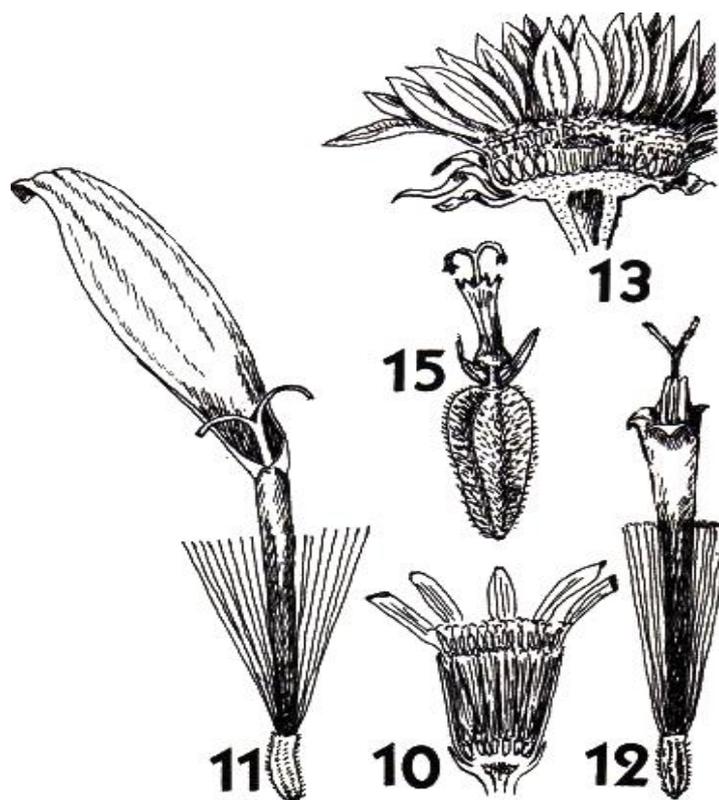
Em 1737 o naturalista holandês Jan Frederic Gronovius atribuiu o nome *Gerbera* ao gênero, em homenagem a Traugott Gerber, um médico e naturalista alemão que trabalhou na Rússia. O nome vulgar *Gerbera*, é aplicado indistintamente às espécies do gênero e às suas flores (figura 1), as quais são em geral comercializadas sob aquela designação, muitas vezes seguidas de uma indicação específica ou varietal como, por exemplo, *gerbera-do-Transvaal*, ou *gerbera-púrpura*.



**FIGURA 1** - *Gerbera jamesonii*

O gênero *Gerbera* inclui cerca de 30 espécies de plantas herbáceas semiperenes da família das *Asteraceae*, dotadas de folhas basais, e flores reunidas em capítulos solitários e multifloros com aproximadamente de 10 cm de diâmetro, intensamente coloridos.

As espécies de *Gerbera* apresentam um grande capítulo, com floretas bi-labíadas de cores variadas. O capítulo, que aparenta ser uma única flor, é na realidade composto por centenas de flores individuais, cuja morfologia varia de acordo com a sua posição no conjunto (figura 2)



**FIGURA 2** – *Compositae*: 10-capítulo cortado longitudinalmente (*Senecio*); 11-flor lingulada do raio; 12-flor tubular do disco; 13-capítulo cortado longitudinalmente (*Helianthus*); 15-flor tubular do disco

Fonte: BRANDÃO, A. (1983)

As espécies deste gênero são também utilizadas como organismos experimentais em estudos de floração e de desenvolvimento meristemático da flor. As *Gerberas* contêm derivados naturais da cumarina com interesse fitoquímico e de controle biológico.

São muito populares e muito utilizadas como plantas decorativas de exterior e para a produção de flores de corte. Os cultivares mais comuns, são os resultantes da hibridização entre a *Gerbera jamesonii* e a *Gerbera viridifolia*, outra

espécie sul-africana. O híbrido é conhecido por *Gerbera hybrida* e dele existem alguns milhares de cultivares com grande variabilidade nas características florais, com diferentes tamanhos e formas da flor e com cores que vão do branco ao amarelo, laranja, vermelho, rosa e púrpura. Existe cultivares que produzem flores com o centro negro e com pétalas variegadas.

## 1.2 Produção e Comercialização de Flores

A produção de flores e plantas ornamentais no Brasil está concentrada no Estado de São Paulo. De acordo com Florabrazilis\* (2002), o faturamento mensal do varejo foi na ordem de R\$ 13,8 milhões, valor obtido a partir de levantamento realizado em 12 estados brasileiros, em 53 de suas principais cidades, entre abril e outubro de 2002. Neste ramo, nota-se um desempenho e um papel relevante em termos de volume comercializado, e São Paulo destaca-se em relação aos demais estados com R\$ 5,8 milhões de vendas mensalmente, correspondendo a 42,50% do valor total adquirido pelo varejo no Brasil. A exportação de flores e plantas foi de US\$ 13 milhões em 1999, US\$ 11,9 milhões em 2000 e US\$ 13,3 milhões em 2001 (BRASIL, 2004).

Algumas empresas produzem no Brasil, cerca de 40 mil mudas por mês para venda aos floricultores. São várias orquídeas – dos gêneros *Phalaenopsis*, *Dendrobium*, *Oncidium*, a chuva de ouro, e *Paphiopedilum*, mais conhecida como sapatinho, *Catleya* e *Laelia*, além de incontáveis híbridos. A produção abrange outras plantas de boa aceitação comercial como *Gerbera* (*Gerbera*), *Kalanchoe*, samambaias (*Dicksonia* e *Polypodium*) e filodendros (*Philodendron*).

Segundo Fáril e Melo (1996), a micropropagação de espécies de importância agrícola tem grande aplicabilidade no processo de produção industrial. A clonagem *in vitro* é um procedimento significativo, na multiplicação de espécies ornamentais, frutíferas e essências florestais, tanto em países desenvolvidos quanto

---

\* Programa Brasileiro de Exportação de Flores e Plantas Ornamentais – *Florabrazilis*.

em desenvolvimento. Atualmente, milhares de pequenas, médias e grandes empresas produzem de 10.000 a mais de 1.000.000 e espécimes de plantas *in vitro* por ano.

Os problemas principais neste tipo de empreendimento são: (1) o investimento na produção é relativamente alto, e; (2) o valor biológico das mudas micropropagadas é em certas condições instável (AITKEN-CHRISTIE, 1992).

Conforme Blanco (2001), a propagação da *Gerbera* é realizada por meio de sementes ou divisão de touceiras. Como há grande amplitude de cores, com mais de 20 tonalidades, e florescem praticamente o ano todo, são muito requisitadas para arranjos florais. De acordo com informações do setor de comércio de flores, em 2002, havia 68 variedades distintas de *Gerberas* sendo cultivadas no Brasil.

No verão as flores têm maior produtividade, implicando menor tempo de produção. No inverno a sua formação é melhor, porém seu ciclo é mais longo. No entanto, Kessler Junior (1999), cita que o período de produção pode variar de quatorze a dezoito semanas, a partir do plantio das sementes.

### **1.3 Cultura de Tecidos**

Desde o início do século XX que a propagação de plantas *in vitro* tem chamado à atenção de estudiosos. Segundo Krikorian e Berquam (1969) o pioneiro no cultivo de células de tecidos somáticos foi Haberlandt, que em 1902 cultivou várias espécies de plantas em solução nutritiva. Seus trabalhos tiveram base na totipotencialidade das células, teoria proposta por Schleiden, em 1838, e Schwann, 1839 (GAUTHERET, 1983). Não houve sucesso em seus ensaios, pois não ocorreu divisão celular, possivelmente por falta de reguladores vegetais no meio nutritivo. Até então estes compostos não eram conhecidos bem como a utilização de espécies inadequadas e a baixa densidade de inoculo e explante de tecidos maduros.

Torres *et al.* (1998) citam em seu trabalho que Hannig em 1904 cultivou pela primeira vez *in vitro*, embriões imaturos de crucíferas. Em suas observações viu a necessidade de suplementar o meio mineral com sacarose para germinação dos embriões, e demonstrou também o efeito de diferentes fontes de nitrogênio sobre a

morfologia. A partir destes eventos, as pesquisas nesta área têm contribuído muito para o entendimento dos processos fisiológicos relacionados com a germinação.

Embriões de orquídeas cultivadas *in vitro* na ausência de micorrizas foram obtidos por Knudson em 1922, e destacaram a importância da sacarose para o crescimento e desenvolvimento destes embriões e ainda Dieterich no ano de 1924, observou que embriões cultivados não apresentavam dormência. O primeiro a destacar a prática da cultura de embriões no melhoramento genético foi Laibach em 1925, recuperando plantas híbridas de cruzamentos incompatíveis (TORRES et al., 1998).

Morel e Martin (1952) conseguiram recuperar plantas de dália livres do vírus do mosaico a partir da cultura de ápices caulinares, deste então, a cultura de tecidos teve início marcante em suas aplicações práticas. Utilizando-se desta mesma metodologia posteriormente estes pesquisadores obtiveram plantas de orquídeas isentas de vírus. A formação de embriões somáticos foi observada pela primeira vez por Steward et al. (1958) e Reinert (1959) em calos de cenoura. Esta técnica tem grande importância para a propagação de plantas em grande escala, lançando mão de um pequeno espaço para instalação do laboratório.

Murashigue e Skoog (1962), obtiveram crescimento de 4 a 5 vezes maior em cultura de calo quando adicionado extrato de folhas de fumo ao meio. Esse foi o ponto inicial para a elaboração do meio MS, o mais utilizado atualmente em trabalhos de cultura de tecidos.

No Brasil, os trabalhos realizados sobre cultura de tecidos, foram feitos pioneiramente no Instituto Biológico de São Paulo na década de 50. Atualmente, existem dezenas de laboratórios utilizando metodologias diversificadas de manipulação de plantas *in vitro*, desenvolvendo trabalhos no campo da engenharia genética de plantas e obtendo cultivares de plantas transgênicas, como exemplo, cultivares de plantas de batata resistentes ao vírus PVY (TORRES et al., 1998).

A idéia da clonagem vegetal, cultivando-se células isoladas de planta estudada por Haberlandt, remetia para a questão de como fazer uma célula especializada, que estava programada para desempenhar determinadas funções dentro do organismo, voltar a ter características embrionárias e a capacidade de produzir um novo ser. Mesmo estando à ciência em pleno século XXI, a cultura de tecidos vegetais a partir da desdiferenciação celular, torna-se um desafio para

muitos pesquisadores que buscam nesta linha de pesquisa chegar a descobertas importantes.

Pode-se estabelecer um sistema de cultura de células somáticas, através de uma ordem: a) Tecido diferenciado; b) Massa de células indiferenciadas; c) Órgão, tecido, organismo. Conforme Murashige (1974), a cultura de tecidos vegetais abrange três fases básicas:

Fase I) seleção dos exemplares, limpeza e cultura em meio nutritivo sob condições assépticas. Entretanto, Deberg e Read (1991) citam que um “estádio zero” poderia ser acrescentado, como forma de contornar os graves problemas de contaminação relacionados com explantes oriundos de casa de vegetação ou do campo. Todavia, procurar-se-ia cultivar as plantas matrizes em condições controladas garantindo um bom estado fitossanitário, resultando em baixos índices de contaminação quando do cultivo *in vitro*;

Fase II) multiplicação dos propágulos através de sucessivos subcultivos em meio apropriado para a multiplicação;

Fase III) transferência dos brotos produzidos para meio de enraizamento e transplante subsequente das plantas obtidas, para um substrato adequado. A planta passa de uma situação de reduzido fluxo transpiratório, devido à baixa irradiância e a elevada umidade relativa, para um ambiente que demanda um incremento na taxa de transpiração, ficando muito suscetível ao estresse hídrico. Ainda, a planta passa de uma existência heterotrófica, na qual depende do suprimento exógeno de energia (fonte de açúcar no meio) e da alta disponibilidade de nutrientes, para um estado autotrófico, no qual precisa realizar fotossíntese e incrementar rapidamente a absorção de nutrientes para sobreviver (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1990).

