

ASPECTOS ANATÔMICOS DE PLANTAS DE GÉRBERA DURANTE A ACLIMATIZAÇÃO

ANATOMIC ASPECTS OF GERBERA PLANTS DURING ACCLIMATIZATION

DIOGO PEDROSA CORRÊA DA SILVA¹, PATRÍCIA DUARTE DE OLIVEIRA PAIVA², RENATO PAIVA³,
EDUARDO ALVES⁴, JORGE MARCELO PADOVANI PORTO⁵, MICHELE VALQUÍRIA DOS REIS⁶

¹Doutor em Fisiologia Vegetal - Setor de Fisiologia Vegetal - Departamento de Biologia - Universidade Federal de Lavras - 37200-000 - Lavras - MG - pedrosacorrea@yahoo.com.br

²Professora - Doutora - Departamento de Agricultura - Universidade Federal de Lavras - 37200-000 - Lavras - MG - patriciapaiva@dag.ufla.br

³Professor - PhD - Setor de Fisiologia Vegetal - Departamento de Biologia - Universidade Federal de Lavras - 37200-000 - Lavras - MG - renpaiva@dbi.ufla.br

⁴Professor - Doutor - Departamento de Fitopatologia - Universidade Federal de Lavras - Caixa Postal 37 - 37200-000 - Lavras - MG - ealves@dfp.ufla.br

⁵Doutor em Fisiologia Vegetal - Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri - Rodovia MGT 367 - Km 583 - n° 5000 - Alto da Jacuba - 39100-000 - Diamantina - MG - marcelo_pado@yahoo.com.br

⁶Doutora em Fisiologia Vegetal - Setor de Fisiologia Vegetal - Departamento de Biologia - Universidade Federal de Lavras - 37200-000 - Lavras - MG - pedrosacorrea@yahoo.com.br

RESUMO

Nos últimos anos, tem aumentado o interesse pelas gérberas (*Gerbera jamesonii*), pois, suas flores apresentam boa durabilidade e uma gama de cores que podem satisfazer aos mercados mais exigentes. A propagação, sexuada e assexuada, de gérbera apresenta uma série de problemas como desuniformidade da germinação das sementes e propagação de doenças via touceiras. Diante desses problemas, a cultura de tecidos surge como uma alternativa para a produção de mudas sadias e em larga escala. No entanto, ainda é necessário aprimorar as etapas da propagação, para tornar esse processo mais eficiente. O objetivo do presente trabalho foi analisar e caracterizar os aspectos das folhas de Gérbera em diferentes fases da aclimatização. Foram utilizadas folhas de gérberas em diferentes fases da aclimatização: antes da aclimatização, 30 dias após o início da aclimatização em sala de crescimento e plantas a pleno sol (campo). As análises foram feitas em microscópio eletrônico de varredura, em diferentes posições: face adaxial e abaxial da epiderme, e perpendicular (Crio-fratura). Os resultados demonstram que durante o processo de aclimatização, a face adaxial apresentou uma diminuição do número de estômatos alcançando a ausência em plantas em pleno sol, e na face abaxial observou-se o aparecimento de tricomas durante a aclimatização e maior organização interna em folhas aclimatizadas e levadas ao campo, demonstrando assim que a fase de aclimatização de *Gerbera jamesonii* é uma etapa de grandes mudanças para a planta.

Termos de indexação: *Gerbera jamesonii*, cultura de tecidos, microscopia de varredura.

ABSTRACT

Recently, there has been increasing interest in gerberas (*Gerbera jamesonii*), since its flowers present good durability and

a range of colors that can satisfy the most demanding markets. The propagation, sexual and asexual, of gerbera presents a number of problems such as uneven seed germination and propagation of disease via clumps. Faced with these problems, tissue culture is an alternative for the production of healthy and large-scale seedlings. However, it is still necessary to improve the steps of the propagation to turn this process more efficient. The aim of this study was to analyze and characterize the aspects of gerbera leaves in different stages of acclimatization. Gerbera leaves were used at different stages of acclimatization: before acclimatization, 30 days after acclimatization in growth room and plants in full sunlight (field). Analyses were performed using scanning electron microscope in different leaf positions: adaxial and abaxial epidermis and perpendicular (Cryo-fracture). The results showed that during the acclimatization, the adaxial face presented a decrease in the number of stomata which was absent in plants in full sunlight. In the abaxial surface the formation of trichomes was observed during acclimatization and higher internal organization in leaves acclimatized and taken to the field, showing that the acclimatization of *Gerbera jamesonii* is a step of large changes for the plant.

