

FITORREGULADORES NA FORMAÇÃO DE CALOS EM SEGMENTOS FOLIARES DE GERBERA (*Gerbera jamesonii*)

GROWTH REGULATORS CALOS IN TRAINING IN SEGMENTS OF LEAF GERBERA (*Gerbera jamesonii*)

RONALDO DA SILVA VIANA

Docente da UNESP - Universidade Estadual Paulista, Dracena (SP)
ronaldodsv@hotmail.com

RITA DE CASSIA ALVES NUNES

Docente da Faculdade da Alta Paulista (FADAP/FAP), Tupã (SP)
nunes.rca@gmail.com

NELSON BARBOSA MACHADO NETO

Docente da UNOESTE – Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente (SP)
nbmneto@unoeste.br

Resumo: A gébera possui características de grande interesse comercial, como produtividade, coloração vibrante e durabilidade floral. O objetivo deste trabalho foi avaliar a resposta dos fitorreguladores na formação de calos em segmentos foliares de gébera. Foram coletadas folhas completamente expandidas retiradas das plantas de *Gerbera jamesonii* cv. Cherry desinfetadas, seccionadas em fragmentos de aproximadamente 1 cm² e inoculadas em meio de cultura MS em combinação fatorial 5x5 de reguladores de crescimento: benzilaminopurina-BAP (0,0; 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 mg L⁻¹) e ácido β-naphtoxy-acético-NOA (0,0; 0,25; 0,5; 1,0 e 2,0 mg L⁻¹). As avaliações dos calos foram realizadas em dois períodos distintos, aos 30 e 60 dias observando o crescimento, coloração e friabilidade. Os segmentos foliares de gébera mostram-se excelente fonte para indução de calogênese e são dependentes de NOA para a formação de calos. As melhores combinações de fitorreguladores de crescimento para obtenção de calos friáveis foram 1,0/0,25 mg L⁻¹ de BAP/NOA. Há um incremento na atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD) quando utilizada várias combinações de BAP/NOA, 60 dias após o cultivo.

Palavras-chave: cultura de tecido, hormônio, ornamental.

Abstract: The gerbera has great commercial interest features such as productivity, vibrant color and floral durability. The objective of this study was to evaluate the response of plant growth regulators on callus formation in leaf segments of gerbera. The fully expanded leaves were removed from the *Gerbera jamesonii* cv. Cherry grown in pots, disinfected, sectioned into pieces of about 1 cm² and inoculated in MS medium in factorial combination 5x5 growth regulators: benzylaminopurine-BAP (0.0, 0.5, 1.0, 2.0 and 4.0 mg L⁻¹) and β-naphtoxy-NOA-acetic acid (0.0; 0.25; 0.5; 1.0 and 2.0 mg L⁻¹). Calluses were evaluated in two periods, 30 and 60 days observing the growth, color and friable. The best combinations of growth phyto regulators to obtain friable calluses were 1.0/0.25 mg L⁻¹ BAP/NOA. There is an increase in the enzymatic activity of superoxide dismutase (SOD) when used in various combinations of plant growth regulators 60 days after cultivation.

Keywords: tissue culture, hormones, ornamental.

INTRODUÇÃO

A popularidade da gébera vem crescendo muito. Nos últimos anos, ela alcançou um lugar privilegiado, destacando-se entre as cinco variedades de flores mais cultivadas na Holanda. Sua popularidade também aumentou no mundo inteiro e está logo atrás de outras flores mais tradicionais, tais como a rosa e o cravo segundo Severino, (2007). A gébera pode

ser cultivada em vários tipos de clima e em qualquer região do mundo. As principais áreas de produção se encontram na Holanda, Itália, Alemanha, França e Califórnia.

A gérbera (*Gerbera jamensonii*, *Asteraceae*) é uma planta semi-perene, 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.

As plantas têm várias maneiras de reproduzirem-se com a ajuda do homem as possibilidades aumentam. Um destes é a reprodução sexuada que permite uma grande vantagem seletiva. A diversidade genética pode ser vantajosa à população quando o ambiente é modificado ou quando a população se expande para novos ambientes. A adaptabilidade resultante da diversidade genética é a principal vantagem deste tipo de reprodução Purves *et al.*, (2005).