Técnicas de cultura de tecidos vegetais, podem se transformar em ferramentas auxiliares eficazes para o melhoramento de plantas. A seguir algumas vantagens:

a) Como a multiplicação massal de um genótipo superior é possível em qualquer estágio de um programa de melhoramento, a micropropagação tem o potencial de promover o aumento de ganhos genéticos em apenas uma geração;

b) A propagação massal pela clonagem de genótipos superiores captura os componentes aditivos e não aditivos da variância genética;

c) Genes desejáveis de clones selecionados podem ser mantidos em um banco genético na forma de pomares clonais, onde podem ser recombinados através de cruzamentos dirigidos;

d) Interações genótipo-ambiente podem ser estudadas com mais critério em populações clonais;

e) A seleção clonal *in vitro* e a micropropagação pode ser utilizada para a produção de genótipos superiores e o tempo necessário para produzir grandes quantidades de plantas é menor no programa clonal do que em um programa baseado nos pomares clonais;

f) Técnica de cultura de tecidos possibilita a produção de um grande número de progenitores geneticamente uniformes para a produção de sementes híbridas.

Desta forma, surgiu o evento da biotecnologia celular de plantas, que utiliza e integra processos tecnológicos e bioquímicos, empregando-se células, tecidos e órgãos de plantas superiores, visando à geração de produtos e serviços.

#### 1.4 Reguladores do Crescimento Vegetal

O controle químico da diferenciação da parte aérea foi primeiramente observado em cultura de calo de tabaco. Foi observada inibição na formação de gemas por auxinas, e reversão deste efeito estimulando brotações utilizando-se adenina bem como o fosfato inorgânico. Esta foi a constatação de que o processo de organogênese *in vitro* é controlado por substâncias hormonais sendo que o desenvolvimento de parte aérea, raiz ou calo é determinado pelo balanço entre auxinas e citocininas

O balanço de auxinas e citocininas em alto/baixo favorece o enraizamento e o balanço inverso promove a formação de parte aérea. Concentrações 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  $\beta$  naphthoxy-acético) e 2,4-D (ácido diclorofenoxiacético). As auxinas 2,4-D e ANA são sintéticas e têm efeitos semelhantes às auxinas de ocorrências naturais, sendo mais estáveis à degradação (AMMIRATO, 1983).

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 (RODRIGUES; LEITE, 2004).

Muitos compostos químicos com atividade de citocinina têm sido sintetizados e testados. A maioria dos compostos com atividade de citocinina possui uma substituição do N<sup>6</sup> 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) (SANTIAGO et al., 2001).

### **1.5 Embriogênese Somática**

O processo de indução de embriões somáticos a partir de tecidos vegetais ou, mais usualmente, de calos derivados de explantes, em geral embrionários; foi descrito pela primeira vez por Levine, em 1947, em culturas de calos de cenoura. A formação de embriões somáticos se dá a partir de tecidos somáticos, com constituição idêntica à da planta-mãe, a não ser nos casos em que ocorre a embriogênese por via indireta, ou seja, passando pela formação de calos. Para que ocorra embriogênese somática, as células diferenciadas devem ser primeiro desdiferenciadas para serem consideradas como células embriogênicas após a divisão celular (PASQUAL et al., 1997).

Esta técnica se fundamenta na totipotencialidade das células vegetais, por meio da regeneração *in vitro*, via organogênica ou embriogênica somática.

### **1.5.1 Embriogênese direta**

De acordo com Bajaj (1992), os embriões somáticos são originados diretamente do explante. A ocorrência de embriogênese direta tem sido registrada em tecidos gametofíticos, esporofíticos e em tecidos que se originaram em função da fertilização dos gametas. Este fenômeno ocorre com maior probabilidade em micrósporos dentro da antera e tecidos de partes do ovário, incluindo as paredes do ovário ou carpelos, óvulo, embrião zigótico ou plântulas jovens.

### **5.1.2 Embriogênese indireta**

A embriogênese indireta requer que as células diferenciadas de um explante sejam induzidas a formar calos não-diferenciados. Reinert (1959) cita que na embriogênese somática indireta as células se apresentam em diferentes estágios de diferenciação, com vários graus de determinação, e esta por sua vez podem adquirir novas competências, mediadas por mensageiros químicos específicos.

Bajaj (1992) cita em seu trabalho que gemas axilares ou adventícias podem induzir a formação de condutos procambiais no tecido maternal, esses condutos na planta intacta estabelecem uma conexão entre broto novo e o sistema vascular da planta-mãe, de modo contrário dos meristemas, que originam brotos e raízes separadamente, esses embriões quase sempre se originam superficialmente sobre calos e se desprendem com facilidade.

## **1.6 Antioxidantes**

São quaisquer substâncias que, quando presentes em pequenas concentrações, comparadas com aqueles substratos oxidáveis, significativamente retardam ou inibem a oxidação deste substrato e podem agir em diferentes níveis da seqüência oxidativa.

O organismo possui sistemas naturais de eliminação de radical livre por intermédio de enzimas ou não, impedindo sua transformação em produtos mais tóxicos para as células. O efeito prejudicial dos radicais livres ocorre quando eles estão em quantidade excessiva no organismo, ultrapassando a capacidade do organismo de neutralizá-los com os seus sistemas naturais. Esses sistemas enzimáticos de defesa são compostos por diversas enzimas, dentre elas o Superóxido-Dismutase os quais combatem no organismo os seguintes radicais livres: Peróxido de Hidrogênio, Superóxido, Oxigênio Single, Íon Hidroxila, Óxido Nítrico e Óxido Nitroso. Os antioxidantes destroem os radicais livres como o radical superóxido e a hidroxila.

A enzima denominada superóxido dismutase, juntamente com a catalase e glutathione peroxidase são as principais defesas antioxidantes que atuam nos organismos superiores (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1989).

Conforme Halliwell e Gutteridge (1989), a superóxido dismutase (SOD) tem papel fundamental na defesa do organismo contra as espécies reativas de oxigênio, pois atua na remoção do radical superóxido. Antes da sua descoberta, a SOD já havia sido descrita por alguns autores como uma proteína que contém cobre, mas nenhuma atividade catalítica lhe havia sido atribuída.

Após o trabalho de McCord (1969), entretanto, com a determinação de sua função na dismutação do radical superóxido seu papel foi estabelecido, e até hoje, apesar de inúmeras pesquisas realizadas com esta enzima, nenhum outro substrato foi descrito, mostrando a sua especificidade para o superóxido (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1989).

### **1.6.1 Superóxido dismutase**

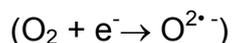
As moléculas de oxigênio diatômico na atmosfera terrestre são as maiores promotoras de reações nas células vivas.

Segundo Halliwell e Gutteridge (1989), 95 a 98% do oxigênio absorvido pelos organismos aeróbicos são reduzidos, formando-se água na cadeia respiratória através do transporte de elétrons na mitocôndria e retículo endoplasmático, onde o sistema enzimático citocromo, no processo de fosforilação oxidativa, procede à

redução tetravalente do  $O_2$  pelo sistema citocromo-oxidase, fornecendo simultaneamente quatro elétrons para o oxigênio.



Entretanto, de 2 a 5% do  $O_2$  é reduzido univalentemente, processo em que uma molécula recebe apenas um elétron, o qual vai ocupar um dos orbitais externos, ao mesmo tempo em que o outro continua não pareado, produzindo intermediários altamente reativos, denominados espécies reativas de oxigênio, que algumas vezes constituem os radicais livres. Forma-se então a primeira espécie tóxica reativa de oxigênio, o superóxido.



A formação das espécies reativas de oxigênio se dá primeiramente pelo o radical superóxido ( $O^{2\cdot-}$ ), que pode ser dismutado em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) ou mesmo através de ação catalítica, pela atuação da enzima superóxido dismutase (SOD). No organismo existem duas SODs principais, uma citoplasmática, que é a CuZnSOD e outra, mitocondrial, que é a MnSOD, esta contendo Manganês e aquela contendo Cobre-Zinco na mesma molécula. A importância da SOD pode ser demonstrada pelo fato de ser a enzima mais abundante do organismo, ao mesmo tempo em que também é a quinta proteína mais abundante neste mesmo organismo (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1989).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AITKEN-CHRISTIE, J. et al. Effect nutrient media composition on sugar-free growth and chlorophyll fluorescence of *Pinus radiata* shoots in vitro. **Acta Hort.**, v. 319, p. 125-130, 1992.

AMMIRATO, P. G. V. Embryogenesis. In: EVANS, D. A. et al. **Handbook of plant cell culture**. , v.1. New York: MacMilam Publischer Company, 1993. 123p

BAJAJ, Y. P. S. **Biotechnology in agriculture and forestry 19**: High-tech and Micropropagation Plant III. Berlin: Springer-Verlag, 1992.

BLANCO, R. A. **Jardim das flores: Gerbera**, 12 set. 2001. Disponível em: <<http://www.jardimdasflores.com.br/floresefolhas/A08gerbera.htm>>. Acesso em: 28 ago 2006.

BRASIL. Secretaria de Comércio Exterior (SECEX). **Exportação e importação brasileira de plantas vivas e produtos de floricultura**: 1989-2003. Brasília, 2004. Disponível em: <[http://aliceweb.%20mdic.gov.br/consulta\\_nova/resultadoConsulta.asp](http://aliceweb.%20mdic.gov.br/consulta_nova/resultadoConsulta.asp)>. Acesso em: 16 mar 2006.

DEBERGH, P. C.; READ, P. E. Micropropagation. In: DEBERGH, P. C.; ZIMMERMAN, R. H. (eds.). **Micropropagation**: Technology and Application. London: Kluwer Acad. Publishers, 1991.

FARIL, M.; MELO, N. F. Automação e Racionalização na Micropropagação Industrial, **Abctp Notícias**, n. 26, 1996.

FLORABRASILIS. **Relatório do diagnóstico da produção de flores e plantas ornamentais brasileiras**. Campinas: IBRAFLOR, 2002. (CD-ROOM).

GAUTHERET, R. J. Plant tissue culture: a history. **Botanical Magazine**, v. 99, p. 393-410, 1983.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. (eds.). **Técnicas e Aplicações da Cultura de Tecidos de Plantas**, Brasília: ABCTP/EMBRAPA-CNPH, 1990.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in Biology and Medicine**. Oxford: Clarendon Press, 1989. 543 p.

KESSLER JUNIOR, J. R. **Greenhouse production of gerbera daisies**. Alabama cooperative extension system: ANR-1144. Auburn: Auburn University, Feb. 1999. 6 p. Disponível em: <<http://www.aces.edu/pubs/docs/A/ANR-1144.ANR-1144.pdf>>. Acesso em: 01 Jul 2006.

KRIKORIAN, A. D.; BERQUAM, D. L. Plant cell and tissue culture: the role of Haberlandt. **Botanical Review**, v. 35, p. 59-88, 1969.

McCORDE, J. M.; FRIDOVICK. Superoxide dismutases: na enzymatic function for erythrocyte (hemocuprein). **Journal of Biology Chemistry**, v. 244, p. 6049-6055, 1969.

MOREL, G .M.; MARTIN, C. Guérison de dahlias atteints d'une maladie à virus. **Comptes Rendus Hebdomadaires dès Séances de l'Academie dès Sciences**, v. 235, p. 1324-1325, 1952.

MURASHIGE, T. Plant propagation through tissue culture. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 25, p. 135-166, 1974.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised médium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.

PASQUAL, M. et al. **Cultura de tecidos: tecnologia e aplicações: aplicações no melhoramento genético de plantas**. Ciência e Agrotecnologia Lavras: [s.n.], 1997.

REINERT, J. Über die Kontrolle der Morphogenese und die Induktion von Adventive-embryonen na Gewebkulturen aus Karotten. **Planta**, v. 53, p. 318-333, 1959.

SANTIAGO, E. J. A. et al. Meios de cultura: Cultura de tecidos. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras - M.G, v. 3, p. 22-35, 2001.

STEWART, F. C.; MAPES, M. O.; MEARS, K. Growth and organized development of culture cells. II. Organization in culture grown from freely suspended cells. **American Journal of Botany**, v. 45, p. 705-708, 1958.

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. FERREIRA, A. T. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas.** v.2. Brasília: ABCTP/EMBRAPA-CNPH, 1998. p. 11-20.

RODRIGUES, T. J. D.; LEITE, I. C. **Fisiologia Vegetal** – hormônios das plantas. Jaboticabal, Funep, 2004. 78 p.

