

Desinfección de capítulos florales para la propagación *in vitro* de *Gerbera jamesonii* Bolus

Flowers capitulum disinfection for *in vitro* propagation of *Gerbera jamesonii* Bolus

Y.G. Hernández González y C.Y. Paredes Niño

Laboratorio de Biotecnología de la Universidad Nacional Experimental Sur del Lago “Jesús María Semprum” (UNESUR)

Resumen

La Gerbera es uno de los cultivos de flores más importantes del mundo. Su propagación se realiza casi exclusivamente por medio de la técnica de cultivo *in vitro*, siendo la contaminación microbiana la primera barrera que limita la propagación de esta especie. Por tal razón, para establecer un método de desinfección efectivo en Gerbera, 100 capítulos florales pertenecientes a las variedades Ross Roills y Antibes, fueron lavados con jabón azul comercial y desinfectados dos veces con NaClO (20%) por 10 min. Luego, 25 capítulos florales de cada variedad se sumergieron en HgCl₂ (0,1% P/V) por 10 min (D1). El resto de los explantes se les realizó una tercera inmersión en NaClO pero al 10% V/V (D2) por 5 min. Todos los explantes se colocaron en medio semisólido (pH 5,8) compuestos por las sales de Murashige y Skoog (MS), 2 mg.L⁻¹ de bencil aminopurina (BAP), sulfato de adenina 80 mg.L⁻¹, 0,5 mg.L⁻¹ de ácido indolbutírico (AIB), sacarosa 30 g.L⁻¹ y ácido cítrico 20 mg.kg⁻¹. Para el enraizamiento de brotes se empleó un medio con la mitad de las sales de MS más con 5 mg.L⁻¹ de AIA, 20 g de sacarosa y 0,5 g de carbón activado. Las variables evaluadas fueron explantes contaminados y oxidados, número de callos, brotes y supervivencia de las plantas. La variedad Antibes fue la única que no presentó contaminación microbiana en un 40% de los capítulos florales con el método D1, generándose callos blancos friables, brotes y plantas normales. Este método de desinfección, podría considerarse como viable para la propagación *in vitro* de *Gerbera*.

Palabras clave: *Gerbera*, *in vitro*, capítulos florales, desinfección.

Abstract

Gerbera is one of the most important flower crops in the world. Its propagation is done almost exclusively through the *in vitro* culture technique, microbial contamination being the first barrier to the reproduction of this species. For this reason, to establish an effective method of disinfecting gerbera 100 flower sections belonging to varieties Antibes and Ross Roills were washed with blue commercial soap blue and disinfectants twice for 10 min with NaOCl (20%). Then, 25 capitulum for each variety were dipped into HgCl₂ (0.1% W/V) for 10 min (D1). The rest were dipped but again in NaClO for 5 min but at 10% V/V (D2). All explants were placed on solid medium (pH 5, 8) consisting of MS salts, 2 mg.L⁻¹ BAP, adenine sulfate, 80 mg.L⁻¹, 0,5 mg.L⁻¹ of AIB, sucrose 30 g.L⁻¹ and 20 ppm citric acid. The rooting of the shots was done using a medium with ½MS, 5 mg.L⁻¹ AIA, 20 g of sucrose and 0.5 g of activated charcoal. The variables studied were contaminated and oxidized explants, callus number, shoots and plant survival. The Antibes variety was the only one that did not present microbial contamination by 40% of the floral capitulum with the D1 method, generating white friable callus, shoots and normal plants. This method of disinfection could be considered as viable for *in vitro* propagation of Gerbera.

Key words: Gerbera, *in vitro*, floral capitulum, disinfection.

Introducción

La Gerbera (*Gerbera jamesonii*) es común mente conocida como Gerbera Daisy o Daisy Africana, siendo originaria de África del Sur y Asia (Asteraceae). El género *Gerbera* posee cerca de 50 especies e innumerables híbridos de diversas combinaciones de colores y formas de pseudo corolas en sus flores, por lo cual es muy cotizada para los arreglos florales en todo el mundo (Radice y Marconi, 1998). Es una especie que en Europa tiene un gran volumen de comercialización como flor de corte, siendo Holanda, el país que poseen más de 40 mil hectáreas de cultivo bajo invernadero (Severín *et al.*, 2000). La Gerbera puede ser reproducida por medio de semillas pero los cultivares obtenidos pueden ser extremadamente heterocigotos, con flores de poca cali-

