

OTIMIZAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DOS SAIS DO MEIO MS NA PROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE GÉRBERA, VAR. 'ORNELA'

CLEITON MATEUS SOUSA¹; RONISCLEY PEREIRA SANTOS²; RICARDO MOTTA MIRANDA³

1. Escola Agrotécnica Federal de Ceres, Rodovia GO – 154, km 3 – Zona Rural – CEP 76 300 000 – Ceres –GO- Fone/Fax (62) 3307 7100. sousacm@yahoo.com.br; 2. Mestrando em Fisiologia Vegetal, UFV. ronisrural@yahoo.com.br; 3. UFRRJ / IA – D.FITO – LCTV. Br 465 km 07, Campus da UFRRJ. Seropédica, RJ. 23890-000. fone/fax. 021 3787-3755. e-mail. rmottam@ufrj.br

RESUMO

Os trabalhos com a propagação de plantas *in vitro* estão direcionados principalmente, ao ajuste de balanços de fitorreguladores mais eficientes na proliferação de brotos e diferenciação de raízes. No entanto, a composição mineral e orgânica do meio de cultura possui importante papel durante o processo. Desta forma, o presente trabalho teve por objetivo otimizar a concentração dos sais do meio MS durante a fase de multiplicação e enraizamento *in vitro* de gérbera, variedade Ornela. Avaliou-se o efeito de quatro concentrações dos sais do meio MS (25; 50; 75 e 100 %) em balanços de auxina e citocinina favoráveis à multiplicação ou ao enraizamento. Com exceção da diferenciação de raízes, a interação da concentração dos sais com os balanços de fitorreguladores foi significativa para todas as variáveis avaliadas. Na fase de multiplicação, as duas maiores (75 e 100%) e as duas menores concentrações (25 e 50%) apresentaram resultados semelhantes. Para a multiplicação, na concentração de 75% foram obtidas plântulas com excelente qualidade e, na de 50% plântulas com alto potencial para aclimatização. O ajuste das concentrações de sais do meio MS além de otimizar a qualidade das mudas produzidas, ainda permite reduzir custos com a propagação *in vitro*.

Palavras-chave: *Gerbera jamesonii*, multiplicação, enraizamento *in vitro*, nutrição.

ABSTRACT

OPTIMIZATION OF SALTS CONCENTRATION OF MEDIUM MS IN THE MICROPROPAGATION OF GERBERA, VAR. 'ORNELA'

In the micropropagation the majority researches are directed for adjust the balance growth regulator more efficient in proliferation of sprouts and differentiate roots. In the however, the organic and mineral composition of media of culture presents important role during the regeneration of plantlet. In the present work was investigated the effects of concentration salts in media MS in multiplication and rooting *in vitro* of gerbera, variety Ornela. It is evaluated the effect four concentrations of salts of media MS (25; 50; 75 and 100%) in balance of auxin and cytokinins favorable for multiplication or rooting. With exception of the differentiation of roots, the interaction of the concentration of salts whit balances growth regulators was significant for all the variables evaluated. In the phase of multiplication, the two biggest (75 and 100%) and two smaller concentrations (25 and 50%) presented similar results. The concentration of 75% showed to be efficient during the phase of multiplication and, 50% produced plantlet with high potential for acclimatization.

Key words: *Gerbera jamesonii*, multiplication, rooting *in vitro*, nutrition *in vitro*.

INTRODUÇÃO

Apesar do meio de cultura ser um dos fatores fundamentais para o sucesso do processo, a maioria dos trabalhos com propagação de plantas *in vitro* está direcionada aos balanços de fitorreguladores mais eficientes para induzir a proliferação de brotos e a diferenciação de raízes.

A nutrição mineral e orgânica está diretamente ligada ao crescimento e desenvolvimento de plantas *in vitro*. No entanto, a maioria dos estudos com nutrição tem sido realizados somente em condições de campo ou em casa de vegetação. Sendo assim, poucas informações estão disponíveis na literatura sobre o comportamento nutricional de plantas cultivadas *in vitro* (Diniz, 1999). Neste contexto, são necessárias

pesquisas no sentido de otimizar a utilização dos nutrientes durante a multiplicação e enraizamento, evitando que os nutrientes se tornam um fator limitante ao desenvolvimento, e o uso de concentrações acima do necessário às culturas.

