

Clonación *in vitro* de diversos cultivares de *Gerbera jamesonii* a partir de capítulos florales

S. RADICE & P. L. MARCONI

Centro de Ecofisiología Vegetal (CEVEG-CONICET) - Serrano 669 (1414) Buenos Aires, Argentina
E-mail: sradice@mail.retina.ar

RADICE, S. & P. L. MARCONI. 1998. Clonación *in vitro* de diversos cultivares de *Gerbera jamesonii* a partir de capítulos florales. Rev. Fac. Agron., La Plata 103 (2): 111-118.

La micropropagación a partir de yemas axilares, existentes en las brácteas involucrales de los capítulos florales, fue posible para los cultivares Garlanda; Leca; Massarosa; Mira; Nisida y Sirolo de *Gerbera jamesonii*. Las secciones de capítulos florales de 1 cm de diámetro fueron cultivadas en las sales de MS reducidas a la mitad y suplementadas con sulfato de adenina, 80 mg l⁻¹; AIA 1 mg l⁻¹; BA, 2 mg l⁻¹ y sacarosa 10 g/L. Después de 30 días de cultivo, se observó la inducción de embriones somáticos y el crecimiento de las yemas axilares descriptas. Los embriones somáticos, evolucionaron hasta la etapa globular mientras que, las yemas crecidas, se subcultivaron al medio de MS con el agregado de IBA 0,05 mg l⁻¹; BA 0,75 mg l⁻¹ y GA₃ 0,1 mg l⁻¹. La etapa de multiplicación en este medio de cultivo permitió una tasa de crecimiento igual a 4-6:1 según el cv estudiado y durante 18 meses, sin observarse malformaciones. Setenta a cien por ciento de los brotes crecidos, enraizaron en el medio de MS cuando se le agregó 0,5 mg l⁻¹ de IBA. Las plantas enraizadas *in vitro*, fueron rusticadas en condiciones de invernáculo con un éxito superior al 80 %. Estas plantas no mostraron diferencias fenotípicas al llegar a la etapa adulta y las flores producidas no manifestaron diferencias morfológicas.

Palabras clave: *Gerbera jamesonii*; micropropagación; capítulos florales; embriogénesis somática, estabilidad fenotípica.

RADICE, S. & P. L. MARCONI. 1998. Micropropagation from *in vitro* capitulum culture of several *Gerbera jamesonii* cultivars. Rev. Fac. Agron., La Plata 103 (2): 111-118.

Efficient bud multiplication was obtained from different clones of Garlanda; Leca; Massarosa; Mira; Nisida and Sirolo cultivars of *Gerbera jamesonii*. Fragment of young capitulum (diameter = 1 cm) were used as primary explant to establish *in vitro* culture. Axillary buds of involucral bracts were grown after 30 days of culture, when a half strength MS salt medium with adenine sulfate, 80 mg l⁻¹; AIA 0.1 mg l⁻¹; BA 2 mg l⁻¹ and sucrose 10 g/L were used as initial medium. Somatic embryos induced were arrested to the globular stage. Highest rate of axillary shoots (4-6:1) was accomplished when explants were transferred on MS medium added with IBA 0.05 mg l⁻¹ BA 0,75 mg l⁻¹ and GA₃ 0.1 mg l⁻¹. The multiplication step was developed during 18 month and during this period, abnormality formations were not observed. Seventy to 100 percent of rooted plantlets were obtained when 0.5 mg l⁻¹ IBA were added to MS basal medium. Up to eighty percent of plantlets were successfully acclimated on greenhouses conditions and the morphology of adult plants were the same to the mothers plants. Not differences were observed when micropropagated plants flowered.

Key words: *Gerbera jamesonii*; micropropagation; capitulum explants; somatic embryogenesis, stability phenotype.

INTRODUCCIÓN

Gerbera jamesonii es una especie originaria de África del sur y Asia (Asteraceae), a partir de la cual se lograron innumerables híbridos de diversas combinaciones de colores y formas de sus pseudo corolas, que hacen muy interesante su comercialización. En Europa ocupa más de 400 Has de cultivo en invernáculo (Reynoird *et al.*, 1993), sin embargo, en Argentina, no existe aún una producción importante de flores que permita una oferta continua en el mercado de esta especie.