Introduction

Gerbera (*Gerbera jamesonii*) is commonly known as Daisy Gerbera or African Daisu, being originally from South Africa and Asia (Asteraceae). The genre Gerbera has approximately 50 species and several hybrids of different combinations of colors and shapes of pseudo-corolla in their flowers, thus, making it very popular for flower decorations worldwide (Radice and Marconi, 1998. This specie is greatly commercialized in Europe as a cut-flower, being Holland the country with more than forty thousand hectares of crop under greenhouse conditions (Severín *et al.*, 2000). Gerbera can be reproduced by seeds, but the cultivars obtained might be extremely heterozygous, with flowers with little quality, needing a lot of time to reach to the flowering phase, thus,

dad y necesitan mucho tiempo para llegar a la etapa de floración, por lo cual dicho método de propagación es problemático y poco efectivo (Karnataka, 2008). En igual forma, los métodos de propagación a través de la división de tallos posee una rata de división muy lenta (Shagufta *et al.*, 2012). Por tal motivo a través del uso de la biotecnología, la micropropagación ha sido ampliamente desarrollada a partir de ápices meristemáticos (Murashige *et al.*, 1974), hojas (Jerzy y Lubomsky, 1991) y de trozos de capítulos florales (Pierik *et al.*, 1982; Laliberté *et al.*, 1985). El cultivo de ápices es muy susceptible de contaminaciones fúngicas, lo cual implica tener de cada variedad un número importante de repeticiones. Los explantes de hojas pueden llegar a producir de entre 12 a 15 brotes por callo en el 75% de los mismos, siendo una cantidad importante de plantas producidas (Hussein *et al.*, 2008 a; Hussein *et al.*, 2008 b). Sin embargo, la inducción de yemas vegetativas a partir de capítulos florales con brácteas involucrales, que no destruyen a las plantas madres, es la técnica de propagación masiva de esta especie mayormente empleada en los laboratorios de propagación comerciales (Huang y Chu, 1985). Para que esta técnica de micropropagación pueda tener éxito, muchos factores como el contenido del medio de cultivo, la edad del explante y las condiciones de crecimiento deben ser controladas. No obstante, aun controlando estos factores la contaminación por agentes microbianos externos e internos causa muchos problemas en el proceso de multiplicación de plantas. Mientras la desinfección de los

the propagation method is problematic and not too effective (Karnataka, 2008). Likewise, the propagation method through the stem division has a very slow division rate (Shagufta *et al.*, 2012). For that reason, using the biotechnology, the micro-propagation has been developed after meristem apexes (Murashige *et al.*, 1974), leaves (Jerzy and Lubomsky, 1991) and pieces of floral capitulum (Pierik *et al.*, 1982; Laliberté *et al.*, 1985).

The crop of apexes is very sensitive to fungal pollution, which implies having on each variety an important number of replications. The leaves explants might produce from 12 to 15 buds per callus in 75% of these, becoming an important quantity of plants produced (Hussein *et al.*, 2008a; Hussein *et al.*, 2008b). However, the induction of vegetative buds after floral capitulum with involved bracteae, that do not destroy the mother plants is the massive propagation technique mostly employed in the laboratory of commercial propagation (Huang and Chu, 1985).

In order that micro-propagation technique turns out to be successful, many factors such as the culture media, the age of the explants and the growing conditions must be controlled. Nevertheless, even when controlling all these factors, the contamination by external and internal microbial agents causes problems in the multiplication plant process. Meanwhile, the disinfection of the explants is done with chemical agents, such as sodium hypochlorite, alcohols, mercurium bioclorite, and antibiotics, among others, that might destroy the pathogen microorganisms of the tissue.

explantes se realiza a través de agentes químicos como el hipoclorito de sodio, alcoholes, bicloruro de mercurio, antibióticos entre otros, que puedan destruir a los microorganismos patógenos del tejido. Con todo, muchos de estos métodos de desinfección pueden causar reducción del crecimiento de las células y mutaciones epigenéticas indeseables (Fakhrfeshani *et al.*, 2012).

En Venezuela a pesar de que la *Gerbera* aún no está muy difundida, la demanda de esta flor de corte cada día va en significativo aumento, siendo las zonas de producción principales Bailadores en el estado Mérida y la zona Central. Para establecer un cultivo bajo invernadero, todas las plantas de esta especie deben ser importadas de Holanda y Colombia principalmente, incrementando incrementa los costos de producción. Por tal razón el siguiente trabajo tiene como objetivo principal, seleccionar un método de desinfección adecuado para optimizar un protocolo de cultivo *in vitro* en plantas de *Gerbera jamesonii* Bolus.