Krikorian (1991) ressalta que as culturas *in vitro* podem ser mantidas com sucesso em meios nutritivos contendo uma mistura de sais minerais e uma fonte de carbono. No entanto, quando são utilizadas concentrações inadequadas dos minerais, as células não apresentam condições de expressar o potencial máximo, e conseqüentemente, obtém baixa eficiência durante o processo de propagação.

Apesar de se encontrar diversas formulações de meios nutritivos na literatura para cultura de células, tecidos e órgãos *in vitro*, o meio definido por Murashige & Skoog (1962), meio MS, geralmente é o mais utilizado. Basicamente, a composição do meio consiste de macro e microelementos essenciais às plantas, vitaminas, substâncias reguladoras do crescimento e carboidratos como fontes de carbono, além de outras substâncias aditivas (Rout *et al.* 2000).

As dificuldades de aprimorar as concentrações do meio de cultura para cada espécie e para cada fase do processo da cultura *in vitro* ocasionaram fracassos no emprego da cultura de tecidos para multiplicação de algumas espécies vegetais.

Nas & Read (2004) relatam que a composição química do meio de cultura tem um papel importante no sucesso da propagação de plantas *in vitro*. Quando a composição do meio de cultura não está adequada podem ocorrer desordens fisiológicas ou, até a morte do tecido vegetal.

Sato *et al.*, (2001) relataram que a alta concentração de Nitrogênio inibiu a formação de brotos e concentrações intermediárias apresentaram melhores resultados à formação de brotos para o clone II de gérbera. Segundo Bouman *et al.*, (2001), o ajuste dos macronutrientes proporcionou melhor taxa de crescimento das plantas do que os macronutrientes presentes no meio MS.

Diante disso, este trabalho teve por objetivo otimizar as concentrações dos sais do meio MS para a multiplicação e enraizamento *in vitro* de gérbera variedade Ornela.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do Departamento de Fitotecnia do Instituto de Agronomia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

Utilizou-se plântulas da variedade Ornela já implantadas *in vitro*, enraizadas, com altura em torno de 3,5 cm, e repicadas por duas vezes seguidas, com intervalo de 30 dias cada, para o meio de cultura MS sem substâncias reguladoras de crescimento, a fim de

uniformizar as plântulas e eliminar os resíduos dos fitorreguladores utilizados nas fases anteriores.

Implantou-se o experimento no delineamento experimental de blocos ao acaso, com quatro repetições, no esquema fatorial 4 x 2, sendo quatro níveis dos sais do meio MS (25; 50; 75 e 100%) e dois tratamentos de fitorreguladores (0,5 mg.L⁻¹ de AIB + 0,5 mg.L⁻¹ de BAP e 0,5 mg.L⁻¹ AIB).

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

Inoculou-se seis explantes em frascos de vidro, com capacidade de 600 mL, contendo 50 mL de meio de cultura com as concentrações e o balanço de fitorreguladores proposto para cada tratamento, vedados com filme de polietileno. Posteriormente os frascos foram transferidos para sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas de luz ao dia, intensidade luminosa de 45 µmol.m⁻².s⁻¹ e temperatura de 25±3°C, onde permaneceram até o final do experimento.

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

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

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os tratamentos apresentaram condições favoráveis para a sobrevivência das culturas *in vitro*.

O número médio de brotos formados por explante variou entre as diversas concentrações dos sais do meio MS e os balanços de fitorreguladores estudados, assim como na interação destes fatores. O balanço com 0,5 mg.L⁻¹ de AIB e 0,5 mg.L⁻¹ de BAP foi o mais eficiente na proliferação de brotos enquanto o meio contendo 0,5 mg.L⁻¹ de AIB apresentou as melhores condições para o desenvolvimento de plântulas com maior potencial (Figura 1) para serem aclimatizadas.