Su inicio a partir de semillas dificulta la obtención de flores de calidad y la multiplicación por métodos convencionales es demasiado lenta. Por tal motivo, la micropropagación ha sido ampliamente desarrollada a partir de ápices meristemáticos (Murashige *et al.*, 1974) y de trozos de capítulos florales (Pierik *et al.*, 1973; 1975, 1982; Maia *et al.*, 1983; Huang & Chu, 1985; Laliberté *et al.*, 1985).

El cultivo de ápices es muy susceptible de contaminaciones fúngicas lo cual implica tener de cada ejemplar a multiplicar, un número importante de repeticiones. Una posibilidad de propagación *in vitro* que permite conservar el ejemplar madre, es la inducción de yemas vegetativas a partir de capítulos florales. Los primeros intentos de aplicación de esta metodología fueron hechos por Pierik *et al.* (1973). Estos autores observaron que si se aislaba *in vitro* un explanto de capítulo con brácteas involucrales, se podía inducir el crecimiento de vástagos, a partir de los meristemas presentes en las axilas de dichas brácteas. Sobre la base de estos resultados, Maia *et al.* (1983); Huang & Chu (1985) y Laliberté *et al.* (1985), adaptaron esta técnica para diferentes híbridos y Meyer & van Staden (1988), para *G. aurantiaca*.

En el presente trabajo se describe una nueva técnica de multiplicación vegetativa para diversos cultivares de *G. jamesonii* adaptados a condiciones locales de cultivo, a partir de trozos de capítulos florales.

MATERIALES Y MÉTODOS

El cultivo *in vitro* se inició a partir de inflorescencias inmaduras cosechadas de plantas de *G. jamesonii* de los cultivares Garlanda; Leca; Massarosa; Mira; Nisida y Sirolo. Bajo condiciones de invernáculo, con suplemento de luz para simular día largo y temperaturas de 20 ± 5 °C, esta planta floreció en forma continua proporcionando 1 a 2 capítulos por semana. Los mismos se cosecharon y se desinfectaron con una solución de hipoclorito de sodio al 20 % durante 20 min. y bicloruro de mercurio al 0,1 % (solución acuosa) durante 10 minutos. Por último, se enjuagaron varias veces con agua estéril, manteniéndolos inmersos hasta el momento de la disección.

Los capítulos inmaduros, se seccionaron en 8-10 trozos y se sembraron en el medio de cultivo compuesto por las sales de MS reducidas a la mitad con la concentración de Fe-EDTA modificada a 1,5 X y con el agregado de (mg l^{-1}): sulfato de adenina, 80; ácido indol acético AIA, 0,1; 6-bencil adenina BA, 2 y sacarosa 10 g/L como únicos compuestos orgánicos. Para la etapa inicial, el medio de cultivo se fraccionó en tubos de 115 x 25 mm.

De cada uno de los cultivares, se seleccionaron 2 a 4 capítulos con yemas inducidas, para iniciar diferentes líneas clonales, dentro de un mismo cultivar.

Las yemas crecidas en este medio de cultivo se subcultivaron a diferentes combinaciones de reguladores del crecimiento. Sobre la base de las sales de Murashige & Skoog (1962) con el agregado de los siguientes compuestos orgánicos (mg l^{-1}): mio-inositol, 100; glicina, 2; tiamina, 0,4; azúcar 30.000 (**MSB**); con el agregado de 0,1 mg l^{-1} de AIA + 1 mg l^{-1} de BAP (**GF1**); 0,1 mg l^{-1} de AIA + 2 mg l^{-1} de BAP (**GF2**); 0,05 mg l^{-1} de ácido indol butírico (**IBA**) + 0,75 mg l^{-1} de BAP + 0,1 mg l^{-1} de ácido giberélico (**GA₃**) (**Gm**). Como medio de cultivo testigo, se empleó el medio de Murashige *et al.* (1974) (**MSm**), empleado en la etapa de multiplicación de ápices caulinares de *Gerbera*.