Materiales y métodos

Los explantes utilizados para el cultivo *in vitro* de *Gerbera jamesonii* Bolus fueron inflorescencias inmaduras o capítulos florales según lo señalado por Shagufta *et al.*, 2012. Estos capítulos fueron colectados de plantas sanas con 14 meses de edad, en plena producción de flores y cultivadas en viveros comerciales ubicados en la zona de Bailadores, Estado Mérida 71°54'38'' LO y 8°19'39'' LN, con una altitud de 1745 msnm y temperatura promedio de 17°C. Se toma-

Many of these disinfection methods might cause a reduction of the cells growth and undesirable epigenetic mutations (Fakhrfeshani *et al.*, 2012).

In Venezuela, even though *Gerbera* is not too distributed yet, the demand of this flower has had a significant increment, and the main production areas are Bailadores in Mérida state, and the Central area of the country.

In order to establish a greenhouse crop, all the plants of this specie must be mainly imported from Holland and Colombia, increasing the production costs. For this reason, this research aims to select an adequate disinfection method to optimize an *in vitro* cropping protocol in plants of *Gerbera jamesonii* Bolus.

Materials and methods

The explants used for *in vitro* crop of *Gerbera jamesonii* Bolus were immature inflorescences of floral capitulum, as mentioned by Shagufta *et al.*, 2012. These capitulum were collected from 14-month-old healthy plants in floral production and cropped in commercial nurseries located at Bailadores, Mérida state 71°54'38'' WL and 8°19'39'' NL, with an altitude of 1745 masl and average temperature of 17°C. The two most commercial varieties were taken as well as 50 floral capitulum from each, being the first variety named Ross Roills (RR) with cream petals and a dark center. The second is called Antibes (A), with partly yellow and partly red petals.

These capitulum were cut using from the base of the leaves petioles

ron las dos variedades más comerciales y 50 capítulos florales de cada una, siendo la primera variedad denominada Ross Roills (RR) con flores de pétalos color crema y centro oscuro. La segunda llamada Antibes (A), con pétalos de color mitad amarilla y mitad roja.

Estos capítulos fueron cortados con un bisturí de la base del peciolo de las hojas, de un tamaño aproximado de 0,5 a 1 cm de diámetro (Radice y Marconi, 1998) e inmediatamente sumergidos en una solución de agua destilada más cisteína al 5% P/V, trasladándolos luego al laboratorio de Biotecnología de la Universidad Nacional Experimental Sur del Lago UNESUR, Santa Bárbara de Zulia.

Desinfección de los capítulos florales

Todos los capítulos florales fueron lavados con un pincel de cerdas suaves, utilizando agua destilada y jabón azul de marca comercial (Azul de metileno) frotándolos por toda la superficie del capítulo. Después fueron enjuagados dos veces con agua destilada y sumergidos en una solución de hipoclorito de sodio (NaClO) al 20% (Shagufta *et al.*, 2012) más 5 gotas de un surfactante comercial durante 10 min. Se enjuagaron dos veces con agua destilada y se repitió la operación con NaClO a la misma concentración y tiempo, enjuagando al final con agua destilada estéril por 1 minuto. Luego los capítulos florales fueron llevados a una cámara de flujo laminar vertical y allí se continuó la desinfección pero en dos formas. En el método de desinfección uno (D1), 25 capítulos florales de cada variedad se sumergieron en

using a knife, the cuts had an approximate size of 0.5 to 1 cm of diameter (Radice and Marconi, 1998) and were immediately immersed in a distilled water solution with cysteine at 5% P/V, and later were taken to the Biotechnology Laboratory of the Experimental National University of the South of Maracaibo's Lake, UNESUR, Santa Bárbara del Zulia.

Disinfection of floral capitulum

All the floral capitulum were washed with a soft brush, using distilled water and a commercial blue soap (methylene blue), rubbing it throughout all the surface of the capitulum. Later, were soaked twice with distilled water and immersed in a solution with sodium hypochloride (NaClO) at 20% (Shagufta *et al.*, 2012) and 5 drops of a commercial surfactant for 10 min. Were washed twice with distilled water and the operation repeated with NaClO in the same concentration and time, soaking at the end with sterile distilled water for 1 minute.

The floral capitulum were washed with a vertical laminar flow chamber, where the disinfection continued into two different ways. In the disinfection method, one (D1), 25 floral capitulum of each variety were immersed in a solution of mercury bichloride ($HgCl_2$) at 0.1% P/V plus 5 drops of surfactant. These remained there for 10 minutes and were washed twice with sterile distilled water to eliminate the remnants of $HgCl_2$. Subsequently, the floral capitulum were put on a sterile solution of citric acid at 5% P/V to avoid the oxidation (Severin *et al.*, 2000).

una solución de Bicloruro de mercurio (HgCl_2) al 0,1% P/V más cinco gotas de surfactante. Allí permanecieron por 10 minutos y se lavaron dos veces con agua destilada estéril para eliminar restos del HgCl_2 . Posteriormente los capítulos florales fueron colocados en una solución estéril de ácido cítrico al 5% P/V para evitar su oxidación (Severin *et al.*, 2000).