## 2 ARTIGO I: CALOGÊNESE EM EXPLANTES FOLIARES DE GÉRBERA DE VASO (*Gerbera Jamensoni*)

### RESUMO

As flores do gênero *Gerbera* apresentam boa durabilidade e uma grande variedade de cores podendo satisfazer os mercados mais exigentes. Na área de plantas ornamentais a propagação *in vitro* de matrizes selecionadas tem oferecido uma padronização para época de floração, coloração e tamanho das flores e, a embriogênese somática pode ser uma opção para a multiplicação destas plantas. O objetivo deste estudo foi avaliar as melhores concentrações de reguladores de crescimento na obtenção de calos friáveis, utilizando-se a enzima SOD como marcador bioquímico na seleção dos calos. Folhas completamente expandidas de plantas comerciais foram desinfetadas, seccionadas em fragmentos de aproximadamente 1cm<sup>2</sup> e inoculadas em meio de cultura MS em combinação fatorial 5x5 de reguladores de crescimento: benzilaminopurina (0,0; 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 mg.L<sup>-1</sup>) e ácido naftalenoacético (0,0; 0,25; 0,50; 1,0 e 2,0 mg.L<sup>-1</sup>). Os calos foram avaliados em dois períodos, observando-se o crescimento, coloração e friabilidade. A melhor combinação de regulador de crescimento para obtenção de calos friáveis é 0,5/0,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP/ANA respectivamente. Houve correlação da atividade de superóxido dismutase com as variáveis morfológicas dos calos.

Palavras-chave: cultura de tecidos, embriogênese somática, planta ornamental, fitorreguladores.

### ABSTRACT

*Gerbera* exhibited good flower durability and a wide range of colours that can satisfy the most serious markets. In the area of ornamental plants the *in vitro* propagation of selected plants offered a chance of standardization in some characteristics as flowering synchronization, coloration and size of flowers. So,

somatic embryogenesis can be an option for multiplication of these plants. The objective of this study was to evaluate the best concentrations of plant growth regulators for growing of friable calluses, using SOD enzyme as biochemical marker in the calluses selection. Fully expanded leaves of commercial plants were submitted to the disinfection, cut in fragments (1cm<sup>2</sup>) and inoculated in MS media in a factorial plant growth regulators combination (5x5): benzilaminopurine (0; 0.5; 1.0; 2.0 and 4.0 mg.L<sup>-1</sup>) and naphthaleneacetic acid (0; 0.25; 0.50; 1.0 and 2.0 mg.L<sup>-1</sup>). The obtained calluses were evaluated in two periods for growth, coloration and friability. The best combination of plant growth regulators for friable calluses was 0,5/0,5 mg L<sup>-1</sup>de BAP/ANA respectively. There was correlation of superoxide dismutase activity with the morphologic variables of the calluses.

Key words: tissue culture, somatic embryogenesis, ornamental plant, plant growth regulators.

## 2.1 Introdução

A gérbera (*Gerbera jamesonii*) é uma Asteraceae semiperene, nativa da África do Sul e Ásia e que, nos últimos anos, teve um crescente interesse pelos tipos de corte, pois suas flores apresentam boa durabilidade e uma variação de cores que satisfaz os mercados mais exigentes.

Existem dois métodos para a propagação da gérbera: sexual e vegetativo. Por ser uma planta de polinização cruzada, a propagação via semente não é muito interessante comercialmente, pelo fato de haver segregação na progênie o que torna a produção desta pouco interessante dada à variação produzida. O outro método é a propagação vegetativa, a qual possui a desvantagem de acumular patogenias durante as gerações. A propagação por divisão de touceiras ou por corte de rizomas é ineficiente, produzindo em média cinco mudas por divisão de touceira e quarenta mudas por corte de rizoma ao ano (CHU; HUANG, 1983).

Particularmente na área de plantas ornamentais, onde predominam plantas híbridas (gérbera, cravo, tulipa, orquídeas e outras), a clonagem *in vitro* de

matrizes selecionadas tem permitido a uniformização de características, época de floração, coloração, diâmetro e formas das flores, dentre outras.

Na França, dentre as plantas ornamentais produzidas por cultura de tecidos, a violeta e a gérbera representam mais de 70% do volume de produção (BOUZIGUES, 1987). A propagação vegetativa *in vitro* de determinada espécie pode ser conduzida através da multiplicação de brotação por sucessivas subculturas, ou seja, partes vegetativas da planta são estimuladas a crescerem formando tufo de brotos, os quais são subdivididos dando origem a novos explantes que, por sua vez, repetem o mesmo processo.

A micropropagação é uma das principais aplicações da cultura de tecidos, especialmente para plantas de difícil propagação pelos métodos convencionais, como é o caso da *Gerbera*. O emprego de cultura de tecidos têm sido crescente para esta, tornando-se uma alternativa bastante viável para sua propagação. As primeiras tentativas neste sentido foram feitas por Pierik e Segers (1973) na Holanda, que empregaram a indução em gemas adventícias.

Dois métodos promissores para a propagação *in vitro* desta espécie ornamental são citados: 1) a formação de brotações a partir de capítulos excisados (LALIBERTÉ et al., 1985) e 2) a propagação clonal através de ápices de brotos (MURASHIGE et al., 1974).

A vantagem do método no qual se utilizam capítulos excisados está no emprego do tratamento fitossanitário, a qual é mais eficiente e menos prejudicial ao explante, quando comparado ao método que utiliza ápices de brotos. Outra vantagem a ser citada é que o primeiro método não destrói a planta para a obtenção dos explantes, visto que apenas as inflorescências são retiradas da planta mãe. Em contra partida, o segundo método é mais indicado para uma propagação massal mais rápida, não obstante as vantagens citadas anteriormente.

De acordo com Arello et al. (1991) as brotações obtidas, pelo método dos capítulos, podem facilmente ser utilizadas como material estéril inicial para outras subculturas e experimentos onde se desejam brotações axilares. Ambos os métodos empregam concentrações adequadas de citocininas e auxinas buscando um melhor balanço de reguladores vegetais, anteriormente estudado por Skoog e Miller (1957).

A organogênese é controlada pela concentração e pelo balanço citocinina/auxina existentes em meio de cultura. Handro e Floh (1990) relatam que

as citocininas são muito ativas na indução e regeneração de parte aérea das plântulas inibindo a formação de raízes, por outro lado, formação de raízes e a inibição do crescimento de parte aérea estimulando a formação de gemas axilares, o que leva a formação de calos, são comandadas pelas auxinas. O tipo e a concentração dos reguladores vegetais influenciam na multiplicação *in vitro*, onde normalmente a melhor faixa está entre 0,5 e 5,0 mg.L<sup>-1</sup> para ambos.

O cultivo de calos tem sido utilizado para estudos sobre o desenvolvimento celular, obtenção de suspensão celular e embriões somáticos (LANDA et al., 2000), sendo considerado uma forma potencial indireta de propagação em massa.

Guerra et al. (1999) e Jiménez (2001) citam que a embriogênese somática pode ser descrita como o processo pelo qual células somáticas desenvolvem estruturas semelhantes a embriões zigóticos, por meio de uma seqüência ordenada de estádios embriogênicos característicos, sem ocorrência de fusão dos gametas, como a estrutura bipolar sem nenhuma conexão vascular com o tecido materno (DURZAN, 1988; VICIENT; MARTINEZ, 1998).

Dentre os processos de propagação clonal, segundo Barros (1999), a embriogênese somática é, teoricamente, a melhor opção para a propagação *in vitro* por apresentar algumas vantagens, por exemplo: a alta taxa de multiplicação comparada a qualquer outro processo de propagação; o escalonamento da produção pela manutenção da cultura em meio líquido; o plantio direto da muda obtida via embriogênese somática sem necessidade de enxertia, com menor custo de produção, além de a planta ser geneticamente igual à planta mãe, o que não acontece com plantas obtidas por métodos de propagação vegetativa convencionais.

Hirokazu et al. (1998) realizaram estudos pioneiros obtendo embriogênese somática a partir de tecidos de caqui, trabalhando com segmentos foliares provenientes de plantas obtidas de ápices meristemáticos cultivados *in vitro*, em meio MS  $\frac{1}{2}$ NO<sub>3</sub> suplementado com BAP e ANA, em diferentes concentrações.

Um dos aspectos mais sérios relacionados com a cultura de tecidos de algumas espécies de plantas é a oxidação do explante. Preece e Compton (1991) caracterizaram as substâncias encontradas em meio de cultura e as identificaram como sendo fenóis, flavonóides e taninos, e responsáveis pela oxidação.

A oxidação nos sistemas biológicos ocorre devido à ação dos radicais livres no organismo. Estas moléculas têm um elétron desempareado, livre para se ligar a qualquer outro elétron e por isso, são extremamente reativas (SOARES, 2002).

Radicais livres são formados sob condições de estresse oxidativo bem como pelas reações normais da cadeia de transporte de elétrons, mas que são altamente reguladas (CHAOUÏ et al., 1997; MAZHOUDI et al., 1997; GREGGAINS et al., 2000), todavia esta regulação pode ser perdida se o estresse for mais severo aumentando consideravelmente a produção de radicais livres que podem levar a uma cascata de eventos que, começando com a peroxidação de lipídeos, avançam para degradação de membranas e para morte celular (GREGGAINS et al., 2000). De acordo com Foyer et al. (1997) o aumento nos oxidantes celulares pode levar a super expressão de genes de enzimas de desintoxicação como as superóxido dismutases (SOD) (GIANNOPOLITIS; RIES, 1977), catalase (CAT), peroxidase (PRX) e enzimas do ciclo ascorbato-glutationa (SUNG; JENG, 1994; BAILLY et al., 1998) como parte de uma estratégia requerida para superar o estresse oxidativo (FOYER et al., 1997).

Uma destas moléculas é o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) que possui diversas funções dentro da célula, desde a produção de radicais livres até lignificação e produção de compostos fenólicos, bem como atuando como gatilho para as respostas SAR (HAMMERSCHMIDT; KUC, 1982; SIEGEL, 1993; HAMMERSCHMIDT; KUC, 1995; BENHAMOU; NICOLE, 1999; JUNG et al., 2000; McCUE et al., 2000) onde o ácido salicílico pode ser responsável por disparar a resposta SAR inibindo peroxidases específicas.

Uma ampla gama de compostos, incluindo oligossacarídeos, glicoproteínas e peptídeos, pode mediar a indução das reações de defesa nas plantas (JUNG et al., 2000, KÚC, 2000; BENHAMOU; NICOLE, 1999). De forma análoga, a resistência ao frio ou aos choques de calor pode ser aumentada por elevação na concentração de compostos fenólicos (RIVERO et al., 2001) ou por alguns aminoácidos envolvidos na síntese de fenólicos (MACHADO NETO et al., 2004).

Certas enzimas associadas ao estresse causado por excesso de oxidantes são importantes no mecanismo de defesa de plantas. A superóxido-dismutase (SOD) ajuda a eliminar os radicais livres. Como o peróxido de hidrogênio

é altamente tóxico para as células, os organismos aeróbios criaram meios de proteção contra seus efeitos utilizando enzimas para removê-los, tais como a catalase, peroxidase dentre outras.

Os antioxidantes destroem os radicais livres como o radical superóxido e a hidroxila. Em 1969, ficou evidenciado que a enzima superóxido-dismutase, presente em quase todas as células, catalisa a conversão do oxigênio reativo em peróxido de hidrogênio.

Altas atividades de SOD estão relacionadas a uma maior produção de peróxido de hidrogênio que é molécula chave para vários processos metabólicos (SIEGEL, 1993) dentro da célula desde a produção de radicais livres até lignificação e produção de compostos fenólicos, bem como atuando como gatilho para as respostas SAR (HAMMERSCHMIDT; KUC, 1982; SIEGEL, 1993; HAMMERSCHMIDT; KUC, 1995; JUNG et al., 2000; McCUE et al., 2000).

Assim, a SOD é considerada a primeira linha de defesa contra espécies reativas de oxigênio (VOET et al. 2000) e por ser formadora de moléculas de peróxido pode estar relacionada com uma maior produção de fenóis e ligninas nos tecidos vegetais.

De acordo com Foyer et al. (1997) o aumento nos oxidantes celulares, como no caso de estresses, pode levar a super expressão de genes de enzimas de desintoxicação como as superóxido dismutases (SOD) (GIANNOPOLITIS; RIES, 1977), catalase (CAT), peroxidase (PRX) e enzimas do ciclo ascorbato-glutationa (SUNG; JENG, 1994; BAILLY et al, 1998) como parte de uma estratégia requerida para superar o estresse oxidativo (FOYER et al., 1997). Uma ampla gama de compostos, incluindo oligossacarídeos, glicoproteínas e peptídeos, pode mediar a indução das reações de defesa nas plantas (JUNG et al., 2000, KÚC, 2000).

Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar os melhores calos para formação de embriões de somáticos de gérbera de vaso (*Gerbera jamensoni*), com a utilização da SOD como marcador bioquímico na avaliação para seleção dos calos.

## 2.2 Material e Métodos

O experimento foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos da UNOESTE Universidade do Oeste Paulista – Presidente Prudente/SP. O material vegetal utilizado, como matriz, foi obtido de plantas comerciais de vaso, no Ceasa da cidade de Presidente Prudente - SP.

Foram selecionadas folhas jovens completamente expandidas com aparência saudável, sem manchas e pragas. Ao serem retiradas, as folhas foram lavadas em água corrente com detergente neutro, transferidas para câmara de fluxo laminar e submetidas à desinfecção com hipoclorito de sódio comercial (40% v/v) e 100µL de Tween 80 durante 30 minutos. As folhas foram enxaguadas duas vezes em água destilada e cortadas em peças de 1cm<sup>2</sup> em solução estéril de cisteína (500mg L<sup>-1</sup>): ácido ascórbico, na dose de (500mg L<sup>-1</sup>), misturados na hora do uso, para evitar a oxidação dos tecidos.

Os fragmentos foram incubados, em placas de Petri de 10 cm de diâmetro, contendo meio MS sem adição de reguladores de crescimento vegetal para seleção de explantes. Os fragmentos não contaminados ou oxidados foram utilizados para a incubação nos meios de cultura contendo reguladores de crescimento vegetal em diferentes concentrações nos diversos tratamentos.

O meio de cultura utilizado foi MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) modificado, suplementado com 20g L<sup>-1</sup> de sacarose, solidificado com 2,0g L<sup>-1</sup> de Phytigel<sup>®</sup> e pH 5,8. Os frascos, potes 269, contendo 50 mL de meio, foram autoclavados por 20 minutos a 121°C e 1 atm de pressão. Os tratamentos foram delineados como um fatorial 5x5 de benzilaminopurina (BAP; 0,0; 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0mg /L<sup>-1</sup>) e ácido naftalenoacético (ANA; 0,0; 0,25; 0,50; 1,0 e 2,0mg L<sup>-1</sup>) com dez repetições de dois explantes por frasco. Os frascos permaneceram em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas, e temperatura 25± 2°C. Após 30 dias os calos obtidos foram medidos, classificados por cor e aspecto e transferidos para meio de cultura novo por mais 30 dias ao final dos quais refizeram-se as medidas. Os calos receberam notas quanto a coloração (1 - branco, 2 - amarelo, 3 - verde e 4 - marrom) e friabilidade (1 - vítreo, 2 - intermediário e 3 - friável).

Após 60 dias parte dos calos foi fixada em Carnoy acético, emblocada em parafina e submetida a cortes histológicos com aproximadamente 3µm de

espessura, para verificação da indução de embriogênese nos diferentes tipos de calos. Os cortes foram desparafinados e submetidos a coloração com hematoxilina: eosina ou azul de toluidina a 1%. As lâminas foram observadas e as imagens capturadas digitalmente por câmara CCD Alpha-Inmotech.

Parte das amostras de calos foram homogeneizadas em tampão fosfato 0,1M (pH 7,8) gelado, composto de 0,4 g de polivinilpolipirrolidona, 2mM dithiothreitol, 0,1mM EDTA (ácido etilenodiaminotetracético), centrifugado a 1200g durante 20 minutos. O sobrenadante estocado em freezer -80°C e utilizado para análise enzimática de SOD.

Para determinação da atividade de SOD adicionou-se 50 µL de extrato ao tampão fosfato 0,1M (pH 7,8) contendo 1,3µM riboflavina, 13mM metionina e 63µM nitro blue tetrazolium. Os tubos foram incubados a 25°C por 15 minutos sob iluminação de lâmpadas fluorescentes e a leitura foi feita em espectrofotômetro a 560nm. Tubos contendo o mesmo meio, não foram submetidos à luz e utilizados como branco. A atividade do SOD foi definida como a atividade de enzima capaz de inibir a fotoredução do NBT (Nitro Blue Tetrazolium) a formazan azul em 50% e foi expressa em unidades de SOD.(mg proteína)<sup>-1</sup>.

As variáveis analisadas foram a coloração, o tamanho (cm) em seu maior diâmetro, o tipo formado, a Histologia e a atividade de superóxido dismutase nos calos formados. A avaliação foi feita aos 30 e 60 dias. Os dados de coloração e friabilidade foram transformados em  $(X + 0.5)^{-1/2}$ , os dados de comprimento e atividade de SOD não foram transformados, e todos foram avaliados pelo teste F e quando este foi significativo pelo teste de Scott-Knott (1974).

### 2.3 Resultados e Discussão

Não houve desenvolvimento, nem sobrevivência, de calos em meio não suplementado com ANA. Resultados semelhantes foram obtidos por Silva *et al.* (2003) onde calos de carqueja (*Baccharis* sp., *Asteraceae*) só cresceram quando cultivados em meio de cultura contendo ANA conjuntamente com BAP ou CIN.

O maior desenvolvimento de calo (Tabela 1) obtido na avaliação A, foi com a combinação do tratamento 14 (1,0/2,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP/ANA); na avaliação B, o crescimento pelo tratamento 8 (0,5/0,5mg L<sup>-1</sup> de BAP/ANA).

Cerqueira et al. (2002) observaram que a coloração e a consistência de calos de erva-de-touro (*Tridax procumbens* L., *Asteraceae*), cultivados *in vitro*, dependeram tanto da concentração como do tipo de regulador de crescimento utilizado no meio de cultura, sendo a cor verde a mais predominante, e está relacionada aos reguladores ANA e BAP. Fato semelhante aconteceu com gérbera (ARELLO et al., 1991) os quais observaram diferentes níveis de coloração em quatro cultivares, bem como Pierik *et al.* (1982) que constataram esses efeitos de genótipo no comportamento de plantas *in vitro*.

Os calos formados apresentaram variação de cores (Tabela 1); os calos mais claros, brancos até amarelos ou verdes claros foram mais friáveis, ou seja, com maior potencialidade para embriogênese (Figura 1). Os calos, marrons e verdes escuros, tendem a ser mais duros, se mostrando menos friáveis. Neste estudo observou-se a formação de calos em 100% dos explantes submetidos aos tratamentos com BAP/ANA, porém em 24% houve morte por oxidação.

A formação de calos em explantes cultivados é induzida em altas concentrações de citocinina/auxina (LITZ; JARRET, 1991). Para o tamanho de calos (Tabela 1), os tratamentos apresentaram diferenças, devido ao tempo de contato com os meios de cultura contendo combinações diferentes dos reguladores, sendo que os tratamentos cuja concentração citocinina/auxina foi relativamente alta apresentaram maior crescimento que os demais. Segundo Huetteman e Preece (1993) e Laszloffy et al. (1992) a alta concentração de citocininas no meio induz a formação excessiva de calos.

A formação de calos em discos foliares como vista neste trabalho é fato bem documentado em cultura de tecidos sendo comum em várias espécies como *Smilax japecanga* (*Smilacaceae*) e *Coffea arabica* (SANTOS et al., 2005, *Rubiaceae*) e *Passiflora suberosa* (Monteiro et al., 2000, *Passifloraceae*).

A análise de variância do efeito dos tratamentos com diferentes concentrações e combinações de benzilaminopurina (BAP) e ácido naftaleno acético (ANA) revelou significância estatística para as variáveis analisadas (Tabela 1).

**TABELA 1** – Tratamentos com BAP/ANA na primeira época de avaliação (A) aos 30 dias e segunda época de avaliação (B) aos 60 dias, Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo de Teste de Scott-Knott (1974)

|    | Tratamento BAP ANA    |       | Tamanho |       | Coloração |       | Friabilidade |       |
|----|-----------------------|-------|---------|-------|-----------|-------|--------------|-------|
|    | (mg L <sup>-1</sup> ) |       | A       | B     | A         | B     | A            | B     |
| 1  | 0                     | 0     | 0e      | 0d    | 0e        | 0c    | 0d           | 0d    |
| 2  | 0                     | 0,25  | 1,13c   | 0,49c | 1,66d     | 3,49a | 0,49c        | 1,82b |
| 3  | 0                     | 0,5   | 1,31c   | 1,50b | 1,69d     | 3,49a | 0,49c        | 1,50b |
| 4  | 0                     | 1,0   | 0e      | 0d    | 0e        | 0c    | 0d           | 0d    |
| 5  | 0                     | 2,0   | 1,13c   | 2,13a | 2,61c     | 3,49a | 0,49c        | 0,49c |
| 6  | 0,5                   | 0     | 0e      | 0d    | 0e        | 0c    | 0d           | 0d    |
| 7  | 0,5                   | 0,25  | 0,64d   | 1,50b | 3,33b     | 3,49a | 1,62b        | 1,50b |
| 8  | 0,5                   | 0,5   | 1,31c   | 2,13a | 3,49b     | 3,49a | 2,31a        | 2,50a |
| 9  | 0,5                   | 1,0   | 1,13c   | 2,50a | 3,49b     | 2,50b | 2,31a        | 1,50b |
| 10 | 0,5                   | 2,0   | 1,50b   | 2,50a | 3,49b     | 2,50b | 2,31a        | 1,50b |
| 11 | 1,0                   | 0     | 0e      | 0d    | 0e        | 0c    | 0d           | 0d    |
| 12 | 1,0                   | 0,25  | 0,49d   | 1,50b | 3,33b     | 2,50b | 2,31a        | 1,50b |
| 13 | 1,0                   | 0,5   | 0,80d   | 1,79b | 3,33b     | 2,50b | 2,50a        | 1,50b |
| 14 | 1,0                   | 1,0   | 2,13a   | 2,50a | 3,80a     | 2,50b | 2,31a        | 1,50b |
| 15 | 1,0                   | 2,0   | 1,50b   | 2,50a | 3,49b     | 3,49a | 2,31a        | 1,50b |
| 16 | 2,0                   | 0     | 0e      | 0d    | 0e        | 0c    | 0d           | 0d    |
| 17 | 2,0                   | 0,25  | 0,96c   | 1,79b | 3,49b     | 3,49a | 2,31a        | 1,50b |
| 18 | 2,0                   | 0,5   | 1,13c   | 1,50b | 2,65c     | 3,49a | 2,50a        | 1,50b |
| 19 | 2,0                   | 1,0   | 1,50b   | 1,50b | 2,50c     | 3,49a | 2,50a        | 0,49c |
| 20 | 2,0                   | 2,0   | 0,49d   | 0,49c | 3,97a     | 3,49a | 2,31a        | 1,50b |
| 21 | 4,0                   | 0     | 0e      | 0d    | 0e        | 0c    | 0d           | 0d    |
| 22 | 4,0                   | 0,25  | 0,49d   | 0,49c | 3,49b     | 3,49a | 2,31a        | 1,50b |
| 23 | 4,0                   | 0,5   | 0,49d   | 0,49c | 3,49b     | 3,49a | 2,31a        | 1,50b |
| 24 | 4,0                   | 1,0   | 0,64d   | 1,50b | 3,49b     | 3,49a | 2,31a        | 1,50b |
| 25 | 4,0                   | 2,0   | 0,96c   | 2,50a | 3,49b     | 3,49a | 2,31a        | 1,50b |
|    |                       | Média | 1,16    | 1,66  | 2,80      | 2,84  | 1,52         | 1,56  |
|    |                       | CV    |         | 19,84 |           | 7,32  |              |       |

As médias de coloração e friabilidade foram atribuídas Notas segundo os seguintes critérios. Coloração, 1 branco, 2 amarelo, 3 verde e 4 marrom. Friabilidade, 1 vitreo, 2 intermediário e 3 friável. (\* tratamento perdido devido contaminação).