Os explantes mantidos em todos os níveis dos sais do meio MS apresentaram proliferação de brotos. No entanto, o número de brotos formados em cada explante foi limitado pela baixa concentração dos sais do meio MS (Figura 2). O vigor das plântulas formadas nas duas

concentrações maiores não se diferenciou (Figura 1).

Bondarev et al. (2003) observaram que para a multiplicação de *Stevia rebaudiana* (estêvia) em biorreator, o dobro da concentração de sais minerais do meio MS proporcionou incremento significativo em alguns parâmetros de crescimento (comprimento de brotos, número de raízes, massa fresca e seca).

Nos meios de cultura contendo citocinina, o

número de brotos formados nas duas concentrações menores dos sais do meio MS (25 e 50%) foi inferior ao número formado nas outras duas (75 e 100%). Já no meio com 0,5 mg.L⁻¹ de AIB, houve uma tendência de aumento linear do número médio de brotos com o incremento da concentração dos sais do meio MS (Figura 2).

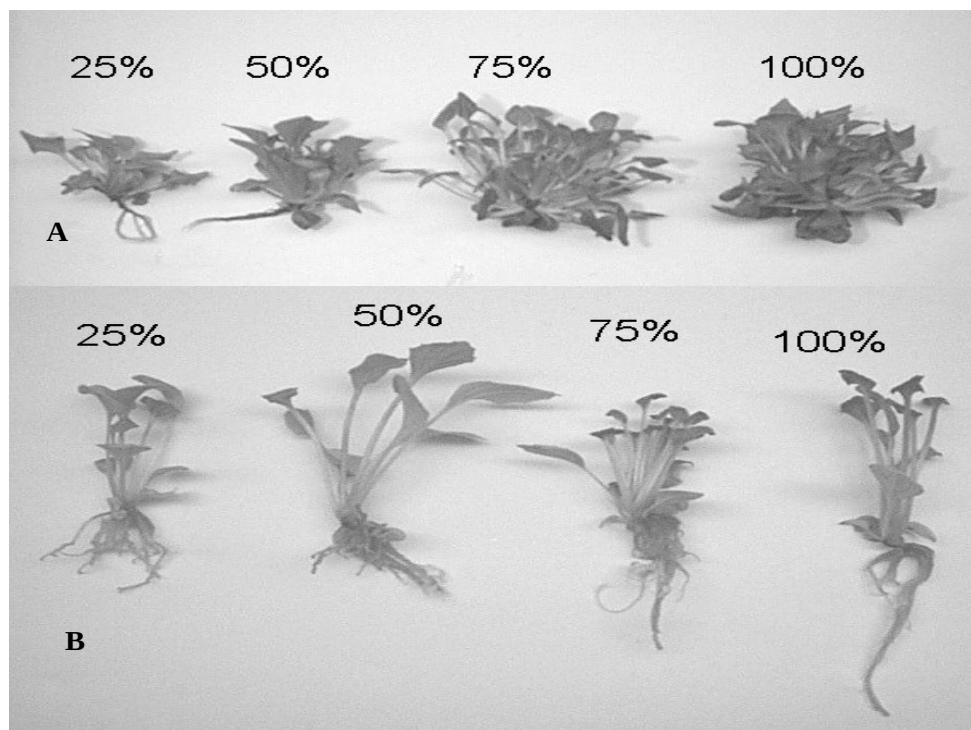


Figura 1- Efeito da concentração dos sais do meio MS (25; 50; 75 e 100%) e de dois balanços de fitorreguladores (A- MS +0,5 mg L⁻¹ de AIB + 0,5 mg L⁻¹ de BAP; B- MS +0,5 mg L⁻¹ de AIB) no padrão de desenvolvimento de plântulas *in vitro* de gérbera var. 'Ornela'.