Outra vantagem é a reprodução assexuada, conhecida como vegetativa, a qual resulta em progênie idêntica ao parental. Em agricultura os pesquisadores desenvolveram outros métodos de reprodução assexuada por manipulação de plantas como o corte de caules, folhas e raízes; estes por sua vez também são órgãos vegetativos que se diferenciam das flores e da parte reprodutiva da planta, esta modificação de um órgão vegetativo é que torna possível a reprodução vegetativa Raven *et al.*, (2006).

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. Particularmente na área de plantas ornamentais onde predominam plantas híbridas, a clonagem de matrizes selecionadas tem permitido a uniformização de época de floração, coloração, diâmetro e forma das flores.

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

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 convencional.

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⁻¹ para ambos.

O ácido β-naftoxy-acético que pode estimular ou inibir o crescimento de acordo com a concentração utilizada, sua ação principal se dá nos primórdios radiculares. Sua utilização foi descrita pela primeira vez como substância de crescimento e florescimento em *Brassica* Carvalho, (2009).

Um dos aspectos mais sérios relacionados com a cultura de tecidos de algumas espécies de plantas é a oxidação do explante. Huetteman e Compton (1993) 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 desemparelhado, livre para se ligar a qualquer outro elétron e por isso, são extremamente reativas conforme relatado por Soares, (2007).

Diante disso, o objetivo do trabalho foi avaliar a resposta dos fitorreguladores na formação de calos em segmentos foliares de gérbera.

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 gérbera (*Gerbera jamensonii*, *Asteraceae*) 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. As folhas ao serem retiradas, 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 lavadas duas vezes em água destilada, mergulhadas em solução estéril de cisteína

(500mg L⁻¹): ácido ascórbico, na dose de (500mg L⁻¹), misturados na hora do uso, para evitar a oxidação dos tecidos e foram cortadas em peças de 1cm².

O meio de cultura utilizado foi MS (MURASHIGE e SKOOG, 1974) modificado, suplementado com 20g L⁻¹ de sacarose, solidificado com 2,0g L⁻¹ de Phytigel[®] e pH 5,8. Os frascos de vidro de 200 mL, contendo 50 mL de meio, foram autoclavados por 20 minutos a 121°C e 1 atm de pressão. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado instalados em fatorial 5 x 5 nas concentrações de benzilaminopurina-BAP: (0,0; 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 mg L⁻¹) e ácidos β-naphtoxy-acético-NOA: 0,0; 0,25; 0,5; 1,0 e 2,0 mg L⁻¹ com dez repetições de dois explantes por unidade experimental (Frasco de vidro).

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 dos explantes. Os fragmentos não contaminados ou oxidados foram utilizados para a incubação no meio de cultura contendo reguladores de crescimento vegetal em diferentes concentrações que constituíram os tratamentos.

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 transferidos para meio de cultura novo, com as mesmas características do anterior, e mantidos por mais 30 dias; ao final dos quais se refizeram as medidas. Os calos receberam notas quanto a coloração (1 - branco, 2 - amarelo, 3 - verde e 4 - marrom), e foram mantidos em cultura por dois períodos: 30 e 60 dias após inoculação no meio conforme Termignoni (2005).

A determinação da atividade da SOD considera a capacidade da enzima em inibir a fotorredução do NBT (azul de nitrotetrazólio cloreto). A atividade foi determinada pela adição de 50µL de extrato bruto a uma solução contendo 13mM de metionina, 75µM de NBT, 100mM de EDTA e 2µM de riboflavina em 3,0mL de tampão fosfato de potássio 5mM, pH7,8. A reação foi iniciada pela iluminação dos tubos, em câmara composta por tubos fluorescentes (X W), a 25°C. Após 15minutos de incubação, o final da catálise foi determinado pela interrupção da luz. O composto azul formado (formazana) pela fotorredução do NBT foi determinado pela leitura em espectrofotômetro a 560nm. Os tubos considerados branco para análise receberam os mesmos reagentes, porém foram mantidos cobertos com papel alumínio, portanto, abrigados da luz. Uma unidade de SOD é definida como a atividade da enzima necessária para inibição de 50% da fotorredução do NBT. Para cálculo da atividade específica da enzima, considera-se a porcentagem de inibição obtida, o volume da amostra e a concentração de proteína na amostra (µg/µL).