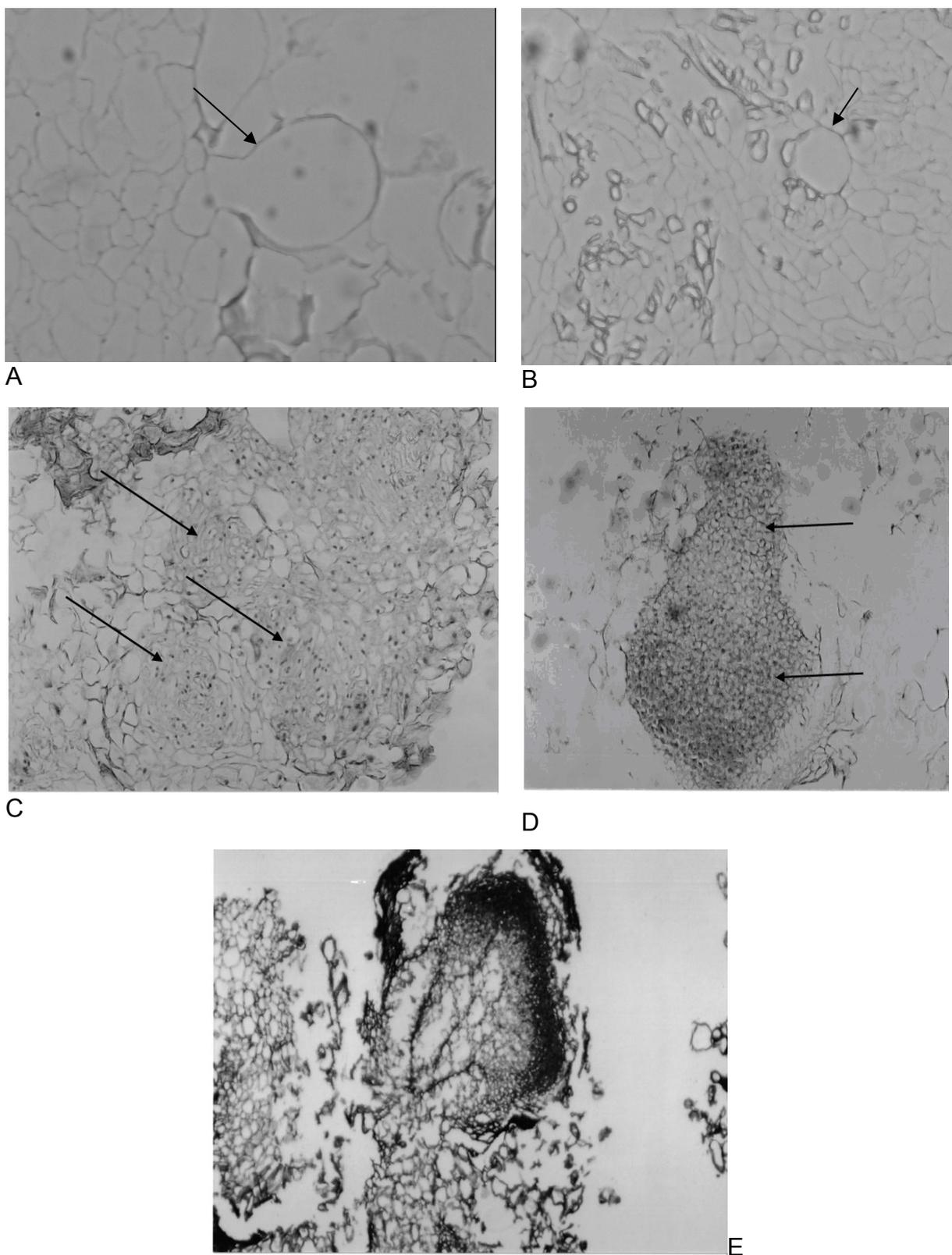
Observou-se que em quase todos os explantes foliares de gérbera sofreram formação de calos, friáveis ou vitrificados, tratamentos sem auxina não induziram calos. Utilizando-se 2,0 mg L<sup>-1</sup> de ANA e 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP. Landa et al. (2000) induziram a calogênese em explantes foliares de pequi. Observações semelhantes foram feitas em moreira (*Maclura tinctoria*; *Moraceae*), uma espécie

que apresenta dificuldades de propagação sexuada, onde se obteve a indução de calos em segmentos foliares (GOMES, 1999) de maneira análoga.

A ocorrência de calos friáveis, segundo Cid (1998), pode ser devida a relações mais elevadas auxina/citocinina, ou de acordo com França (1999), pelo fato de os calos terem sido cultivados em presença de luz, conferindo, geralmente, maior friabilidade que os cultivados em ausência de luz. Resultados semelhantes foram observados por vários autores para outras espécies de plantas, como *Ambrosia tenuifolia* Spreng (GOLENIOWSKI et al., 1992; *Asteraceae*), *Artemisia absinthium* (NIN et al., 1996; *Asteraceae*) e para quatro espécies do gênero *Baccharis* (*B. cordifolia* DC., *B. halimifolia* L., *B. megapotamica* Spreng. e *B. neglecta* Britton & A. Brown; *Asteraceae*), nas quais praticamente não se obtiveram sobrevivência dos explantes e formação de calo em ausência de reguladores de crescimento vegetal (KUTI; JARVIS, 1992).

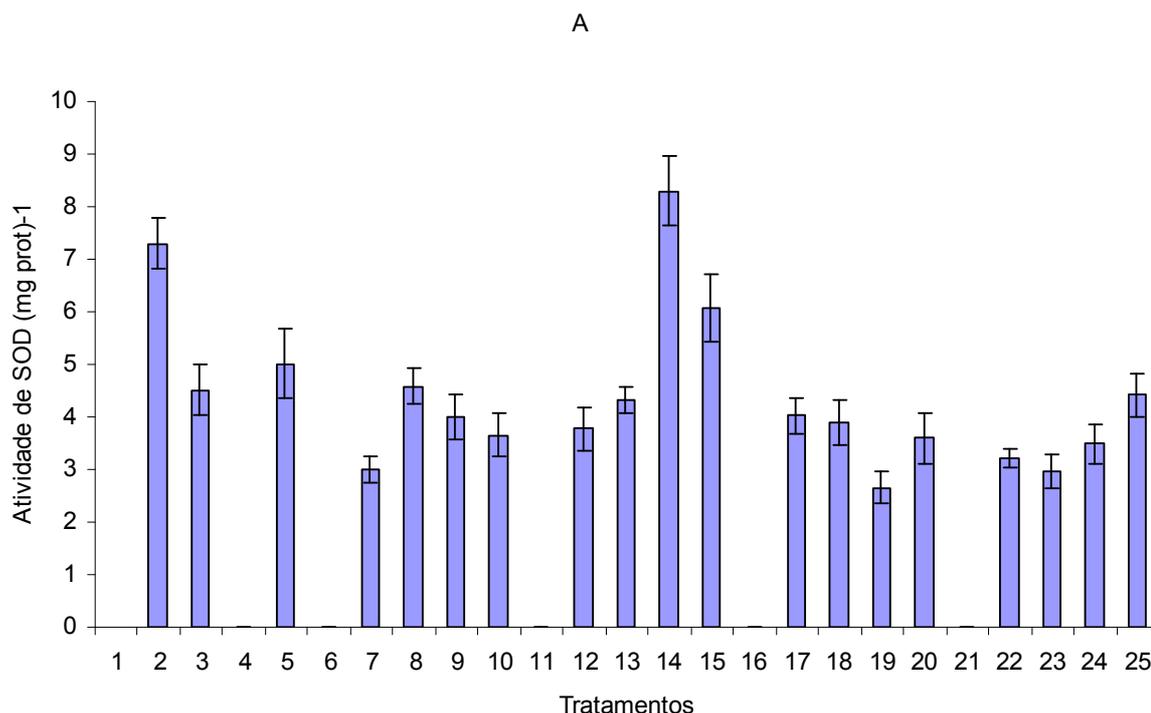
Os melhores calos de gérbera foram formados em dose de 0,5/0,5mg L<sup>-1</sup> de BAP/ANA, apresentando o melhor crescimento inclusive em subculturas, aparenta-se com um calo claro (verde amarronzado claro) e bastante friável. Tais calos apresentaram embriões em diversos estágios de maturação inicial com células com divisão assimétrica, embriões em estágios iniciais multicelulares e embriões somáticos cordiformes (Figura 1).

De acordo com Bered et al. (1998), a regeneração de plantas através de embriogênese somática é preferível, pois os embriões somáticos produzidos através desta técnica têm crescimento mais rápido e altos níveis de regeneração.



**FIGURA 1** - Embriogênese somática de *Gerbera* em meio de cultura. A e B - Pró embriões com divisão celular assimétrica. C - Pró embriões multicelulares (Setas). D - Embrião somático em estágios iniciais. E - Embrião somático cordiforme. Presidente Prudente, 2007

Na Figura 2, estão os resultados obtidos com a atividade da SOD em calos de gérbera. A superóxido dismutase (SOD) é uma enzima envolvida diretamente na desintoxicação celular, transformando o radical superóxido em oxigênio molecular e peróxido de hidrogênio, e indiretamente envolvidos na síntese de fenóis e ligninas, compostos que atuam na defesa de células e tecidos.



**FIGURA 2** – Atividade de SOD em calos de *Gerbera* nas diferentes combinações de BAP/ANA. Presidente Prudente, 2007. Barras nas colunas desvio padrão

Sob condições de estresse, as plantas tendem a aumentar a atividade das peroxidases e é o primeiro grupo de enzimas a ter atividade alterada, independentemente do substrato utilizado ou do estresse aplicado. As peroxidases podem ser tomadas como um marcador bioquímico de estresse resultante tanto de fatores bióticos como abióticos e ainda parecem ser as moléculas chaves de adaptação das plantas, ou de algum de seus órgãos separadamente, às mudanças do meio ambiente (ROSSI et al., 2001).

**TABELA 2** - Análise de correlação simples entre as variáveis Atividades de SOD, Tamanho, tipo e cor de calo de explantes foliares de *Gerbera jamensonii*, obtidos em diferentes tratamentos com fitorreguladores. Presidente Prudente, 2007. Valores de correlação (r) seguidos de \*\* são significativos ao nível de 1%

|         | SOD      | Tamanho  | Tipo     | Cor |
|---------|----------|----------|----------|-----|
| SOD     | 1        | -        | -        | -   |
| Tamanho | 0,8180** | 1        | -        | -   |
| Tipo    | 0,6141** | 0,7747** | 1        | -   |
| Cor     | 0,7052** | 0,7961** | 0,8989** | 1   |

A análise de correlação (Tabela 2) mostra que houve correlação positiva entre todas as variáveis analisadas. Assim alta atividade de SOD está ligada ao crescimento, tamanho e coloração do calo. Quanto maior a atividade da enzima, maior o calo tendendo a ser mais escuro e mais friável. Tamanho, tipo e cor também estão positivamente correlacionados indicando que calos maiores são mais escuros e mais friáveis e calos menores apesar de serem mais claros tendem a ser mais duros. O crescimento de células e calos em cultura de tecidos ocorre em ritmo acelerado, o que geraria uma maior concentração de radicais livres estimulando a síntese de enzimas antioxidantes, os quais teriam então dupla finalidade, a de desintoxicação e a de fornecer moléculas para biossíntese celular. Todavia, isto poderia levar a um desequilíbrio celular favorecendo o escurecimento dos calos pela formação e ação dos compostos fenólicos, ou tornando os calos extremamente duros (vitrêos) pelo possível aumento de lignina como sugerido por Hammerschmidt e Kuc (1982; 1995); Siegel, (1993) e Foyer et al. (1997) como formas de resistência aos estresses impostos.