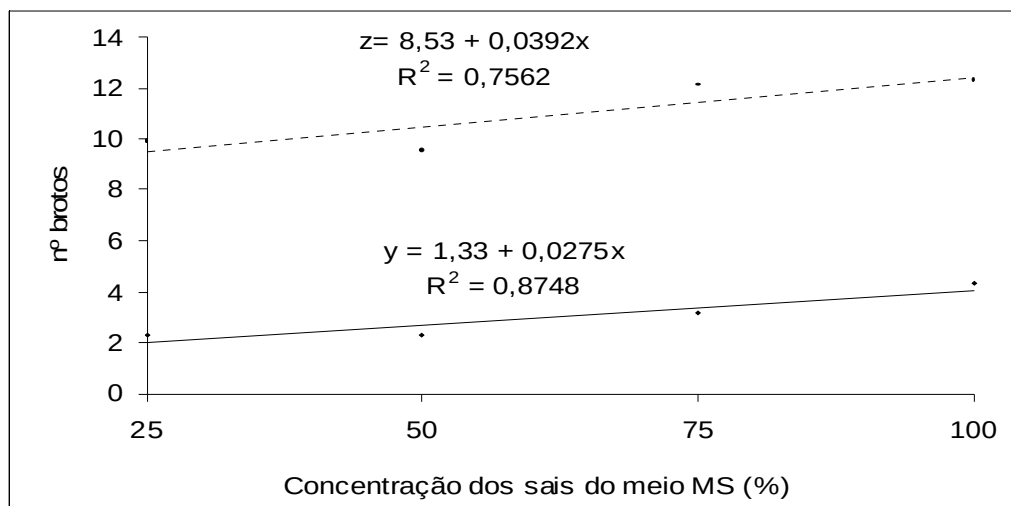


Figura 2- Efeitos da concentração dos sais do meio MS em dois balanços entre AIB e BAP na proliferação de brotos na variedade Ornela de gérbera, após oito semanas da implantação do experimento. (z= MS +0,5 mg.L⁻¹ de AIB + 0,5 mg.L⁻¹ de BAP ; y= MS +0,5 mg.L⁻¹ de AIB).

Apesar de ser comum o uso da mesma composição do meio de cultura durante todas as fases do processo da propagação *in vitro*, as exigências das culturas por macro e micro nutrientes são diferentes em cada fase. No meio de cultura com 0,5 mg.L⁻¹ de AIB, as plântulas obtidas na concentração de 50% dos sais do meio MS, apresentaram maior potencial para serem aclimatizadas, apesar de nesta concentração o número de brotos ter sido inferior às concentrações superiores (Figura 1).

Durante a multiplicação *in vitro* de gérbera, cv Appelbloesem, Barbosa et al. (1992) observaram que a redução da concentração dos sais do meio MS a 25 e 12,5% ocasionou a produção de mudas com qualidade inferior (menor vigor) quando comparadas aos tratamentos com concentrações de 100 e 50% (Barbosa et al. 1992). Para a multiplicação de samambaia *in vitro* o incremento da concentração dos sais do meio MS até 25% aumentou em até 2,6 vezes o número de brotos. Acima desta concentração houve redução para este

parâmetro (Pasqual et al. 1994).

No presente trabalho não se detectou anomalias nas plântulas mantidas nas diferentes concentrações dos sais do meio MS (Figura 1). No entanto, as plântulas obtidas no meio contendo 75 e 100% da concentração dos sais do meio MS apresentaram coloração verde mais intensa, independente do balanço de fitorreguladores (Figura 1).

A redução da concentração dos sais do meio MS ocasionou o surgimento de clorose em plântulas de *Delphinium cardinale* (flor de corte), sendo atribuído à deficiência de ferro e magnésio (Ohki & Sawaki, 1999).