Index terms: *Gerbera jamesonii*, tissue culture, scanning electron microscopy.

INTRODUÇÃO

Atualmente, o agronegócio da floricultura brasileira insere-se num novo contexto social, cultural e principalmente econômico do país, e vem se mostrando em expansão devido ao ganho em qualidade, competitividade e pela sua distribuição nos diversos estados brasileiros

(Recebido em 3 de dezembro de 2014 e aprovado em 28 de maio de 2015)

(SCHMITT et al, 2014; REZENDE et al, 2008; BUAINAIN & BATALHA, 2007). Segundo Schmitt et al, (2014) a floricultura brasileira apresenta um grande potencial de atividade, tanto para o mercado interno quanto para o externo.

Nos últimos anos, tem aumentado o interesse pelas gérberas. A espécie é uma das mais importantes culturas no comércio mundial de flores, estando em quinto lugar no ranking (BHATIAA et al., 2009). Segundo Ludwig et al (2014) nos últimos anos o cultivo comercial de gérbera, tanto em vaso quanto para corte vem tornando-se de grande importância econômica para a floricultura, mas pouco conhecimento se tem sobre a melhor alternativa para a propagação comercial desta espécie.

A propagação de gérbera (*Gerbera jamesonii*) pode ser feita por via sexuada (sementes) ou por via assexuada (divisão de touceiras). Mas ambos os métodos não são recomendados para a propagação comercial, pois, suas sementes podem originar progênies desuniformes por alogamia e a técnica de divisão de touceiras tem grande problema na disseminação e acúmulo de doenças (PIERIK et al., 1975).

Diante desses problemas, a utilização da cultura de tecidos para a produção de mudas vem mostrando ser uma viável alternativa. No entanto, ainda é necessário aprimorar as etapas da propagação, para tornar esse processo mais eficiente. Dentre essas etapas destacam-se o estabelecimento do material inicial ou “explantes primários”, a otimização do meio para cultivo desse material, objetivando maiores taxas de multiplicação e o enraizamento e a posterior aclimatização das plântulas (REZENDE et al, 2008).

Durante a aclimatização, o controle da luz pode ser efetuado com a utilização de sombrite. A umidade é conservada elevada, com cobertura plástica das plantas, irrigações ou nebulizações. A nutrição pode ser feita com auxílio de soluções nutritivas balanceadas, aliada ao aumento das condições autotróficas da planta, quando a folha eleva a sua capacidade fotossintética. É importante salientar que, durante a aclimatização, além dos fatores

citados, o substrato também influencia a sobrevivência das mudas provenientes do cultivo *in vitro* (SOUZA ET AL.; 2015).

As análises ultra-estruturais, através da microscopia eletrônica de varredura, é uma técnica possível para observar as mudanças na anatômicas que ocorre durante a aclimatização, sendo uma ferramenta para o entendimento dessa fase, fornecendo maiores detalhes da morfologia interna e externa de tecidos.

Em visto do exposto, objetivo-se no presente trabalho analisar e caracterizar o aspectos das folhas de plantas de gérbera (*Gerbera jamesonii*) durante a aclimatização, a fim de fornecer subsídios para a otimização de protocolos de micropropagação.

MATERIAL E MÉTODOS

Material Vegetal

Foram utilizadas plântulas de *Gerbera jamesonii* cv. Jaguar Cream desenvolvidas *in vitro* em meio de cultura MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) com metade dos seus sais, acrescidos de 30 g L⁻¹ sacarose e solidificados com 6 g L⁻¹ de ágar, tendo o pH ajustado para 5,8 ± 0,1. Utilizaram-se frascos de vidro com 50 ml de meio de cultura. A esterilização dos meios de cultura foi feita em autoclave, à temperatura de 121°C e pressão de 1,05 kg cm⁻², durante 20 minutos.

As plantas foram inoculadas em câmara de fluxo laminar em condições estéreis e transferidas para sala de crescimento por 45 dias com fotoperíodo de 16 horas, temperatura de 25±2°C e irradiância de fótons de 43 μmol m⁻² s⁻¹.