Cada 50% de inibição de fotorredução representa 1 unidade de SOD. 1 Unidade (U) de SOD é definida como a quantidade de enzima requerida para inibir 50% da fotorredução do NBT.

As variáveis analisadas foram coloração dos calos, o tamanho (cm) em seu maior diâmetro e a porcentagem de sobrevivência dos calos submetidos aos tratamentos. A avaliação foi feita aos 30 e 60 dias. Para a análise estatística foi utilizado o teste de Scott-Knott para comparar as médias amostrais e o software utilizado foi Copyright © 1992-2000 by GraphPad Software versão 3.05, 32 bit for Win 95/NT.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A avaliação dos explantes realizada no período de 30 dias após a inoculação inicial no meio de cultura sugerido por Murashige e skoog (1974), mostrou que 48% dos explantes formaram calos, não havendo formação de calos após os 30 dias (fig. 1). Esse resultado mostra que as injurias ocorridas nos tratamentos como oxidação e contaminação podem ter influenciado na alta taxa de mortalidade. A alta taxa de mortalidade pode está relacionada ao uso das concentrações de fitorreguladores.

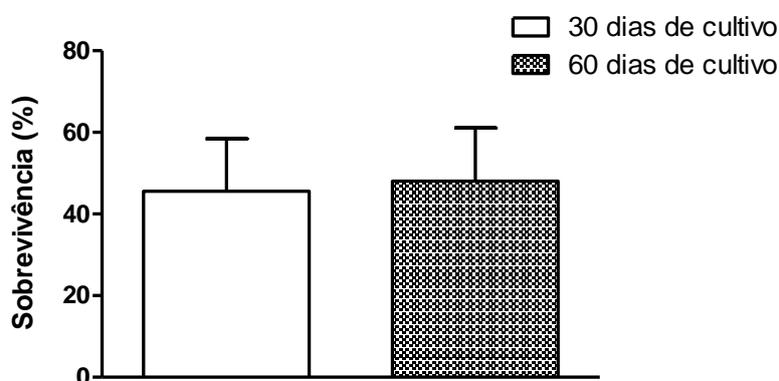


Figura 1 - Taxa de sobrevivência (%) dos calos obtidos com combinações de doses de benzilaminopurina (BAP) e ácido β -naftoxi-acético (NOA), avaliados aos 30 e ao final de 60 dias. **Organização:** Autores, 2017.

Os resultados neste trabalho são contrários aqueles encontrados por Rezende *et al.*, (2008) onde, destacaram a alta capacidade de formação de calos (76%) a partir de capítulos florais de gérbera num período de 30 dias, viabilizando posteriormente a regeneração em brotos. Observações feitas por Severin *et al.*, (2000) revelaram que quando se utilizou outras partes da planta de gérbera Santos *et al.*, (2008) como fonte de explantes o sucesso de sobrevivência foi em torno de 33%, eles utilizaram fontes de explantes como pedúnculos florais, flores linguladas, capítulos florais e ápices de rizomas. Para que aconteça o

desenvolvimento *in vitro*, é necessária a presença de fitorreguladores no meio de cultura, e este último, tem por finalidade suprir as necessidades nutricionais e minerais em cultivo *in vitro* (GRATTAPLAGLIA e MACHADO, 1998). Os fitorreguladores clássicos utilizados para propagação clonal bem como regeneração de calos são citocininas e auxinas. Barbosa *et al.*, (1993) testaram o efeito da citocinina benzilaminopurina (BAP) e a auxina ácido indole-3-acético (AIA) sobre a propagação *in vitro* de *gérbera jamesonii* Bolus e obtiveram sucesso na regeneração. Quando há balanço exógeno dos fitorreguladores na planta favorável a citocinina, verifica-se o aparecimento de gemas vegetativas, mas quando o balanço está favorável à auxina o aparecimento de raízes é notório, no entanto, mesmo quando o balanço hormonal é favorável a um ou outro, pode acontecer à diferenciação de órgãos influenciados pelo tipo hormonal não clássico (TAIZ e ZEIGER, 2004).