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

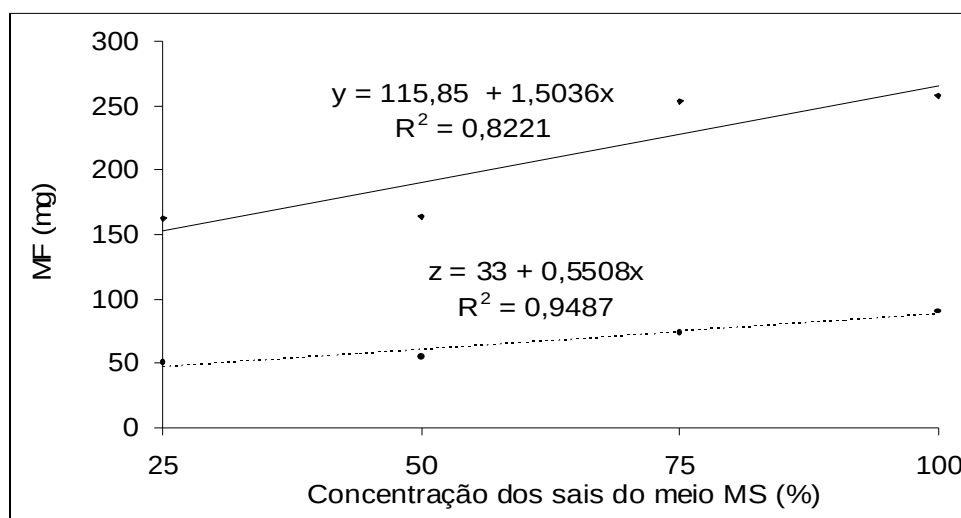


Figura 3 - Efeitos da concentração dos sais do meio MS em dois balanços entre AIB e BAP na massa fresca dos brotos de gérbera, variedade Ornela, após oito semanas da implantação do experimento. (z= MS +0,5 mg.L⁻¹ de AIB + 0,5 mg.L⁻¹ de BAP; y= MS + 0,5 mg.L⁻¹ de AIB).

Nas menores concentrações dos sais do meio MS, as plântulas apresentaram menor quantidade de massa fresca das brotações, havendo tendência de aumento de acordo com o incremento da concentração dos sais no meio (Figura 3).

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

No meio com 0,5 mg.L⁻¹ AIB, o acúmulo de massa seca nas culturas apresentou tendência de redução com o incremento da concentração dos sais do meio MS. Já no meio MS com o balanço 0,5 mg.L⁻¹ AIB e 0,5

mg.L⁻¹ BAP, a resposta foi inversa, apresentando ligeira tendência de incremento no acúmulo de massa seca nas culturas. No balanço favorável à diferenciação de raízes, o acúmulo de massa seca nas plântulas foi superior ao do balanço favorável à proliferação de brotos (Figura 4).

No balanço favorável à diferenciação de raízes, o comprimento das brotações foi superior ao observado no balanço favorável à proliferação de brotos (Figura 5).

Enquanto a auxina mantém a dominância apical, as citocininas apresentam efeito contrário (Davies, 1995). Em cultura de tecidos, as auxinas normalmente são utilizadas para estimular o crescimento da parte aérea

formada (Grattapaglia & Machado, 1998; Eapen *et al.* 1998; Sudha, *et al.* 1998). Entretanto, na fase de multiplicação, concentrações excessivas de auxina podem inibir ou favorecer demasiadamente o enraizamento ou a formação de calo em detrimento da multiplicação (Grattapaglia & Machado, 1998).

No balanço favorável à proliferação de brotos, verificou-se ligeira tendência de aumento no comprimento das brotações com o incremento da concentração dos sais do meio MS, enquanto que no balanço favorável à diferenciação de raízes este efeito

não foi observado (Figura 5).

A diferenciação de raízes somente foi influenciada pelo balanço de fitorreguladores. No meio de cultura com 0,5 mg.L⁻¹ de AIB houve 100% de enraizamento, enquanto que, na presença de 0,5 mg.L⁻¹ de AIB e 0,5 mg.L⁻¹ de BAP, o máximo de enraizamento chegou a 80% no meio com 25% dos sais do meio MS. Na maior concentração dos sais (100%) houve a menor percentagem de enraizamento (Figura 6). Mesmo na presença de auxina, o incremento da concentração dos sais reduziu a percentagem de enraizamento.