Aclimatização

As Plântulas de *Gerbera jamesonii* desenvolvidas *in vitro* foram transferidas para tubetes contendo o substrato comercial Plantmax[®]. As plantas foram retiradas do meio de cultura e seu sistema radicular lavado em água destilada.

Após a transferência, cada tubete foi coberto com sacos plásticos para a manutenção da umidade, sendo retirados gradativamente a cada sete dias uma parte do

plástico, até a retirada total, aos 21 dias de aclimatização. As plantas foram mantidas em sala de aclimatização sob fotoperíodo de 12 horas e irradiância de fótons de $60\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Após 30 dias de aclimatização as plantas foram levadas para casa de vegetação com sombrite 50%. Aos 60 dias de aclimatizada as plantas então foram colocadas a pleno sol.

Microscopia Eletrônica

Foram utilizados como materiais vegetais folhas de Gérberas em diferentes fases da aclimatização: 30 dias em meio de cultura (zero dia de aclimatização), 30 dias após o início da aclimatização em sala de crescimento e plantas já a pleno sol (campo) com 90 dias após a aclimatização.

Amostras de folhas foram imersas em solução fixadora Karnovisk (pH 7,2) por um período mínimo de 24 h. Posteriormente, as amostras foram lavadas em tampão cacodilato por três vezes e pós-fixadas em solução aquosa de tetróxido de ósmio 1% por 4 horas em temperatura ambiente. Após este período, foram lavadas por três vezes em água destilada e em seguida desidratadas acetona (25, 50, 75, 90 e 100 % por três vezes).

Amostras das folhas destinadas a crio-fratura foram colocadas em solução fixadora Karnovisk (pH 7,2) por um período mínimo de 24 h. Posteriormente foram transferidas para glicerol por 30 minutos e depois imerso em nitrogênio líquido e sua fratura foi feita sobre uma superfície metálica resfriada com nitrogênio líquido, utilizando um bisturi e seguiu se o processo normal descrito acima.

Para análise em microscopia eletrônica de varredura, as amostras de folhas foram para o aparelho de ponto crítico para a secagem e então montado em *stubs* em diferentes posições: Face adaxial da epiderme, Face Abaxial da Epiderme e perpendicular ao *stub* (Crio-fratura). Após a montagem as amostras foram levadas ao *Sputtering* para o banho de ouro. Os espécimes foram observados no Microscópio Eletrônico de Varredura LEO Evo 40, localizado no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultra-estrutural (LME) no Departamento de Fitopatologia da UFPA.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As folhas de gérbera nas diferentes fases da aclimatização demonstraram diferenciação em sua anatomia dependendo da sua fase, constatando assim mais adaptação da planta ao ambiente onde está se desenvolvendo.

Na face adaxial da epiderme de folhas de gérbera demonstrou pequena modificação em relação a sua fase de aclimatização. Plantas cultivadas *in vitro* e plantas com 30 dias de aclimatização apresentavam pequena quantidade de estômatos. Isso pode ocorrer devido à alta umidade encontrada dentro dos frascos de meio de crescimento onde favorece trocas gasosas, e assim favorecendo o aparecimento de estômatos (Figura 1A e 1B). Enquanto que em plantas em pleno sol (campo, 90 dias após a climatização) a baixa umidade (em relação ao desenvolvimento *in vitro*) e a alta incidência de radiação tornam a face adaxial da epiderme da folha de gérbera menos favorável ao desenvolvimento de estômatos (ausência de estômatos) como demonstrado na figura 1C. Na face abaxial da epiderme observou se maior diferenciação entre as fases da aclimatização, onde na fase *in vitro* demonstrou uma grande quantidade de estômatos e a ausência de tricomas (Figura 1D). As plantas com 30 dias de aclimatização apresentaram um menor número de estômatos e presença de tricomas, como também foi observado para plantas a pleno sol (campo) (Figura 1E e 1F).

Costa et al. (2009) trabalhando com bananeira constatou uma maior formação de estômatos em plantas recém aclimatizadas e uma diminuição deste número de estômatos com o passar do tempo de aclimatização. O mesmo foi observado por Chirinéa et al; 2012 trabalhando com figo (*Ficus carica*).

Na parte interna da folha (Crio-fratura) as folhas demonstram uma organização maior a medida que aumenta se tempo de aclimatização. Plantas já estabelecidas a pleno sol (Campo) apresentaram uma maior espessura de seu limbo foliar e maior organização (Figura 2C), enquanto plantas anda em meio de cultivo apresentaram menos espessura e menor organização (Figura 2A).