Na figura 2 foi avaliado o desempenho de crescimento de calo de *gérbera* na presença da auxina ácido β -naftoxi-acético (NOA), com 30 dias e aos 60 dias, observou-se a combinação desta auxina combinada com benzilaminopurina-BAP teve efeito positivo na indução e crescimento de calos em segmentos foliares de *gérbera* e o tratamento que apresentou as melhores medias ocorreu com as combinações de 1,0/0,25 mg L⁻¹ de BAP/NOA respectivamente aos 60 dias de cultivo.

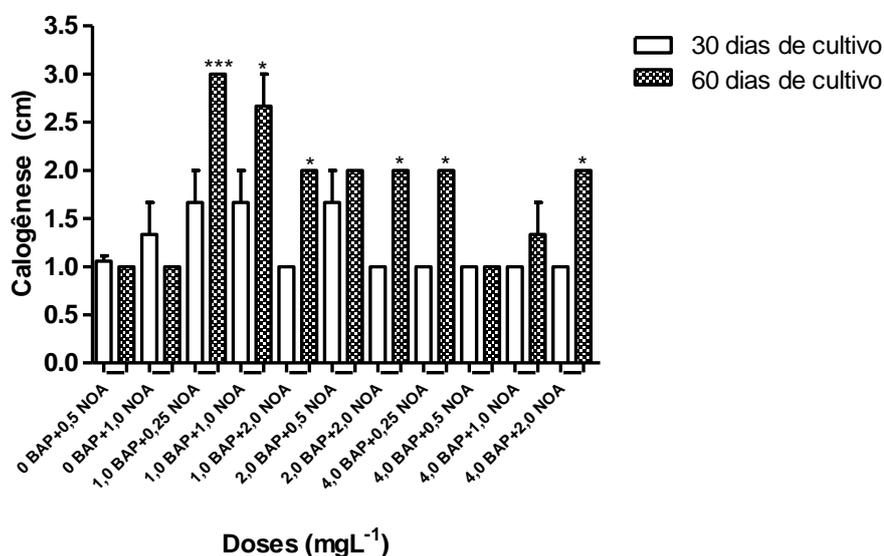


Figura 2 – Tamanho (cm) dos calos obtidos com combinações de doses de benzilaminopurina (BAP) e ácido β -naftoxi-acético (NOA), avaliados aos 30 e ao final de 60 dias (***) $p < 0,001$ e * $p < 0,01$). **Organização:** Autores, 2017.

Resultados semelhantes com esta auxina foram observados nos estudos de Silva *et al.*, (2003) onde relataram o crescimento de calos de carqueja (*Baccharis – Asteraceae*) na

presença de auxina ANA individualizada, bem como em interação com a citocinina BAP. Rezende *et al.*, 2008 e Nunes *et al.*, 2015 conseguiram calos de gérbera grandes, claros, não friáveis e não vitrificados com a utilização de ANA e BAP. 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 gérbera *sp.* combinada com BAP.

Aos 30 e 60 dias de cultivo também foi avaliada a friabilidade dos calos obtidos nas concentrações de BAP e NOA (Tab. 1), observou-se que a combinação desta auxina com BAP teve efeito positivo na indução, crescimento e friabilidade dos calos de gérbera. 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 esverdeada e textura friável.

Tabela 1 – Friabilidade e coloração dos calos obtidos com combinações de doses de benzilaminopurina (BAP) e ácido β -naftoxi-acético (NOA), avaliados aos 30 dias e 60 dias. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade.