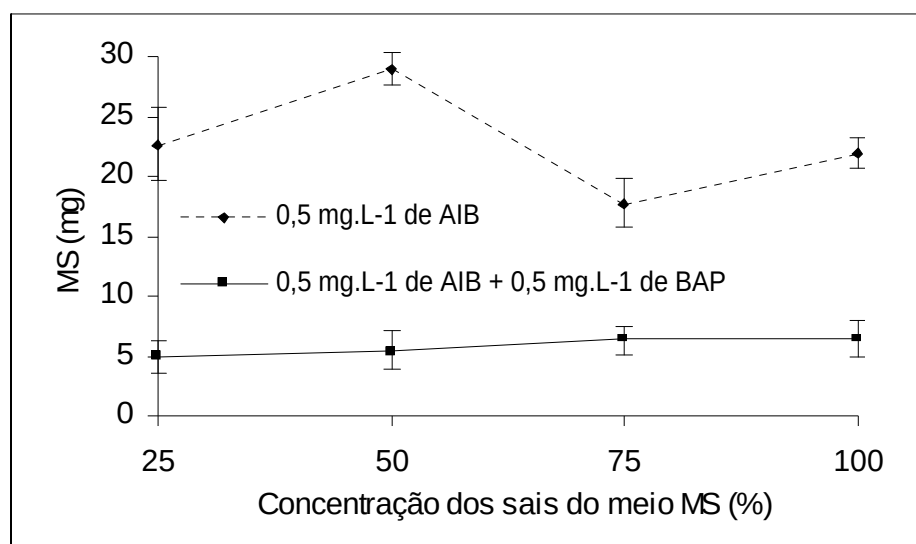


Figura 4 - Efeitos da concentração dos sais do meio MS em dois balanços entre AIB e BAP no acúmulo de massa seca em brotos de gérbera, variedade Ornella, após oito semanas da implantação do experimento

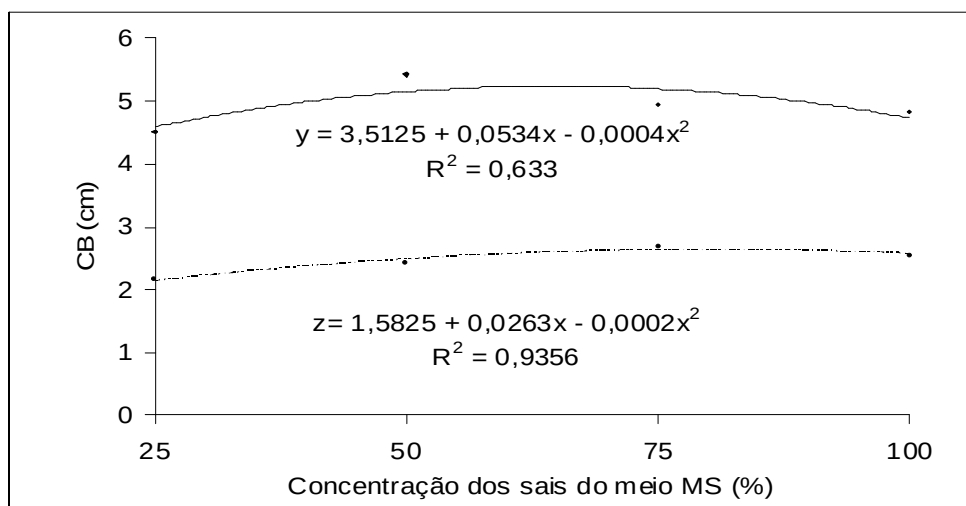


Figura 5 - Efeitos da concentração dos sais do meio MS em dois balanços entre AIB e BAP no comprimento (cm) médio de brotos de gérbera, variedade Ornella, após oito semanas da implantação do experimento. (z= MS +0,5 mg.L⁻¹ de AIB + 0,5 mg.L⁻¹ de BAP; y= MS +0,5 mg.L⁻¹ de AIB).

Grattapaglia & Machado (1998) e Villalobos & Thorpe (1991) citaram que diluições das formulações básicas do meio de cultura têm, em geral, possibilitado melhor enraizamento em culturas *in vitro*. Mesmo na presença de auxinas, altas concentrações de sais tendem a inibir todas as fases do enraizamento, particularmente a de crescimento das raízes. Observou-se que o crescimento das raízes nas concentrações de 25 e 50% dos sais do meio MS foi mais intenso (Figura 1), apesar de não ter sido avaliado o comprimento das mesmas.