Para el enraizamiento de los brotes, se empleó el medio de MSB con el agregado de 1 g/L de carbón activado (**Cb**); 1 mgL⁻¹ de AIA (**AIA 1**); 0,5 mgL⁻¹ de IBA (**IBA 0,5**) o 1 mgL⁻¹ IBA (**IBA 1**).

Para la fase inicial, los explantos sembrados se mantuvieron en condiciones de oscuridad sólo durante los primeros 15 días. Para las siguientes etapas se usó un fotoperíodo de 16 h. Las condiciones de cultivo fueron de 24 ± 1 °C de temperatura durante todo el período de cultivo *in vitro*.

Para las etapas de multiplicación y enraizamiento, los medios de cultivo se fraccionaron en frascos de 350 ml de capacidad. La unidad muestral fue un frasco con 5 yemas y cada tratamiento contó con 10 repeticiones.

Durante la etapa de inducción, se fijaron diversos explantos en FAA para luego hacer cortes histológicos de 10 µm. Los preparados se tiñeron con safranina fast green para estudiar el origen del material micropropagado.

La rusticación de las plantas se hizo en condiciones de invernáculo con riego intermitente regulado según la evaporación de la superficie foliar, durante los primeros quince días de trasplante. A partir de allí, se disminuyó en forma gradual hasta los 30 días de cultivo que recibieron el mismo tratamiento que las plantas crecidas en invernáculo. El sustrato empleado fue una mezcla de turba y cáscara de arroz esterilizado por vapor distribuída en contenedores con alvéolos premoldeados de 5 cm³ de capacidad. El seguimiento de las flores producidas se realizó sobre parcelas de 200 plantas para cada clon.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La técnica de cultivo de capítulos florales necesita de una selección cuidadosa del material a emplear, dado que la respuesta morfológica depende del grado de desarrollo de la inflorescencia. Según se muestra en la Tabla 1, el tamaño óptimo de capítulo oscila entre 0,5

y 1 cm de diámetro. Los más pequeños, se perdieron por mayor contaminación y oxidación de los trozos sembrados, mientras que los de mayor tamaño, formaron un callo que al tiempo se oxidó o favoreció el crecimiento de las piezas florales del capítulo.

El seguimiento histológico del capítulo floral muestra que existe al momento de la siembra, zonas de actividad meristemática en las axilas de las brácteas involucrales (Fig. 1).

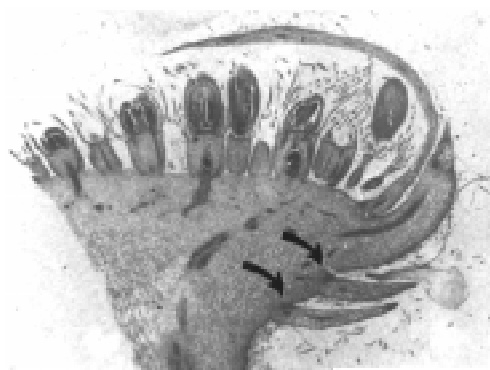


Figura 1. Corte longitudinal de un capítulo floral de *G. jamesonii* de 1 cm de diámetro. Las flechas señalan las zonas meristemáticas situadas en las axilas de las brácteas involucrales. Aumento = 8 X.

Longitudinal section of *G. jamesonii*'s young capitulum (diameter = 1 cm). Arrows key show meristematic areas in the involucral bract axils. 8X.

Durante la etapa de iniciación, se observó el crecimiento de las mismas, como así también, la neoformación de embriones somáticos (Fig. 2). Estos se originaron en la cara adaxial de las brácteas florales y se manifestaron como estructuras globulares hialinas que no pasaron de la etapa globular (Fig. 3).

Durante la etapa de iniciación, el mantenimiento de los explantos en condiciones de oscuridad o luz, mostró algunas diferencias en los resultados. Tal como lo señalaran Pierik *et al.* (1973), el pretratamiento con oscuridad disminuyó la pérdida de explantos por oxidación.

Tabla 1. Respuestas morfogénicas observadas en secciones de capítulos de *Gerbera jamesonii* cultivados *in vitro* según el tamaño medido en el momento de la siembra, expresadas en porcentaje.