## 2.4 Conclusão

Os segmentos foliares de gérbera representam uma ótima fonte para indução de calogênese e são dependentes de ANA para a formação de calos. A enzima Superóxido Dismutase, pode ser usada como ferramenta para medir o

desenvolvimento de calos; e a melhor combinação de BAP/ANA para formação e subcultivo de calos, de *Gérbera* embriogênicos é de 0,5/0,5 mg L<sup>-1</sup>.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARELLO, E. F. et al. Estabelecimento *in vitro* de explantes e regeneração de plântulas de *Gerbera jamesonii* Bolus Ex Hook em cultura de tecidos. **Revista Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 26, n. 2, p. 269-273, fev, 1991.
- BAILLY, C. et al. Free radical scavenging as affected by accelerated ageing and subsequent priming in sunflower seeds. **Physiologia Plantarum**, Lund, v. 104, p. 626-652, 1998.
- BARROS, L. M. Embriogênese somática. Biotecnologia. **Ciência e Desenvolvimento**, v. 2, n. 7, p. 36-39, 1999.
- BENHAMOU, N.; NICOLE, M. Cell biology of plant immunization against microbial infection: the potential of induced resistance in controlling plant diseases. **Plant Physiology and Biochemistry**, Oxford, v. 37, n. 10, p. 703-719, 1999.
- BERED, F. et al. Regeneração de plantas de aveia a partir de calos embriogênicos e organogênicos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 33, n. 11, p. 1827-1833, 1998.
- BOUZIGUES, P. La production de vitroplants pour l'horticulture ornementale en France. **Revue Horticole**, Paris, v. 277, p. 15-23, 1987.
- CERQUEIRA, E. S. et al. Indução de calos em erva-de-touro (*Tridax procumbens* L.) utilizando diferentes reguladores de crescimento e tipos de explantes. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 26, n. 2, p. 301-308, mar,/abr, 2002.
- CHAOUI, A. et al. Cadmium and zinc induction of lipid peroxidation and effects on antioxidant enzymes activities in bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Plant Science**, Madison, v. 127, p. 139-147, 1997.
- 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**, Tokyo, v. 52, n. 1, p. 45-50, 1983.
- CID, L. P. B. Suspensão celular. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 1998. v. 1, p. 331-353.

DURZAN, D. J. Somatic polyembryogenesis for the multiplication of tree crops. **Biotechnology Genetics Engineering Review**, Nottingham, v. 6, p. 339-376, 1988.

FOYER, C. H. et al. Hydrogen peroxide and glutathione-associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signalling. **Physiologia Plantarum**, Lund, v. 100, p. 241-254, 1997.

FRANÇA, S. C. Abordagens biotecnológicas para a obtenção de substâncias ativas. In: SIMÕES, C. M. O. et al. (Orgs.). **Farmacognosia da planta ao medicamento**. Porto Alegre: UFRGS; Florianópolis: UFSC, 1999. p. 101-121.

GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. Superoxide dismutases. 1. Occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, Rockville, v. 59, p. 309-314, 1977.

GOLENIOWSKI, M. E. et al. Effect of phytohormones on sesquiterpene lactone production in callus culture of *Ambrosia tenuifolia*. **Phytochemistry**, New York, v. 31, p. 2359-2361, 1992.

GOMES, G. A. C. Propagação *in vitro* de Moreira (*Maclura tinctoria*). 1999. 92 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, 1999.

GREGGAINS, V. et al. Metabolism-induced free radical activity does not contribute significantly to loss of viability in moist-stored recalcitrant seeds of contrasting species. **New Phytologist**, Lancaster, v. 148, p. 267-276, 2000.

GUERRA, M. P. et al. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA – CNPH, 1999. p. 533-568.

HAMMERSCHMIDT, R.; KUC, J. Lignification as a mechanism for induced systemic resistance in cucumber. **Physiology of Plant Pathology**, Berlin, v. 20, p. 61-71, 1982.

HAMMERSCHMIDT, R.; KUC, J. **Induced resistance to disease in plants**. Boston: Kluwer Academic Pub., 1995. 182 p.

HANDRO, W.; FLOH, E. I. S. Aspectos básicos do controle da morfogênese *in vitro*. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. (Ed.). **Técnicas e Aplicações da Cultura de Tecidos de Plantas**, Brasília: ABCTP/EMBRAPA/CNPH, 1990. p. 203-212.

HIROKAZU, F. et al. Somatic embryogenesis from the leaf tissues of continuously subcultured shoots in Japanese Persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.). **Japanese Journal of Breeding**, Bunkyo-Ku, n. 38, p. 465-469, 1998.

HUETTEMAN, C. A.; PREECE, J. E. Thiadiazuron: a potent cytokinin for wood plant tissue culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v. 33, n. 2, p. 105-119, 1993.

JIMÉNEZ, V. M. Regulation of *in vitro* somatic embryogenesis with emphasis on the role of endogenous hormones. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 13, n. 2, p. 196-223, 2001.

JUNG, S. et al. Antioxidant responses of cucumber to photoinhibition and oxidative stress induced by norflurazon under high and low PPFDs. **Plant Science**, Madison, v. 153, p. 145-154, 2000.

KÚC, J. Development and future direction of induced systemic resistance in plants. **Crop Protection**, Oxford, v. 19, p. 859-861, 2000.

KUTI, J. O.; JARVIS, B. B. Growth hormone-like activities of macrocyclic trichothecenes *in vitro* callus induction and growth of four *Baccharis* species. **Journal of Plant Growth Regulation**, New York, v. 11, p. 149-154, 1992.

LALIBERTÉ, S. et al. *In vitro* plantlet production from young capitulum explants of *Gerbera jamesonii*. **HortScience**, Alexandria, v. 20, n. 1, p. 137-139, 1985.

LANDA, F. S. L. et al. Indução *in vitro* de calos em explantes foliares de pequi ( *Caryocar brasiliense* Camb.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 24, p. 56-63, 2000. (Edição Especial).

LASZLOFFY, K. et al. *In vitro* propagation of `Julyred` apple. **Acta Horticulturae**, n. 300, p. 149-154, 1992.

LITZ, R. E.; JARRET, R. L. Regeneración de plantas em el cultivo de tejidos, embriogenesis somática y organogenesis. In: ROCA, W. M.; MROGINSKY, L. A. **Cultivo de tejidos em la agricultura: fundamentos e aplicaciones**. Cali: CIAT, 1991. p. 143-172.

MACHADO NETO, N. B. et al. Proline: use as an indicator of temperature stress in bean seeds. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Viçosa, v. 4, p. 330-337, 2004.

MAZHOU, S. et al. Response of antioxidant enzymes excess copper in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill). **Plant Science**, Madison, v. 127, p. 129-137, 1997.

McCUE, P. et al. A model for enhanced pea seedling vigour following low pH and salicylic acid treatments. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 35, p. 603-613, 2000.

MONTEIRO, A. C. B. A. et al. Regeneração *in vitro* de *Passiflora suberosa* a partir de discos foliares. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 57, n. 3, p. 571-573, 2000.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Lund, v. 15, p. 473-497, 1962.

MURASHIGE, T. et al. Clonal multiplication of *Gerbera jamesonii* through tissue culture. **HortScience**, Alexandria, v. 9, n. 3, p. 175-180, 1974.

NIN, S. et al. Callus cultures of *Artemisia absinthium* L.: initiation, growth optimization and organogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Hague, v. 45, n. 1, p. 67-72, Apr. 1996.

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

PIERIK, R. L. M. et al. Effect of cytokinin and cultivar on shoot formation of *Gerbera jamesonii* *in vitro*. Netherlands. **Journal of Agricultural Science**, Wageningen, v. 30, n. 4, p. 341-346, 1982.

RIVERO, R. M. et al. Resistance to cold and heat stress: accumulation of phenolic compounds in tomato and watermelon plants. **Plant Science**, Madison, v. 160, p. 315-321, 2001.

ROSSI, C.; LIMA, G. P. Cádmio e atividade de peroxidase durante a germinação de sementes de feijoeiro. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 58, p. 197-199, 2001.  
SANTOS, B. R. et al. Indução de calos friáveis em explantes foliares de *Salix* (*Salix humboldtiana* Willd). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 3, p. 510-514, mai./jun, 2005.

SCOTT, A. J.; KNOTT, M. A. A cluster analyses method for grouping means in the analyses of variance. **Biometrics**, v. 30, p. 502-512, 1974.

SIEGEL, B. Z. Plant peroxidases: an organismic perspective. **Plant Growth Regulation**, Oxford, v. 12, p. 303-312, 1993

SILVA, F. G. et al. Efeito da concentração de sais e fitorreguladores na indução de calos em carqueja. **Ciência e Agrotecnologia**., Lavras, v. 27, n. 3, p. 541-547, maio/jun., 2003.

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

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como oxidantes. **Revista de Nutrição**, PUCCAMP, Campinas v. 15, p. 71-79, 2002.

SUNG, J. M.; JENG, T. L. Lipid peroxidation and peroxide-scavenging enzymes associated with accelerated aging of peanut seed. **Physiologia Plantarum**, Lund, v. 91, p. 51-55, 1994.

VICIENT, C. M.; MARTINEZ, F. X. The potential uses of somatic embryogenesis in agroforestry are not limited to synthetic seed technology. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Campinas, n. 10, v. 1, p. 1-12, 1998.

### 3 ARTIGO II: AVALIAÇÃO DO ÁCIDO $\beta$ NAPHYTOX-ACÉTICO NA FORMAÇÃO DE CALOS EM SEGMENTOS FOLIARES DE *GERBERA* (*Gerbera jamesonii*)

#### RESUMO

A *Gerbera* possui características de grande interesse comercial, como produtividade, coloração vibrante e durabilidade floral. Folhas completamente expandidas de plantas comerciais foram submetidas à desinfecção, seccionadas em fragmentos de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup> e incubadas em meio de cultura MS em combinação fatorial 5x5 de reguladores de crescimento: (BAP) benzilaminopurina (0,0; 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 mg.L<sup>-1</sup>) e (NOA) ácido  $\beta$  naphthoxy-acético (0,0; 0,25; 0,50; 1,0 e 2,0 mg.L<sup>-1</sup>). Os calos obtidos foram avaliados em dois períodos, observando-se o crescimento, coloração e friabilidade. A melhor combinação de reguladores de crescimento vegetal para obtenção de calos friáveis foram as seguintes: 4,0/0,25 mg L<sup>-1</sup> e 4,0/0,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP/NOA respectivamente. Utilizou-se a enzima superóxido dismutase (SOD) como marcador bioquímico para avaliação e seleção dos calos, havendo correlação positiva entre a atividade da enzima e as variáveis morfológicas dos calos.

Palavras-chave: cultura de tecidos, embriogênese somática, ácido naphytox acético, superóxido dismutase.

#### ABSTRACT

*Gerbera* possess characteristics of great commercial interest, as productivity, vibrant coloration and flower longevity. Completely expanded leaves of commercial plants were disinfected, cut in 1cm<sup>2</sup> fragments and incubated in MS culture media in a 5x5 factorial combination of (BAP) benzilaminopurine (0; 0.5; 1.0; 2.0 and 4.0 mg.L<sup>-1</sup>) and (NOA) acid  $\beta$  naphthoxy-acetic (0; 0.25; 0.50; 1.0 and 2.0 mg.L<sup>-1</sup>) as growth regulators. The obtained calluses were evaluated twice by size, coloration and

friability. The best combination of plant growth regulators for friable calluses formation was the following ones: 4.0/0.25 mg L<sup>-1</sup> and 4.0/0.5 mg L<sup>-1</sup> of BAP/NOA respectively. Superoxide dismutase (SOD) was used as biochemical marker for evaluation and selection of the calluses and there was a positive correlation of the activity of the enzyme with the morphologic variables of the calluses.

Key word: tissue culture, somatic embryogenesis, naphthoxy acetic acid, superoxide dismutase.

### 3.1 Introdução

Desde a década de 90 o mercado de flores, tanto de corte como de vaso, vem crescendo vertiginosamente, juntamente com plantas frutíferas ou não, plantas ornamentais até produção de bulbos e sementes; fatores esses de relevância para o agro negócio brasileiro.

Nativa da África e Ásia, as *Gerberas* apresentam características agrônômicas de interesse comercial, como por exemplo, a durabilidade de suas flores, diversas nuance de cores e a forma das flores, dentre outros.

Segundo Severin et al. (2000), existem métodos naturais de propagação para esta herbácea, como a propagação sexual e vegetativa, ocorre que, na propagação via sementes as conseqüências são manifestações de uma grande variabilidade em suas características fenotípicas e genotípicas, já que se trata de uma planta alógama. O método de propagação vegetativa possui a desvantagem de acumular doenças durante as gerações em que é propagada e os métodos de propagação por divisão de touceira e por corte do rizoma são ineficientes, e produzem poucas mudas durante o ano. (CHU; HUANG, 1983).

Estudos feitos com *Gerbera* apontam várias possibilidades de formação de plantas a partir de ápices (HUANG; CHU, 1985), capítulos (LALIBERTÉ et al., 1985) e óvulos (MIYOSKI; ASAKURA, 1996). Em todos os métodos de multiplicação in vitro, tem sido imprescindível o uso de reguladores de crescimento vegetal.