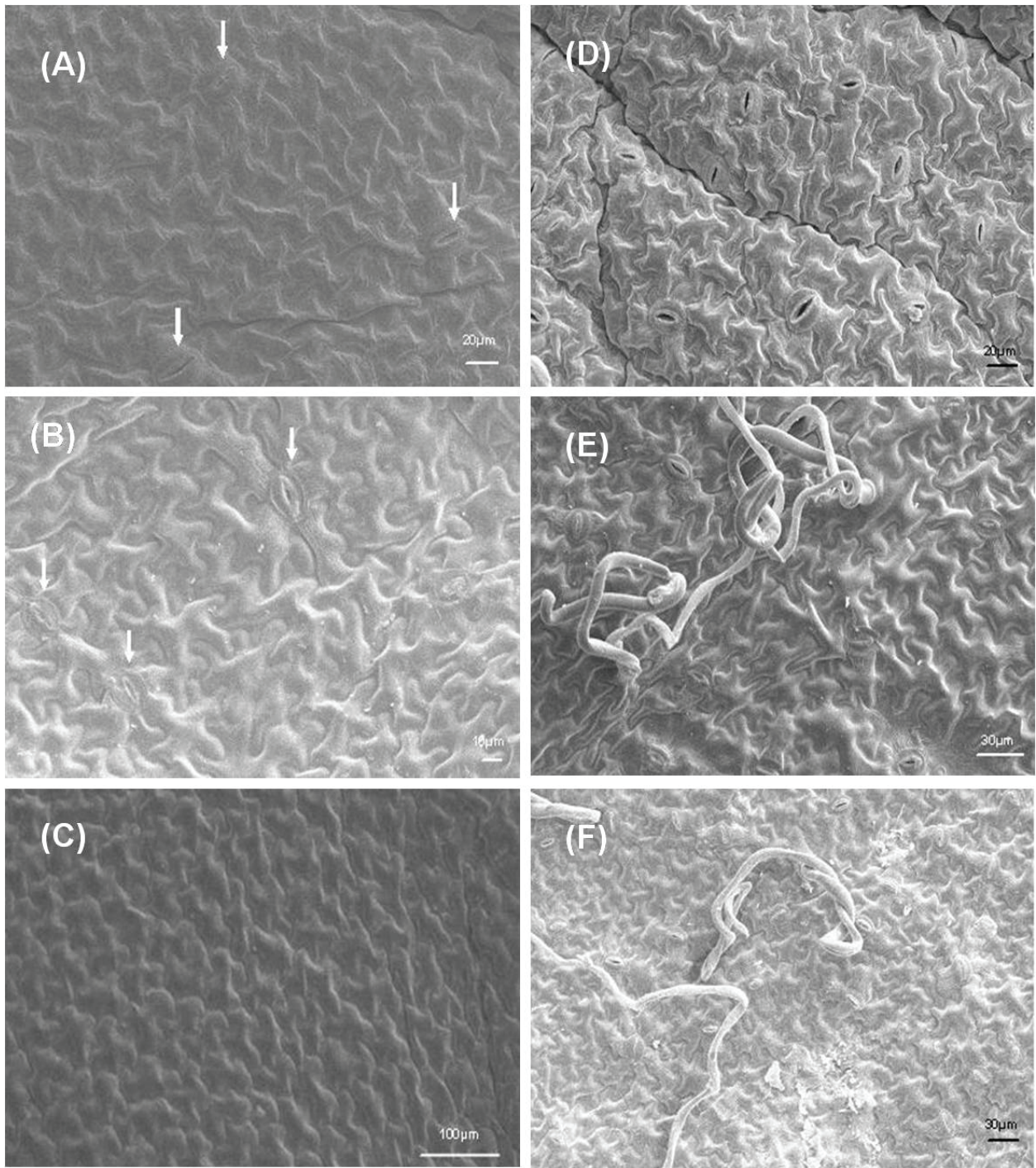


FIGURA 1 - Eletromicrografia de varredura da face adaxial (A, B e C) e da face abaxial (D, E e F) de folhas de *Gerbera jamesonii* com 30 dias de cultivo *in vitro* (A e D); com 30 dias de aclimatização em sala de crescimento (B e E) e com 90 dias em pleno sol (campo) (C e F).