Morphogenetic response observed on *in vitro* cultured capitulum sections of *Gerbera jamesonii* with different size at the initial step Results were expressed as percentage.

Inducción	Diámetro de capítulo cosechado (cm).					
	< 0,5		0,5-1		>1	
	Luz	Osc.	Luz	Osc.	Luz	Osc.
Callo (30 días)	0	0	70a	90a	54 b	50 b
Yemas (90 días)	0	0	20a	55 b	10a	14a
Pérdidas por Contaminación	75 b	50 b	10a	10a	28a	25a

Letras diferentes entre valores de una misma línea señalan diferencias significativas para un P < 0,05.

Vallues followed by different letters were significant difference at P < 0.05.

Si bien no se observaron diferencias en la formación de callo, el crecimiento posterior de yemas, fue significativamente mayor en

aquellas secciones de capítulos que se mantuvieron en oscuridad (55 %) durante las primeras semanas de cultivo (Tabla 1).

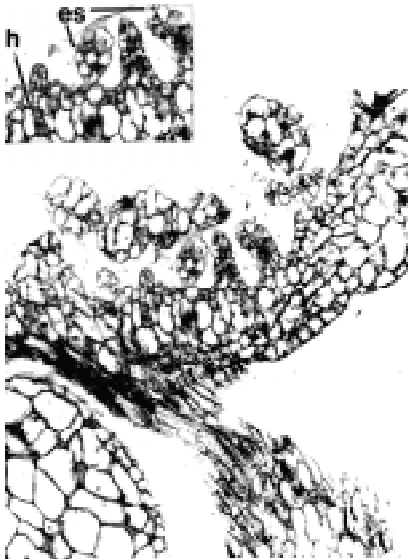


Figura 2. Detalle de inicio de embriones somáticos crecidos sobre la cara adaxial de una bráctea. **es**, embrión somático; **h**, haustorio. Aumento = 160 X.

Somatic embryos growing on adaxial face of involucre bract. **es**, somatic embryos; **h**, haustorium. 160 X.

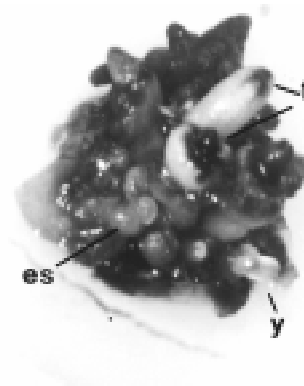


Figura 3. Explanto crecido en el medio de MS modificado después de 30 días de cultivo. **es**, embrión somático; **f**, piezas florales; **y**, inicio de yema. Aumento = 8 X.

Growing explant on MS medium modifeid after 30 days of culture. **es**, somatic embryos; **f**, floral pieces; **y**, initial bud. 8 X.

Tabla 2. Enraizamiento de brotes de los cultivares y clones de Massarosa; Mira; Nisida; Sirolo; Leca y, Garlanda de *Gerbera jamesonii* cultivados en MSB con el agregado de 1 g/L de carbón activado (**Cb**); 0,5 o 1 mg^l⁻¹ de IBA (**IBA 0,5** or **IBA 1**), o 1 mg^l⁻¹ de AIA (**AIA 1**). Los resultados se expresan en porcentaje.

Rooted plantlets of different cultivar Massarosa; Mira; Nisida; Sirolo; Leca, Garlanda and their clones of *Gerbera jamesonii* on the MSB with activated charcoal, 1 g/L (**Cb**); IBA, 0.5 or 1 mg^l⁻¹ (**IBA 0.5** or **IBA 1**), or AIA, 1 mg^l⁻¹ (**AIA 1**). Results were expressed as percentage.