A cultura de tecidos é uma técnica importante, especialmente para plantas de difícil propagação pelos métodos convencionais, como o caso da *Gerbera* (BARBOSA et. al., 1993).

A propagação através de cultura de tecidos pode ser feita direta ou indiretamente, sendo esta última pela formação de calos que é considerada uma forma potencial de propagação em massa. O cultivo de calos tem sido utilizado para estudos sobre o desenvolvimento celular, obtenção de suspensão celular e embriões somáticos Landa et al. (2000).

As citocininas e auxinas são os reguladores de crescimento mais utilizados na cultura de tecidos (CALDAS et al., 1990). Os reguladores de crescimento são substâncias que produzidas por um tecido e transportadas para outro, desempenham efeitos muito específicos.

Pessarakli e Dris (2003) citam que várias auxinas são utilizadas em estudos para melhoramento genético de plantas de berinjela e dentre elas o ácido naphthoxy acético.

Guerra et al. (1999) e Jiménez (2001), citam que a embriogênese somática pode ser descrita como o processo pelo qual as células somáticas desenvolvem estruturas semelhantes a embriões zigóticos, por meio de uma seqüência ordenada de estádios embriogênicos característicos, sem ocorrência de fusão dos gametas.

Dentre os processos de propagação clonal, a embriogênese somática é, teoricamente, a melhor opção para a propagação *in vitro* por apresentar algumas vantagens, por exemplo: a alta taxa de multiplicação comparada a qualquer outro processo de propagação; o escalonamento da produção pela manutenção da cultura em meio líquido; o plantio direto da muda obtida via embriogênese somática sem necessidade de enxertia, com menor custo de produção, além de a planta ser geneticamente igual à planta mãe, o que não acontece com plantas obtidas por métodos convencionais de propagação vegetativa (BARROS, 1999).

Certas enzimas associadas ao estresse causado por excesso de oxidantes são importantes no mecanismo de defesa de plantas. A superóxido-dismutase (SOD) ajuda a eliminar os radicais livres. Como o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) é altamente tóxico para as células, os organismos aeróbios criaram meios de proteção contra seus efeitos utilizando enzimas para removê-los, tais como a catalase, peroxidase dentre outras.

A oxidação nos sistemas biológicos ocorre devido à ação dos radicais livres no organismo. Estas moléculas têm um elétron desempareado, livre para se ligar a qualquer outro elétron e por isso, são extremamente reativas (SOARES, 2002).

Os antioxidantes destroem os radicais livres como o  $O_2^-$  e OH. Em 1969, ficou evidenciado que a enzima superóxido-dismutase, presente em quase todas as células, catalisa a conversão do  $O_2$  em  $H_2O_2$ , sendo que a SOD é considerada a primeira linha de defesa contra espécies reativas de oxigênio (VOET et al. 2000).

O objetivo deste trabalho foi a avaliar o efeito da auxina ácido  $\beta$  naphthoxy acético (NOA) na obtenção de calos para fins de propagação clonal.

### **3.2 Material e Métodos**

O experimento foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos da UNOESTE Universidade do Oeste Paulista – Presidente Prudente/SP.

O material vegetal utilizado como matriz foi obtida no Ceasa da cidade de Presidente Prudente - SP. Foram selecionadas folhas jovens com aparência saudável, sem manchas e pragas.

Ao serem retiradas, as folhas foram lavadas em água corrente com detergente neutro e em seguida foram transferidas para câmara de fluxo laminar e submetidas à desinfecção com solução de hipoclorito de sódio (40% v/v) e 100 $\mu$ l de Tween 80 durante 30 minutos, sendo enxaguados por duas vezes em água destilada e cortados em solução estéril de cisteína 500mg L<sup>-1</sup>. Em seguida foram seccionados em fragmentos de 1cm<sup>2</sup> e incubados em meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) sem adição de hormônios para seleção de explantes. Apenas os fragmentos não contaminados ou oxidados foram utilizados para a incubação nos meios de cultura com reguladores de crescimento em diferentes concentrações nos diversos tratamentos.

Ao final de 30 e 60 dias, os explantes foram transferidos para meio de cultura novo, sendo medidos com uma régua. Os calos receberam notas quanto a

coloração (1 - branco, 2 - amarelo, 3 - verde e 4 - marrom) e friabilidade (1 - vítreo, 2 - intermediário e 3 - friável).

O meio de cultura utilizado foi MS, acrescido de  $1\text{mg/L}^{-1}$  de tiamina,  $20\text{g/L}^{-1}$  de sacarose e  $100\text{mg/L}^{-1}$  de inositol, sendo solidificado com  $2,0\text{g/L}^{-1}$  de Phytigel® e o pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem. Os tratamentos foram delineados em um fatorial 5x5 de BAP (benzilaminopurina; 0,0; 0,5; 1,0; 2,0 e  $4,0\text{mg L}^{-1}$ ) e NOA (ácido  $\beta$  naphthoxy-acético; 0,0; 0,25; 0,50; 1,0 e  $2,0\text{mg L}^{-1}$ ) com dez repetições de dois explantes por frasco. Os frascos foram esterilizados por autoclavagem durante 20 minutos a  $121^{\circ}\text{C}$  e 1 atm de pressão. Os frascos permaneceram em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas, e temperatura  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ .

As variáveis analisadas foram o tamanho no seu maior diâmetro, a cor, a friabilidade e a atividade de Superóxido Dismutase. A avaliação foi realizada com 30 e 60 dias. Os dados foram transformados em  $(X + 0.5)^{-1/2}$  e avaliados pelo teste F e quando este foi significativo pelo teste de Scott-Knott (1974).

Para a análise da atividade de SOD as amostras foram homogeneizadas em tampão fosfato 0,1M (pH 7,8) gelado, composto de 0,4 g de polivinilpirrolidona, 2 mM dithiothreitol, 0,1 mM EDTA, centrifugado a 1200 rpm durante 20 minutos. O sobrenadante estocado em freezer  $-80^{\circ}\text{C}$  e utilizado para análise enzimática.

Foi adicionado 50  $\mu\text{L}$  de extrato ao tampão fosfato 0,1M (pH 7,8) contendo 1,3  $\mu\text{M}$  riboflavina, 13 mM metionina e 63  $\mu\text{M}$  nitro blue tetrazolium. Os tubos foram incubados a  $25^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos sob iluminação de lâmpadas fluorescentes, a leitura foi de absorbância a  $560\text{nm}$ . Tubos contendo o mesmo meio, não foram submetidos a luz e utilizados como branco. A atividade do SOD foi definida como a atividade de enzima capaz de inibir a fotorredução do NBT a formazan azul em 50% e será expressa em unidades de SOD.(mg proteína) $^{-1}$ .

### 3.3 Resultados e Discussão

Ao final de 30 dias, os explantes formaram calos, e esses foram medidos (cm) e imediatamente depositados em um novo frasco contendo o meio de

cultura com as mesmas características que se iniciou o ensaio; e assim também na segunda avaliação com 60 dias.

Foram observados calos em alguns dos tratamentos contendo diferentes concentrações de benzilaminopurina (BAP) e ácido  $\beta$  naphthoxy-acético (NOA) (Tabela 1). Notou-se que a combinação desta auxina, com o BAP, teve efeito positivo na indução e crescimento de calos em segmentos foliares de *Gerbera*. As melhores combinações com êxito no crescimento em quatro semanas foram 0 1,0 mg L<sup>-1</sup>; 0,5 2,0mg L<sup>-1</sup> e 1,0 0,25 mg L<sup>-1</sup> de BAP NOA; porém quando avaliados com oito semanas, houve superação em outras combinações 0,5/2,0 mg L<sup>-1</sup>; 1,0/0,25 mg L<sup>-1</sup>; 2,0/0,5 mg L<sup>-1</sup>; 2,0/2,0 mg L<sup>-1</sup>; 4,0/1,0 mg L<sup>-1</sup> e 4,0/2,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP NOA, sendo as combinações mais destacadas 0,5/2,0 mg L<sup>-1</sup>; 1,0/0,25 mg L<sup>-1</sup> de BAP/NOA.

**TABELA 1** – Tratamentos com BAP/NOA na primeira avaliação (A) aos 30 dias e segunda avaliação (B) aos 60 dias, Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo de Teste de Scott-Knott (1974).

| Número | Tratamento BAP NOA<br>(mg L <sup>-1</sup> ) |      | Tamanho<br>(cm) |      | Coloração |      | Friabilidade |      |
|--------|---|------|-----------------|------|-----------|------|--------------|------|
|        | BAP   | NOA  | A               | B    | A         | B    | A            | B    |
| 1      | 0   | 0    | 0e              | 0e   | 0f        | 0f   | 0d           | 0d   |
| 2      | 0   | 0,25 | 0e              | 0e   | 0f        | 0f   | 0d           | 0d   |
| 3      | 0   | 0,5  | 1,17c           | 1,0c | 3,83c     | 3,5d | 2,0a         | 1,0c |
| 4      | 0   | 1,0  | 2,0a            | 2,0b | 3,0b      | 1,5b | 1,0c         | 1,0c |
| 5      | 0   | 2,0  | 0e              | 0e   | 0f        | 0f   | 0d           | 0d   |
| 6      | 0,5   | 0    | 0e              | 0e   | 0f        | 0f   | 0d           | 0d   |
| 7      | 0,5   | 0,25 | 0e              | 0e   | 0f        | 0f   | 0d           | 0d   |
| 8      | 0,5   | 0,5  | 0e              | 0e   | 0f        | 0f   | 0d           | 0d   |
| 9      | 0,5   | 1,0  | 0e              | 0e   | 0f        | 0f   | 0d           | 0d   |
| 10     | 0,5   | 2,0  | 1,83b           | 3,0a | 3,0b      | 4,0e | 2,0b         | 2,0b |
| 11     | 1,0   | 0    | 0e              | 0e   | 0f        | 0f   | 0d           | 0d   |
| 12     | 1,0   | 0,25 | 2,0a            | 3,0b | 3,0b      | 1,0a | 3,0a         | 2,0b |
| 13     | 1,0   | 0,5  | 0e              | 0e   | 0f        | 0f   | 0d           | 0d   |
| 14     | 1,0   | 1,0  | 1,0d            | 2,0b | 4,0d      | 3,5d | 3,0a         | 2,0b |
| 15     | 1,0   | 2,0  | 2,0a            | 2,0b | 3,1b      | 1,0a | 3,0a         | 2,0b |
| 16     | 2,0   | 0    | 0e              | 0e   | 0f        | 0f   | 0d           | 0d   |
| 17     | 2,0   | 0,25 | 0e              | 0e   | 0f        | 0f   | 0d           | 0d   |
| 18     | 2,0   | 0,5  | 1,0d            | 2,0b | 3,0b      | 3,5d | 3,0a         | 2,0b |
| 19     | 2,0   | 1,0  | 0e              | 0e   | 0f        | 0f   | 0d           | 0d   |
| 20     | 2,0   | 2,0  | 1,0d            | 2,0b | 2,5a      | 2,5c | 3,0a         | 2,0b |
| 21     | 4,0   | 0    | 0e              | 0e   | 0f        | 0f   | 0d           | 0d   |
| 22     | 4,0   | 0,25 | 1,0d            | 1,0c | 4,0d      | 1,0a | 3,0a         | 3,0a |
| 23     | 4,0   | 0,5  | 1,0d            | 1,0c | 4,0d      | 1,0a | 3,0a         | 3,0a |
| 24     | 4,0   | 1,0  | 1,0d            | 2,0b | 3,0b      | 1,0a | 3,0a         | 2,0b |
| 25     | 4,0   | 2,0  | 1,0d            | 2,0b | 3,0b      | 1,0a | 3,0a         | 2,0b |
|        | Média                                       |      | 0,64            | 0,92 | 1,58      | 1,0  | 1,28         | 0,96 |
|        | CV  |      | 9,96            |      | 2,43      |      | 1,62         |      |

As médias de coloração e friabilidade foram atribuídas Notas segundo os seguintes critérios. Coloração, 1 branco, 2 amarelo, 3 verde e 4 marrom. Friabilidade, 1 vitreo, 2 intermediário e 3 friável.

Silva et al. (2003) relataram o crescimento de calos de carqueja (*Baccharis* - Asteraceae) na presença de auxina (ANA – ácido naftaleno acético) individualizada, bem como em interação com a citocinina (BAP – benzilaminopurina). Por outro lado, Kielse et al. (2007) utilizando 2,4 D na indução de calos de *Parapiptadenia rigida* conseguiu calos em segmentos foliares, ao passo que Pierik et al. (1982) tiveram limitações no uso desta auxina como, por exemplo, o aparecimento de mutações e inibição da fotossíntese, o que não foi descrito em outras auxinas.