Meio Básico	Tratamento		Coloração		Friabilidade		
	BAP	NOA	30	60	30	60	
	(mg L ⁻¹)		dias		dias		
	0	0	0	0	0	0	
		0,25	0	0	0	0	
		0,5	3.83 ^c	3.50 ^d	2,00 ^b	1,00 ^c	
		1,0	3.00 ^b	1.50 ^d	1,00 ^c	1,00 ^c	
		2,0	0	0	0	0	
	0,5	0	0	0	0	0	
		0,25	0	0	0	0	
		0,5	0	0	0	0	
		1,0	0	0	0	0	
		2,0	0	0	0	0	
	MS	1,0	0	0	0	0	0
			0,25	3.00 ^b	1.00 ^a	3,00 ^a	2,00 ^b
0,5			0	0	0	0	
1,0			4.00 ^d	3.50 ^d	3,00 ^a	2,00 ^b	
2,0			3.10 ^b	1.00 ^a	3,00 ^a	2,00 ^b	
2,0	0	0	0	0	0		
	0,25	0	0	0	0		
	0,5	3.00 ^b	3.50 ^d	3,00 ^a	2,00 ^b		
	1,0	0	0	0	0		
	2,0	2.50 ^a	2.50 ^c	3,00 ^a	2,00 ^b		
4,0	0	0	0	0	0		
	0,25	4.00 ^d	1.00 ^a	3,00 ^a	2,00 ^b		
	0,5	4.00 ^d	1.00 ^a	3,00 ^a	2,00 ^b		
	1,0	3.00 ^b	1.00 ^a	3,00 ^a	2,00 ^b		
	2,0	3.00 ^b	1.00 ^a	3,00 ^a	2,00 ^b		
CV (%)			4,43		1,62		

Ao item friabilidade foram atribuídas notas de acordo com os critérios: 1 não friável, 2 intermediário e 3 friável. Ao item coloração foram atribuídas notas de acordo com os critérios: 1 branco, 2 amarelo, 3 verde e 4 marrom.

Organização: Autores, 2017.

Os resultados deste trabalho corrobora com Trevizan *et al.*, (2011), que verificaram em estudos realizados com eucalipto (*Eucalyptus urophylla* S. T. Blake) que as estruturas apresentaram friabilidade dos calos aos 21 dias de cultivo, enquanto que aos cultivos de 31 dias, a formação de estruturas friáveis foi comprometida pela oxidação.

Santos *et al.*, (2005), conseguiram obter calos friáveis de *Salix* (*Salix humboldtiana* Willd) com a combinação de BAP e ANA em doses baixas. Os mesmos efeitos positivos foram observados por Landa *et al.*, (2000) e Nunes, et al., 2015 que obtiveram calos friáveis de pequiheiro (*Caryocar brasiliense* Camb.) e gerbera respectivamente. Santos *et al.*, (2008) obtiveram calos friáveis com tratamento contendo BAP em várias concentrações.

Os calos obtidos a partir de explantes de segmentos foliares de gerbera contendo em meio de cultura, também apresentaram coloração que variava do branco ao marrom, passando pelo verde (Tab. 1). Os resultados demonstram que o tratamento com as melhores media ocorreram com as diversas concentrações de NOA aos 30 de cultivo. Isso demonstra que esta auxina tem a capacidade de produzir calos de predomínio marrom e aspecto friável.

Essas variações de cores também foi observada por Landa *et al.*, (2000) em *Caryocar brasiliense* Camb., por Kielse *et al.*, (2007) em angico-vermelho, Cerqueira *et al.*, (2002) em calos de erva-de-touro e por Nunes et al.; 2015 em gerbera. Calos de *P. suberosa* a partir de discos foliares (MONTEIRO *et al.*, 2000) apresentaram aspecto organogênico, com coloração amarelo-esverdeada e textura friável. Nesta espécie a formação das gemas ocorre direta ou indireta, e seus calos podem apresentar coloração esbranquiçada de textura compacta. Calos de *paraptadenia* rígida também apresentaram coloração branca e amarelada (KIELSE *et al.*, 2007). A coloração de calos de *Tridax procumbens* L., amarelado e verde-escuro, dependeu da concentração e do tipo de regulador utilizado no meio, neste caso AIB e ANA, os calos também apresentaram aspecto friável (CERQUEIRA *et al.*, 2002).