Barbosa et al. (1993) verificaram que a variação na concentração dos sais não influenciou na percentagem de enraizamento de gérbera. Pierik & Segers (1973)

encontraram resultados semelhantes.

A redução pela metade da concentração dos sais do meio MS promoveu a formação de maior número de raízes em duas cultivares de morangueiro (Pereira *et al.* 1999).

O fato de ter ocorrido diferenciação celular mesmo nas concentrações mais baixa dos sais do meio MS (25%), demonstra que o balanço de fitorreguladores deve ser considerado como o principal fator para induzir a diferenciação de raízes ou a proliferação de brotos. Observações semelhantes foram reportadas por Bondarev *et al.* (2003), com relação à utilização de sais minerais e de carboidratos em culturas *in vitro* de *Stevia rebaudiana* (estévia).

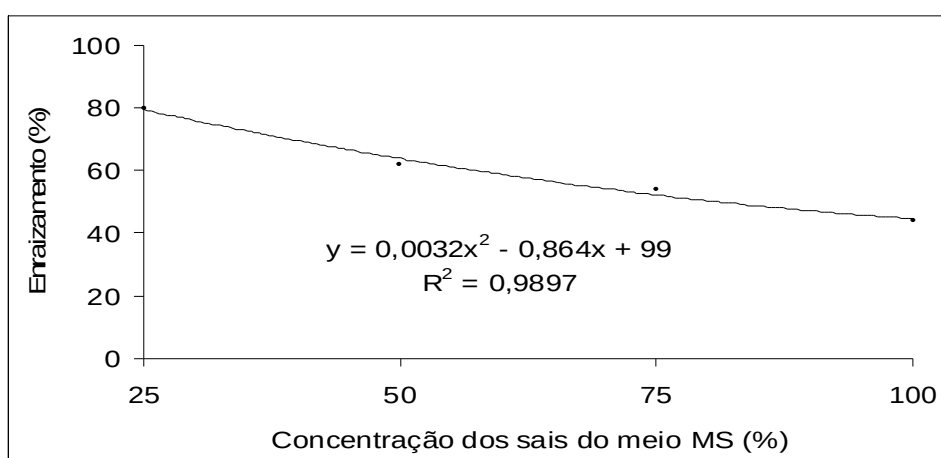


Figura 6 - Efeitos da concentração dos sais do meio MS na diferenciação de raízes em brotos de gérbera, variedade Ornela, em meio suplementado com 0,5 mg.L⁻¹ de AIB + 0,5 mg.L⁻¹ de BAP, após oito semanas da implantação do experimento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARBOSA, M. H. P.; PASQUAL, M.; PINTO, J. E. B. P.; ARELLO, E. F.; BARROS, I. Efeito de sais e ácido naftalenoacético sobre o enraizamento *in vitro* de *Gerbera jamesonii* Bolus ex Hook cv. Appelbloesen. *Ciência e Prática*, v.16, n. 1, p. 39-41, 1992.
- BARBOSA, M. H. P.; PASQUAL, M.; PINTO, J. E. B. P.; PINTO, C. A. B. P. Propagação *in vitro* de *Gerbera jamesonii* Bolus ex Hook cv. Appelbloesen: Influência da adenina, tirosina e concentrações de sais do meio MS. *Ciência e Prática*, v. 17, n. 2, p. 151-154, 1993.
- BONDAREV, N.; RESHETNYAK, O.; NOSOV, A. Effects of nutrient medium composition on development of *Stevia rebaudiana* shoots cultivated in the roller bioreactor and their production of steviol glycosides. *Plant Science*, v. 165, p. 845-850, 2003.
- BOUNAN, H., MORRIS, B. e TIEKSTRA, A. Development of new tissue culture media, using the relation between mineral composition of plant and medium. *Acta Hort. (ISHS)*, v. 560, p. 373-376, 2001.
- DAVIES, P.J. The plant hormones concept: concentration, sensitivity and transport. In: DAVIES, P. J. (Ed.) *Plant hormones: physiology, biochemistry and molecular biology*. Dordrecht, Kluwer Acad. Publi. 1995, p. 13 - 38.
- DINIZ, J. D. N.; GONÇALVES, A. N.; FERREYRA HERNANDEZ, F. F.; TORRES, A. C. Absorção de macronutrientes por explantes de bannaneira *in vitro*