Foi observada formação de calos em *Tridax procumbens* L., *Asteraceae* conhecida como erva-de-touro, quando utilizado segmentos foliares em presença das auxinas 2,4 D, AIB e ANA em conjunto com BAP (CERQUEIRA et al., 2002).

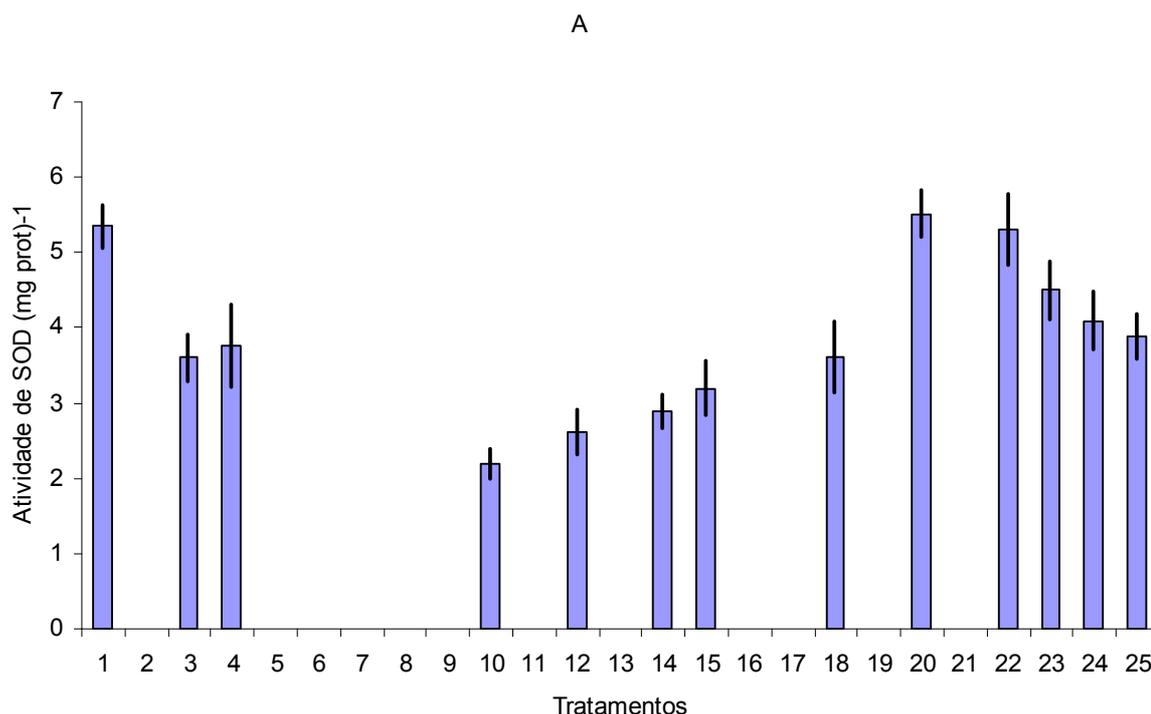
Esses dados mostram que diversos tipos de auxina são capazes de promover a indução e crescimento de calos em segmentos foliares, assim, da mesma forma que a auxina NOA foi capaz de induzir calos em segmentos foliares de *Gerbera* sp. combinada com BAP, o que está demonstrando a Tabela 1.

De acordo com Cid (1998) calos friáveis podem ocorrer em decorrência das relações mais elevadas de auxina/citocinina. Monteiro *et al.* (2000) obtiveram calos de *Passiflora suberosa*, apresentando aspecto embriogênico, com coloração amarela esverdeada e textura friável.

Calos mais claros, brancos até amarelos ou verdes claros, costumam ter maior potencialidade embriogênica que calos verdes escuros e marrons, os quais tendem a serem mais duros e menos friáveis.

Os calos formados a partir dos segmentos foliares de *Gerbera* apresentaram colorações variando do branco ao marrom, passando pelo verde. Essa variação de cores também foi observada por Landa et al. (2000) em *Caryocar brasiliense* Camb., por Kielse et al. (2007) em com angico-vermelho e por Cerqueira et al. (2002) em calos de erva-de-touro. Naseen e Jha (1994) notaram, em seus estudos, uma coloração verde escura em *Cleome viscosa* L. em meio contendo ANA e BAP.

O ácido naftoxiacético (NOA), tanto sozinho, como em conjunto com BAP, mostrou resultados semelhantes a outros estudos em relação à coloração dos calos de *Gerbera* sp., especialmente nas doses de 4mg L<sup>-1</sup> de BAP e 0,25 ou 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de NOA.



**FIGURA 1** – Atividade de SOD em calos de *Gerbera* nas diferentes combinações de BAP/NOA. Presidente Prudente, 2007.

Sob condições de estresse, as plantas tendem a aumentar a atividade das peroxidases e às vezes, este é o primeiro grupo de enzimas a ter atividade alterada, independentemente do substrato utilizado ou do estresse aplicado. As peroxidases podem ser tomadas como um marcador bioquímico de estresse resultante tanto de fatores bióticos como abióticos e ainda parecem ser as moléculas chaves de adaptação das plantas, ou de algum de seus órgãos separadamente, às mudanças do meio ambiente (ROSSI et al., 2001).

A superóxido dismutase (SOD) é uma enzima envolvida diretamente na desintoxicação celular, transformando o radical superóxido em oxigênio molecular e peróxido de hidrogênio, e indiretamente envolvidos na síntese de fenóis e ligninas, compostos que atuam na defesa de células e tecidos. Na Figura 2, estão os resultados obtidos com a atividade da SOD em calos de *Gerbera*.

**TABELA 2** - Análise de correlação simples entre as variáveis Atividade de SOD, Tamanho, tipo e cor de calo de explantes foliares de *Gerbera jamenonii*, obtidos em diferentes tratamentos com fitorreguladores. Presidente Prudente, 2007. Valores de correlação (r) seguidos de \*\* são significativos ao nível de 1%

|         | SOD      | Tamanho  | Tipo     | Cor |
|---------|----------|----------|----------|-----|
| SOD     | 1        | -        | -        | -   |
| Tamanho | 0,9250** | 1        | -        | -   |
| Tipo    | 0,9450** | 0,9271** | 1        | -   |
| Cor     | 0,9587** | 0,8910** | 0,8917** | 1   |

Alta atividade de SOD está ligada ao crescimento, tamanho e coloração do calo dados os altos valores de correlação entre as variáveis. Assim, altas atividades enzimáticas levam a um maior crescimento do calo tendendo, tendendo este a ser mais escuro e mais friável.

Tamanho, tipo e cor também estão positivamente correlacionados indicando que calos maiores são mais escuros e mais friáveis e calos menores apesar de serem mais claros tendem a ser mais duros. O crescimento celular em cultura de tecidos ocorre em ritmo acelerado, gerando uma maior concentração de radicais livres e estimulando a síntese de enzimas antioxidantes, as quais teriam então dupla finalidade, a de desintoxicação e a de fornecer moléculas para biossíntese celular. Todavia, isto poderia levar a um desequilíbrio celular favorecendo o escurecimento dos calos pela formação e ação dos compostos fenólicos, ou tornando os calos extremamente duros (vítreos) pelo possível aumento de lignina como sugerido por Hammerschmidt e Kuc (1982; 1995); Siegel, (1993) e Foyer et al. (1997) como formas de resistência aos estresses impostos. Neste trabalho, todavia, a resposta foi exatamente no sentido oposto onde os calos mais claros eram mais duros e menos friáveis.

### 3.4 Conclusão

Os segmentos foliares de *Gerbera* responderam a diversas doses de auxina (NOA - ácido  $\beta$  naphytox-acético) combinada com citocinina (BAP - benzilaminopurina). Os melhores calos foram obtidos com as combinações nas doses de 4,0/0,25 mg/L<sup>-1</sup> e 4,0/0,5 mg/L<sup>-1</sup>, BAP/NOA respectivamente. A atividade da enzima Superóxido dismutase apresenta alta correlação com as variáveis mensuradas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARBOSA et al. Efeitos da Belzilaminopurina e ácido índole-3-acético sobre a propagação *in vitro* de *Gerbera jamesonii* Bolus Ex. Hook cv. Appelbloesem. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 28, p. 15-19, 1993.

BARROS, L. M. Embriogênese somática. **Biotecnologia: Ciência e Desenvolvimento**, v. 2, n. 7, p. 36-39, 1999.

CALDAS, L. S.; HARIDSAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. (ed.). **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP/EMBRAPA-CNPH, 1990. p. 37-70.

CERQUEIRA, E. S. et al. Indução de calos em erva-de-touro (*Tridax procumbens* L.) utilizando diferentes reguladores de crescimento e tipos de explantes. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 26, n. 2, p. 301-308, mar./abr, 2002.

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**, Tokyo, v. 52, n. 1, p. 45-50, 1983.

CID, L. P. B. Suspensão celular. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. v. 1. Brasília: Embrapa Hortaliças, 1998. p. 331-353.

GUERRA, M. P.; TORRES, A. C.; FERREIRA, A. T. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA – CNPH, 1999. p. 533-568.

HUANG, M. C.; CHU, C. H. A scheme for commercial multiplication of *Gerbera* (*Gerbera hibrida* Hort.) through shoot tip cultures. **Journal of the Japanese Society for Horticultural Science**, Tokyo, v. 54, p. 94-100, 1985.

JIMÉNEZ, V. M. Regulation of *in vitro* somatic embryogenesis with emphasis on the role of endogenous hormones. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 13, n. 2, p. 196-223, 2001.

KIELSE, P. V. N.; FRANCO, E. T. H.; FRASSETO, E. G. Indução de calogênese em explantes de *Parapiptadenia rígida*. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, supl. 2, p. 84-86, 2007.

LALIBERTÉ, S. et al. *In vitro* plantlet production from young capitulum explants of *Gerbera jamesonii*. **HortScience**, Alexandria, v. 20, n. 1, p. 137-139, 1985.

LANDA, F. S. L. et al. Indução *in vitro* de calos em explantes foliares de pequizeiro (*Caryocar brasiliense* Camb.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 24, p. 56-63, 2000. (Edição Especial).

MIYOSHI, K.; ASAKURA, N. Callus induction, regeneration of haploid plants and chromosome doubling in ovule cultures of por gerbera (*Gerbera jamesonii*). **Plant Cell Reports**, v. 16, p. 1-5, 1996.

MONTEIRO, A. C. B. A. et al. Regeneração *in vitro* de *Passiflora suberosa* a partir de discos foliares. **Scientia Agrícola**, v. 57, n. 3, p. 571-573, 2000.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. Revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.

NASEEM, M.; JHA, K. K. Differentiation and regeneration in *Cleome viscosa* leaves cultured *in vitro*. **Egyptian Journal of Botany**, Cairo, v. 34, n. 1, p. 37-47, 1994.

PESSARAKLI, M. M.; DRIS, R. Effects of growth regulators on eggplants: Genetic engineering issues. **Food, Agriculture & Environment**, v. 1, p. 206-212, 2003.

PIERIK, R. L. M. et al. Effect of cytokinin and cultivar on shoot formation of *Gerbera jamesonii in vitro*, Netherlands. **Journal of Agricultural Science**, Wageningen, v. 30, n. 4, p. 341-346, 1982.

ROSSI, C.; LIMA, G. P. Cádmio e atividade de peroxidase durante a germinação de sementes de feijoeiro. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 58, p. 197-199, 2001.

SCOTT, A. J.; KNOTT, M. A. A cluster analyses method for grouping means in the analyses of variance. **Biometrics**, v. 30, p. 502-512, 1974.

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

SILVA, F. G. et al. Efeito da concentração de sais e fitorreguladores na indução de calos em carqueja. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras. v. 27, n. 3, p. 541-547, maio/jun., 2003.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como oxidantes. **Revista Nutrição**. PUCAMP, Campinas, v. 15, p. 71-9, 2002.

VOET, D.; VOET, J. G.; PRAT, C. W. **Fundamentos de Bioquímica**. Porto Alegre, Artes Médicas Sul Ltda., 2000. p. 156, 524-525.