Os resultados observados na Figura 4 demonstram que houve um incremento nos valores médios da atividade enzimática do superóxido dismutase (SOD) quando utilizado a combinação dos fitorreguladores (4,0 0mg L⁻¹ + 2,00mg L⁻¹) aos 30 e 60 dias de cultivo; enquanto os menores valores da atividade enzimática da SOD foram encontrados nos tratamentos 0,0mg L⁻¹ de BAP + 0,5 mg L⁻¹ de NOA. Estes resultados corroboram com as várias pesquisas que constataram que as espécies reativas ao oxigênio levam a uma alteração no padrão de expressão de proteínas e enzimas das plantas, podendo ocorrer tanto à inibição quanto a indução da biossíntese de determinados constituintes proteicos (SOARES e MACHADO 2007). Quando o sistema de defesa induzido é ativado, ele inclui a rápida geração de espécies reativas de oxigênio, alterações em polímeros da parede celular, síntese

de metabólitos de baixo peso molecular e a produção de novas classes de proteínas relacionadas com a defesa celular. Tem sido relatado que as atividades do superóxido dismutase (SOD), peroxidase (POD), catalase (CAT) e peroxidase do ascorbato (APX) foram significativamente maiores em tecidos hiperídricos que em tecidos normais (SHEWRY e LUCAS 1997).

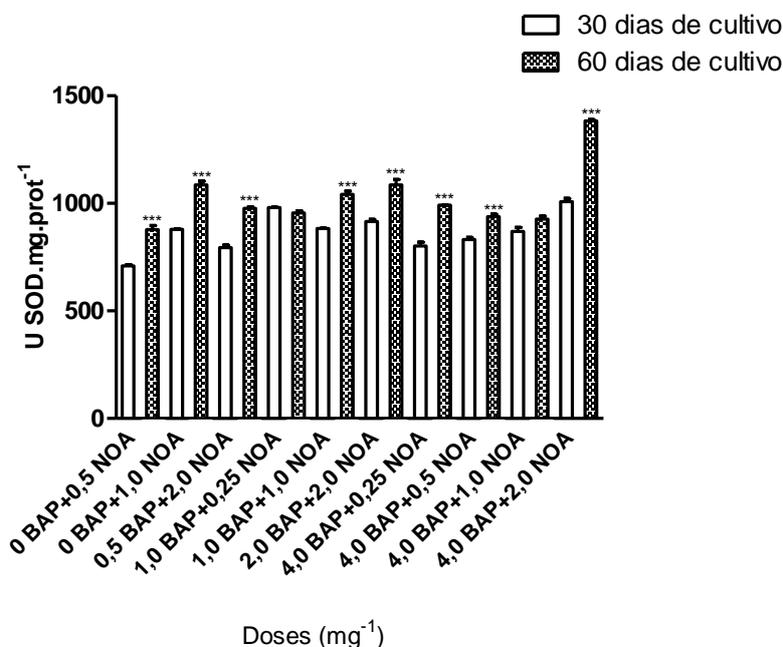


Figura 4 - Atividade da SOD em calos de gérbera avaliados aos 30 dias de cultivo e após serem submetidos a estresse hídrico aos 60 dias de cultivo (***) $p < 0,0001$). **Organização:** Autores, 2017.

Na Figura 5, observa-se os valores médios da porcentagem da atividade específica da SOD aos 30 e 60 dias de cultivo e verificou que a atividade da SOD apresentou as maiores medias aos 60 dias de cultivo.