Cultivares de <i>Gerbera jamesonii</i>				
Massarosa				
Clones	Cb	IBA 0,5	AIA 1	IBA 1
4	90 a	100 a	82 a	92 a
5	86,6 a	93 a	84 a	85 a
Mira				
	Cb	IBA 0,5	AIA 1	IBA 1
3	80 a *	80 a	61 a	73 a
5	60 a *	73 a	66 a	57 a
9	60 a *	70 a	63 a	43 b
Nisida				
	Cb	IBA 0,5	AIA 1	IBA 1
3	100 a	87 a	63 b	99 a
5	95 a	100 a	72 b	87 a
Sirolo				
	Cb	IBA 0,5	AIA 1	IBA 1
2	82 a	87 a	94 a	92 a
5	85 a	93 a	92 a	93 a
7	84 a	85 a	80 a	96 a
Leca				
	Cb	IBA 0,5	AIA 1	IBA 1
6	100 a *	100 a	94 a	99 a
Garlanda				
	Cb	IBA 0,5	AIA 1	IBA 1
6	67 a *	90 a	81 a	81 a

Los valores registrados para un mismo cultivar que llevan letras iguales no han manifestado diferencias significativas para P < 0,05. Los porcentajes señalados con el signo (*) significa que las raíces crecidas fueron muy finas y quebradizas.

Different letters between values of the same cultivar show significant difference at P < 0.05. Values noted with (*) manifested plantlets with fines and fragile roots.



Figura 4. Yemas crecidas en el medio de iniciación después de 60 días de cultivo. Aumento = 8 X.

Grown buds after 60 days of culture on the initial medium. 8X.



Figura 5. Plantas enraizadas en condiciones *in vitro*. Barra = 1 cm.

Rooted plants in *in vitro* conditions. Bar = 1 cm.

Los explantos no oxidados con esbozos de yemas crecidas, se subcultivaron a diferentes medios de cultivo con diversas combinaciones de reguladores del crecimiento (Fig 4). Después de 30 días de permanencia de los explantos en cada uno de los medios de cultivo descritos, se contó el número de yemas crecidas mayores de 0,5 cm y con un primordio expandido como mínimo. En los medios de cultivo denominados **GF1** y **GF2** los explantos crecieron muy poco, observándose un incremento variable entre 1,25 y 1,5 de yemas multiplicadas por yema sembrada. El empleo del medio de cultivo **Msm**, promovió la formación de numerosas yemas (4-6), pero más del 60 % de las mismas se descartaron por vitrescentes. El aumento considerable en la concentración de citocininas, pudo ser una de las causas de esta malformación tal como se observó también en cultivos de melón y clavel (Leshem *et al.*, 1988).

La combinación de 0,05 mg^l⁻¹ de IBA + 0,75 mg^l⁻¹ de BAP + 0,1 mg^l⁻¹ de GA₃ (**Gm**),

permitted the multiplication of buds with a monthly increase of 4-6:1, as well as the repeated subculture, without observing any type of anomalies. It should be noted that the differences observed in the multiplication stage between the different cultivars, coincided with what was observed in *in vivo* culture of the same. The cultivars with the highest production of cuttings in the field, showed a higher multiplication rate *in vitro*.

This method of propagation of buds, allowed the prolonged maintenance in *in vitro* conditions (18 months). In the multiplication stage not only is the number of buds increased per explant, but also the morphology of the same. The excessive axillary bud formation and adventitious buds together with repeated subcultures, could promote plants of different types and malformations (Reynold *et al.*, 1993).

The buds grown in the medium **Gm**, subcultured to different media of culture to induce the formation of roots, did not show

diferencias importantes en los resultados. Tal como se muestra en la Tabla 2, el porcentaje de brotes enraizados en los cuatro medios probados para cada clon estudiado, no mostró diferencias significativas.

El empleo de carbón activado en el medio de cultivo, promovió el crecimiento de numerosas raíces para los cultivares Mira; Leca y Garlanda. Estas raíces fueron muy finas y quebradizas por lo que imposibilitaron el pasaje a tierra de esas plantas. Por otro lado, para Nisida y Sirolo, el empleo de carbón activado promovió el crecimiento de raíces normales.