- vitro. Pesquisa Agropecuária Brasileira*. v. 34, n. 7, p. 1201-1209, 1999.
- EAPEN, S.; TIVAREKAR, S. & GEORGE, L. Thidiazuron-induced shoot regeneration in pigeonpea (*Cajanus cajan* L.). *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* v.53, p.217-220, 1998.
- GRATTAPAGLIA, D. MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A.C; CALDAS, L. S. & BUSO, J. A. (Org.). *Cultura de Tecidos e Transformação de Genética de Plantas*. 1. Ed. Brasília: SPI. 1998, v.1, p.183-260.
- KRIKORIAN, A. D. Medios de cultivo: Generalidades, Composición y preparación. IN: MROGINSKI, L. ROCA, W. M.; MROGINSKI, L. A. *Cultivo tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones*. p. 41-77, 1991.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tabacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v. 15, p. 473-497, 1962.
- NAS, M. N.; READ. P. E. A hypothesis for the development of a defined tissue culture medium of higher plants and micropropagation of hazelnuts. *Scientia Horticulturae*. v. 101, n. 1-2, p. 189-200, 2004.
- OHKI, S. & SAWAKI, S. The effects of inorganic salts and growth regulators on *in vitro* shoot proliferation and leaf chlorophyll content of *Delphinium cardinale*. *Scientia Horticulturae*.v. 81, p. 149-158, 1999.
- PASQUAL, M.; HOSHIKA, E.; ISHIDA, J. S. Influência de diferentes concentrações de sacarose e sais minerais sobre a multiplicação *in vitro* de *Nephorolepis exaltata*, uma samambaia ornamental. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. v. 29, n. 11, p. 1681 - 1684, 1994.
- PEREIRA, J. E. S.; BIANCHI, V. J.; DUTRA, L. F.; FORTES, G. R. L. Enraizamento *in vitro* do morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duchesne) em diferentes concentrações do meio MS. *Ciência Rural*. v. 29, n. 1, p. 17-20, 1999.
- PIERIK, R. L.M. & SEGERS, T. A. In vitro culture of midrib explants of gerbera: adventitious root formation and callus induction. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*. Stuttgart. v. 69. p. 204-2112, 1973.
- ROUT, G.R.; SAMANTARAY S.; DAS P. *In vitro* manipulation and propagation of medicinal plants. *Biotechnology Advances*. v.18, p. 91-120, 2000.
- SATO, A. Y., PINTO, J. E. B. P., MORAIS, A. R., LAMEIRAS, O. A., CASTRO, N. E. A. Efeito de diferentes níveis de Nitrogênio, em presença ou ausência de Benzilaminopurina, na multiplicação de gérbera (*Gerbera* sp.) de vaso. *Ciênc. agrotec.*, Lavras, v. 25, n.5, p.1071-1078, set./out., 2001.
- SUDHA, C. G.; KRISHWAN, P. N., PUSHPANGADAN, P. *In vitro* propagation of *Holoestenia annulare* (Roxb.) K. Schum, a rare medicinal plant. *In vitro Cell, Dev. Biol.*, v.33, p. 57-63, 1998.
- VILLALOBOS, V. M., THORPE, T. A. Micropropagación: Conceptos, metodología y resultados. In: IN: MROGINSKI, L. ROCA, W. M.; MROGINSKI, L. A. *Cultivo tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones*. 1991, p.127- 141.

This document was created with Win2PDF available at <http://www.win2pdf.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.
This page will not be added after purchasing Win2PDF.