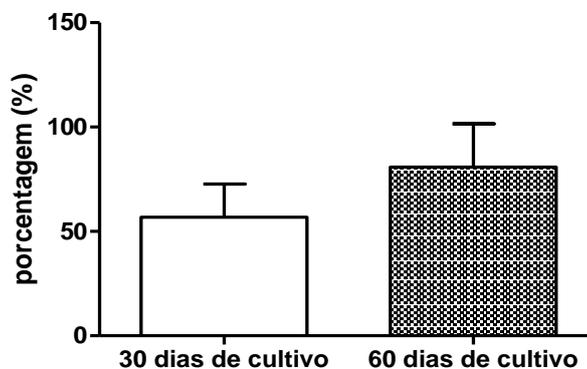


Figura 5 – Taxa (%) da atividade da SOD em calos de gérbera avaliados aos 30 dias de cultivo e submetidos a estresse hídrico aos 60 dias de cultivo (30 dias de cultivo $56,84 \pm 15,81$ e 60 dias de cultivo $80,75 \pm 20,58$). **Organização:** Autores, 2017.

Estes dados estão em conformidade com Dewir et al., (2006) que observaram que as plantas possuem um complexo sistema antioxidativo constituído por enzimas e metabólitos antioxidativos que podem ser capazes de prevenir o acúmulo de espécies reativas ao oxigênio (ERO) e o estresse oxidativo (SAHER et al., 2004).

Problemas relativos à qualidade fisiológica de plantas, células, tecidos e órgãos cultivados *in vitro*, tais como hiperhidricidade, uso de fitorreguladores têm sido diagnosticados como consequência de estresse oxidativo ocasionado por diversos fatores abióticos que acarretam o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ERO). As enzimas e os metabólitos do sistema antioxidativo são bastante sensíveis às condições de estresse abiótico servindo como sinalizadoras do estresse. O melhor entendimento das bases fisiológicas e bioquímicas em relação à reação ao estresse é de grande interesse para prevenir anormalidades (CASSELLS e CURY 2001).

CONCLUSÃO

Os segmentos foliares de gérbera mostram-se excelente fonte para indução de calogênese e são dependentes de NOA para a formação de calos. As melhores combinações de fitorreguladores de crescimento para obtenção de calos friáveis foram 1,0/0,25 mg L⁻¹ de BAP/NOA. Há um incremento na atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD) quando utilizada várias combinações de BAP/NOA, 60 dias após o cultivo.

REFERÊNCIAS

- BARBOSA, M. H. P.; PASQUAL, M.; PINTO J. E. B. P.; ARELLO E. F.; BARROS, I. Efeitos da Benzilaminopurina 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, p. 36-39, 1999.
- CID, L.P.B., Suspensão celular. In: Torres, A.C., Caldas, L.S., Buso, J.A. 1998. Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Embrapa Hortaliças, Brasília, Brasil. P. 331-353.
- DEWIR, Y.H.; CHAKRABARTY, D.; ALI, M.B.; HAHNA, E.J.; PAEK, K.Y. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities of *Euphorbia millii* hyperhydric shoots. Environmental and Experimental Botany 58: 93–99. 2006.

COPYRIGHT BY GRAPHPAD SOFTWARE, Inc, All Rights Reserved. Used of this software is subject to the conditions contained on the accompanying software Licence Agreement, InStat is a registered trademark of GraphPad Software Inc. © 1992-2000.

CASSELLS, A.C.; CURY, R.F. Oxidative stress and physiological, epigenetic and genetic variability in plant tissue culture: implications for micropropagators and genetic engineers. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 64:145-157. 2001.

CERQUEIRA, E.S.; PINTO, J.E.B.P.; MORAIS, A.R.; CASTRO, N.E.A.; CARDOSO, M.G.; LAMEIRA, O.A. Indução de calos em erva-de-touro (*Tridax procumbens* L.) utilizando diferentes reguladores de crescimento e tipos de explantes. *Ciência e Agrotecnologia*, v.26, p.301-308, 2002.

CARVALHO, M. B. Atuação do ácido β -naftoxiacético, ácido indolbutírico e ácido giberélico na morfogênese de microplantas de abacaxizeiro “Gomo-de-mel”. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2009.

GRATTAPALGLIA, 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, 1998.

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.

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

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.