El número promedio de raíces principales crecidas por brote fue de 2 a 3, en los medios de cultivo **IBA 0,5**; **IBA 1** y **AIA 1** (Fig. 5). Estos resultados no mostraron diferencias significativas. Las yemas enraizadas de todos los cultivares estudiados, en cualquiera de los tres medios de cultivo con auxinas, se rusticaron sin inconvenientes en condiciones controladas de humedad y temperatura. Al cuarto día de trasplantadas, se observó la aparición de la primera hoja crecida en condiciones *in vivo* con una superficie muy pubescente y lámina algo recortada. A partir de la tercer hoja crecida en invernáculo, la morfología de éstas, no manifestaron diferencias con las de la planta madre, mostrando características de planta adulta.

Las plantas obtenidas por este método como así las flores producidas, aún entre los diferentes clones de un mismo cultivar, no mostraron diferencias fenotípicas con la de las plantas madres.

CONCLUSIONES

La micropropagación de *Gerbera jamesonii* a partir de capítulos florales, es posible de llevar a cabo, si se emplea un balance adecuado de reguladores del crecimiento que impida una excesiva inducción de yemas adventicias o cualquier otro tipo de malformación. La combinación de 0,05 mg l⁻¹ de IBA + 0,75

mg l⁻¹ de BAP + 0,1 mg l⁻¹ de GA₃, agregados al medio de cultivo MSB, permitió la multiplicación normal de yemas inducidas a partir de secciones de capítulos florales, durante un tiempo prolongado. Si bien se observó la inducción de embriones somáticos, éstos no germinaron en el medio de cultivo empleado. El enraizamiento de los brotes crecidos fue óptimo con el agregado de 0,5 mg l⁻¹ de IBA al medio de MS. Las plantas producidas a través de este método, no manifestaron diferencias morfológicas, después de alcanzar la etapa adulta. Las flores obtenidas a partir de las mismas, fueron idénticas a las de las plantas madres.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Lic María Mercedes Rivero y Sra. Cristina Dizeo por la colaboración técnica. Al Sr. Angel Fusaro por el trabajo fotográfico y especialmente al Dr O.H. Caso por la lectura crítica del trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

- Huang, M.C. & C.Y. Chu. 1985. A scheme for commercial multiplication of *Gerbera* (*Gerbera hybrida* Hort.) through shoot tip culture. Journal Japan Society of Horticultural Science 54: 94-100.
- Laliberté, S., L. Chrétien & J. Vieth. 1985. *In vitro* plantlet production from young capitulum explants of *Gerbera jamesonii*. HortScience 20 (1): 137-139.
- Leshem, B., E. Werker & P.D. Shalev. 1988. The effect of cytokinins on vitrification in melon and carnation. Annals of Botany 62: 271-276.
- Maia, E., D. Beck, A. Poupet & B. Bettachini. 1983. *In vitro* vegetative propagation of *Gerbera jamesonii* Bolus. Compte Rendue Academie Science Paris III 296: 885-887.
- Meyer, H.J. & J. Van Staden. 1988. The *in vitro* culture of *Gerbera aurantiaca*. Plant Cell Tissue Organ Culture 14: 25-30.
- Murashige, T. & F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15: 472-479.

- Murashige, T., M. Serpa & J.B. Jones.** 1974. Clonal Multiplication of *Gerbera* through tissue culture. HortScience, 9 3: 175-180.
- Pierik, R.L.M., H.H.M. Steegmans & J.J. Mareli.** 1973. *Gerbera* plantlets from *in vitro* cultivated capitulum explants. Scientia Horticulturae 1: 117-119.
- Pierik, R.L.M., H.H.M. Steegmans, J.A.M. Verhaegh & A.N. Wouters.** 1982. Effect of cytokinin and cultivar on shoot formation of *Gerbera jamesonii in vitro*. Netherland Journal Agricultural Science 30: 341-346.
- Pierik, R.L.M., J.L.M. Jansen, A. Maasdam & C.M. Binnendijk.** 1975. Optimalization of *Gerbera* plantlet production from excised capitulum explants. Scientia Horticulturae 3: 351-357.
- Reynoird, J.P., D. Chriqui, M. Noin, S. Brown & D. Marie.** 1993. Plant regeneration from *in vitro* leaf culture of several *Gerbera* species. Plant Cell Tissue Organ Culture 33: 203-210.