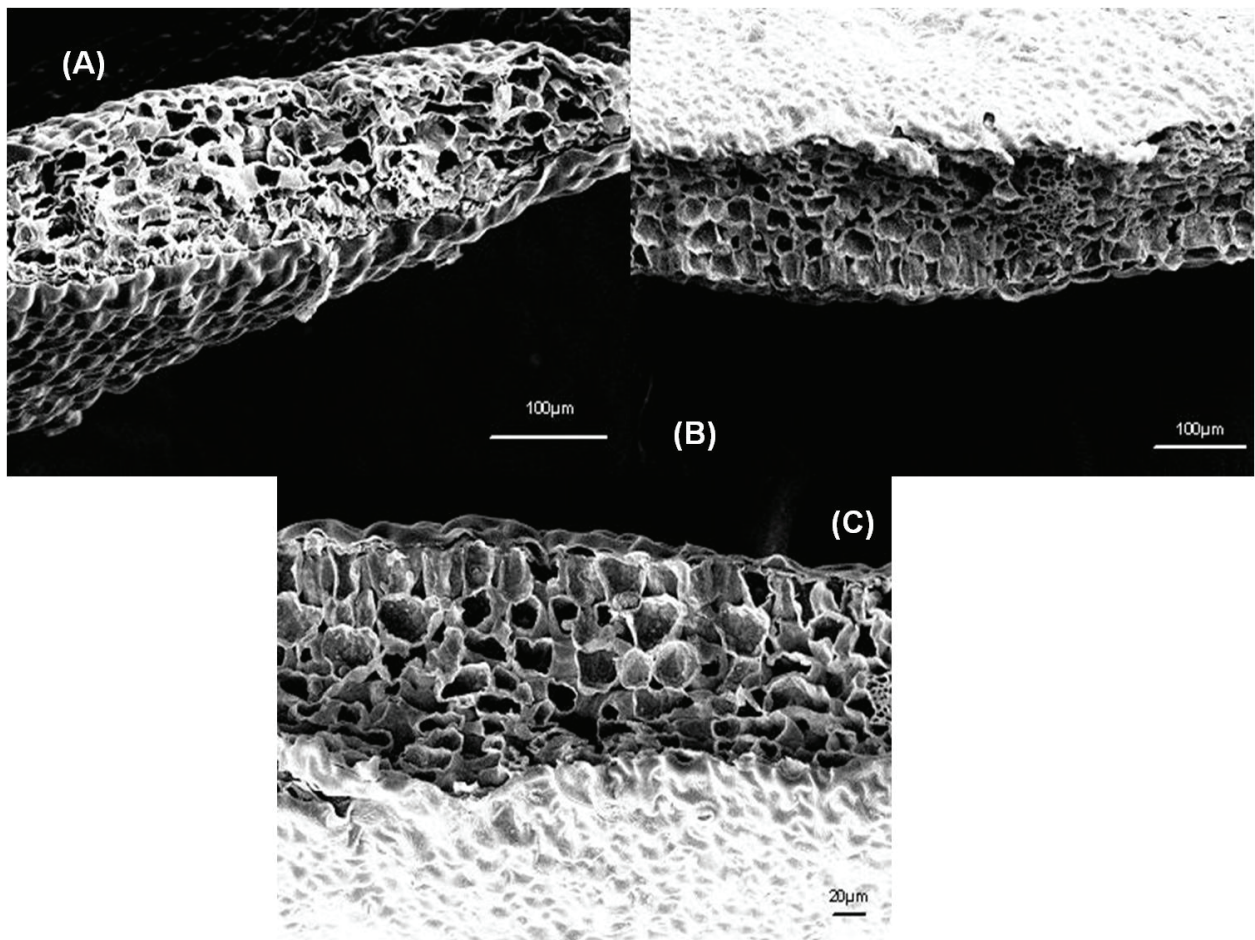


FIGURA 2 - Eletromicrografia de varredura da parte interna (Crio-Fratura) de folhas de Gérbera (*Gerbera jamesonii*) com 30 dias de cultivo *in vitro* (A); com 30 dias de aclimatização em sala de crescimento (B) e com 90 dias em pleno sol (campo) (C).

Segundo Rezende et al (2008) trabalhando também com gérbera encontraram resultados que demonstram através de Microscopia ótica resultados semelhantes ao encontrado no presente trabalho. Os autores encontraram uma diminuição da epiderme adaxial, parênquima paliçádico, parênquima esponjoso e epiderme abaxial, apresentaram espessura significativamente menor para o cultivo *in vitro*.