LANDA, F.S.L.; PAIVA, R.; PAIVA, P.D.O.; BUENO FILHO, J.S.S. Indução in vitro de calos em explantes foliares de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.). *Ciência e Agrotecnologia*, v.24, p.56-63, 2000. (Edição Especial).

NUNES, R.C.A.; VIANA, R.S.; NETO, N.B.M. Atividade enzimática da superóxido dismutase em resposta aos fitoreguladores em *Gerbera jamesonii*. *Comunicata Scientiae* v.6 n.1, p.83-89, 2015.

MURASHIGE, T.; SERPA, M.; JONES, J.B. Clonal multiplication of *Gerbera jamesonii* through tissue culture. *HortScience*, v.9, p.175-180, 1974.

MONTEIRO, A.C.B.A.; NAKAZAWA, G.T.; MENDES, B.M.J.; RODRIGUEZ, A.P.M. Regeneração in vitro de *Passiflora suberosa* a partir de discos foliares. *Scientia Agrícola*, v.57, p.571-573, 2000.

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.

PURVES, W.K.; SADAVA, D.; ORIAN, G.H.; HELLER, H.C. **Vida: a ciência da biologia** 6 ed. vol.3 Porto Alegre: Artmed, 2005.

RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. **Biologia Vegetal** 7 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

SANTOS, B.R.; PAIVA, R.; MARTINOTTO, C.; NOGUEIRA, R.C.; PAIVA, P.D.O. Indução de calos friáveis em explantes foliares de *Salix* (*Salix humboldtiana* Willd). *Ciência Rural*, v.35, p.510-514, 2005.

SANTOS, J.P.; DORNELLES, A. L. C.; PEREIRA, F. D.; OLIVEIRA, L. M. Indução de calos em sempre-viva (*Syngonanthus mucugensis* Giulietti), utilizando diferentes tipos de explantes e concentrações de BAP *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, 2008.

SAHER, S.; PIQUERAS, A.; HELLIN, E.; OLMOS, E. 2004. Hyperhydricity in micropropagated carnation shoots: the role of oxidative stress. *Physiologia Plantarum* 120: 152-161.

SEVERINO, C. A. M. **Cultivo de gerbera de corte e pote** *Gerbera jamesonii*. Rede de Tecnologia da Bahia, 2007.

SILVA, F. G.; PINTO, J. E. B. P.; SALES, J. F.; DIVINO, S. P.; BERTOLUCCI, S.K.V. Efeito da concentração de sais e fitoreguladores na indução de calos em carqueja. **Ciência e Agrotecnologia**, v.27, p.541-547, 2003.

SHEWRY, P. R.; LUCAS, J. A. Plant proteins that confer resistance to pests and pathogens. **Advances In Botanical Research Incorporating Advances In Plant Pathology** 26:135-192, 1997.

SOARES, A. M. S.; MACHADO, O. L. T. Defesa de plantas: Sinalização química e espécies reativas de oxigênio. **Revista Tropica – Ciências Agrárias e Biológicas** 1:1-10, 2007.

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

REZENDE, R. K. S.; PAIVA, L. V.; PAIVA, R.; JÚNIOR, A. C.; TORGA, P. P.; CASTRO, E. M. Organogênese em capítulos florais e avaliação de características anatômicas da folha de *Gerbera jamesonii* Adlam. **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v. 32, n. 3, June 2008 .

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3 ed. Porto Alegre, Artmed, 2004. p. 640-641.

TREVIZAM, R.; BRONDANI, G. E.; NERY, F. U.; GONÇALVES, A. N.; ALMEIDA, M. Caracterização Morfológica de calos de *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake sob concentrações de boro e cálcio. **Cerne**, Lavras, v. 17, n. 2, p. 215-222, abr./jun. 2011.

TERMIGNONI, R. R. *Cultura de Tecidos Vegetais*. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 182 p., 2005.

WU, Z., CHEN, L. J., LONG, Y. J. Analysis of ultrastructure and reactive oxygen species of hyperhydric garlic (*Allium sativum* L.) shoots. In *Vitro Cellular e Developmental Biology-Plant*. 5: 483–490, 2009.