Em estudos anatômicos de murici-pequeno, Costa et al. (2009) também encontraram espessuras significativamente menores de epiderme adaxial, parênquima paliçádico e epiderme abaxial para o cultivo *in*

vitro, porém incremento significativo nesse tecido ocorreu apenas até os 21 dias *ex vitro*.

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

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

aclimatização, na condição *ex vitro* (REZENDE et al.; 2008).

CONCLUSÕES

O presente trabalho demonstrou o desenvolvimento das folhas durante o período de aclimatização até o campo.

Plantas a pleno sol apresentaram folhas com maior organização interna, com maior presença de tricomas e estômatos na face abaxial, e baixa concentração de estômatos na face adaxial, diferenciando assim de plantas *in vitro*.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- BHATIA, R., SINGH, K.P.; JHANGT, T.; SHARMA, R. Assessment of clonal fidelity of micropropagated gerbera plants by ISSR markers. **Science Horticulture**. 119:208-211, 2009.
- BUAINAIN, M.A.; BATALHA, M.O. **Cadeia produtiva de flores e mel**. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Secretaria de Política Agrícola, Instituto Interamericano de Cooperação para a Agricultura, 2007. 140p. (Boletim Técnico, 9).
- CHIRINÉA, C. F.; PASQUAL, M; ARAUJO, A. G.; PEREIRA, A.R.; CASTRO, E. M. Acclimatization and leaf anatomy of micropropagated fig plantlets. **Revista Brasileira de Fruticultura**. 34(4):1180-1188, 2012.
- COSTA, F. H. S.; CASTRO, E. M. PASQUAL, M; PEREIRA, J. E. S.; OLIVEIRA, C. Alterações anatômicas de bananeiras micropropagadas em resposta a aclimatização *ex vitro*. **Ciencia Rural**. 39(2):386-392, 2009.
- DEBERGH, P. C.; MAENE, L. J. A scheme for the commercial propagation of ornamental plants by tissue culture. **Scientia Horticulturae**, 14(4):335-345, 1981.
- DESJARDINS, Y.; GOSSELIN, A.; YELLE, S. Acclimatization of *ex vitro* strawberry plantlets in CO₂-enriched environments and supplementary lighting. **Journal of American Society for Horticultural Science**, 112(5):846-851, 1987.
- LIU, H.; LUO, Y.B.; LIU, Z.J. Using guided commercialized cultivation models to promote species conservation and sustainable utilization: an example from the Chinese medicinal orchids. **Biodiversity Science**. (21):132-135, 2013.
- LUDWIG, F.; FERNANDES, D. M.; GUERRERO, A. C.; BOAS, R. L. V. Características dos substratos na absorção de nutrientes e na produção de gérbera de vaso. **Horticultura Brasileira**. 32(2):184-189, 2014.
- McCOWN, B. H. Adventitious rooting of tissue cultured plants. In: DAVIS, T. D.; HAISSING, B. E.; SANKHLA, N. (Ed.). **Adventitious root formation in cuttings**. Portland: Diocorides, 1988. p.289-302.
- REZENDE; R. K. S.; PAIVA L. V.; PAIVA;R.; CHALFUN JÚNIOR, A.; TORGA, P. P.; CASTRO, E. M. de. Organogênese em capítulos florais e avaliação de características anatômicas da folha de *Gerbera jamesonii* Adlam. **Ciência e Agrotecnologia**. 32(3):821-827, 2008.
- SCHMITT, F.; MILANI, M.; DUARTE, V.; SCHAFER, G.; BENDER, R. J. Conservantes florais comerciais nas soluções de manutenção de hastes florais de gérbera de corte. **Ciência Rural**. 44(12):2124-2128, 2014.
- SOUSA, G. G.; ROSA, Y. B. C. J.; MACEDO, M. C.; SOARES, J. S. Aclimatização de *Brassavola tuberculata* com a utilização de ANA em diferentes substratos. **Horticultura Brasileira**. 33(2):208-215, 2015.
- TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; FERREIRA, A. T. Retrospectiva da cultura de tecidos de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPq, 1998. v.1, p.11-20.
- ZIMMERMAN, R. H. Micropropagation of woody plants: Post tissue culture aspects. **Acta Horticulturae**. 227:489-499, 1988.