En segundo método de desinfección (D2), a 25 capítulos florales de cada variedad se les realizó otra inmersión en NaClO comercial por cinco min pero al 10 % V/V, se enjuagaron con agua destilada estéril por un min y se dejaron finalmente en una solución de ácido cítrico a igual concentración que en la D1.

Establecimiento *in vitro* de capítulos florales de Gerbera

Una vez desinfectados, a cada capítulo floral se le eliminó con la ayuda de un bisturí, el receptáculo y las brácteas que cubrían las flores e inmediatamente el explante se colocó en un frasco de 250 mL⁻¹, con 25 mL⁻¹ de medio de iniciación compuestos por las sales de Murashige y Skoog (1962) al 100%, 2 mg.L⁻¹ de BAP, sulfato de adenina 80 mg.L⁻¹ (Radice y Marconi, 1998), 0,5 mg.L⁻¹ de ácido indolbutírico, sacarosa 30 g.L⁻¹ (Shabanpuor *et al.*, 2011), mioinositol 100 mg.L⁻¹ y ácido cítrico 20 mg.kg⁻¹, gelificado con Agarpowder® a 7 g.L⁻¹. Este medio fue llevado a un pH de 5,8 con KOH 0, N y autoclavado a 120 PSI y 121°C por 20 min.

Luego, los explantes fueron colocados durante dos semanas en oscuridad y llevados después a condiciones de alternancia fotoperiódica de 16 h luz y ocho de oscuridad a 27°C, intensidad

In the second disinfection method (D2), 25 floral capitulum of each variety were submitted to another immersion in commercial NaClO for 5 min at 10% V/V, and soaked with sterile distilled water for 1 min, and let in a citric acid solution at the same concentration of D1.

***In vitro* establishment of Gerbera floral capitulum**

Once disinfected, each floral capitulum was eliminated using a knife, the receptacle and bractee that covered the flowers and the explants were put in jars of 250 mL⁻¹, with 25 mL⁻¹ of initiation medium compound by salts of Murashige and Skoog (1962) at 100%, 2 mg.L⁻¹ of BAP, adenine sulphate 80 mg.L⁻¹ (Radice and Marconi, 1998), 0.5 mg.L⁻¹ of indolbutiric acid, sucrose 30 g.L⁻¹ (Shabanpuor *et al.*, 2011), myoinositol 100 mg. L⁻¹ and citric acid 20 mg.kg⁻¹, gellified with Agarpowder® a 7 g.L⁻¹. This medium was taken to a pH of 5.8 with KOH 0, N and autoclave at 120 PSI and 121°C for 20 min.

Later, the explants were put for two weeks in the dark, and later taken to photoperiodic alternance conditions of 16 light hours and 8 of dark at 27°C, light intensity of 120 μM.m⁻².s⁻¹. A total of 100 explants were sowed, belonging to two disinfection systems, two varieties and 50 floral capitulum per variety, transferring them every 25 days to a fresh media. In the case of evidencing buds bigger than 2.5 cm, these were taken to a ½ MS media (Mohammed and Ozzambak, 2007), with 5 mg.L⁻¹ of indolacetic acid (IA), 20 gr of sucrose, 0.5g of activated charcoal and 8 g.L⁻¹ of agar, with adjusted pH of 5.8 (Severín *et al.*, 2000)

lumínica de $120 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. En total se sembraron 100 explantes, correspondiente a los dos sistemas de desinfección, dos variedades y 50 capítulos florales por variedad, transfiriéndolos cada 25 días a medio fresco. En el caso de encontrarse brotes mayores de 2,5 cm, estos fueron pasados a un medio de MS $\frac{1}{2}$ (Mohammed y Ozzambak, 2007), con $5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de ácido indolacético (AIA), 20 g de sacarosa, 0,5 g de carbón activado y $8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de agar, con pH ajustado de 5.8 (Severín *et al.*, 2000) para inducir la formación de raíces. Las variables tomadas en consideración, fueron explantes contaminados y oxidados expresado en porcentaje, número de brotes por callo, brotes enraizados y supervivencia de las plantas. Obtenida las plantas, estas fueron sacadas de la condición *in vitro*, lavando cuidadosamente las raíces con agua corriente para eliminar restos de medio de cultivo. Posteriormente se sumergieron por 5 min en un fungicida comercial (CROPZIM 500 SC) a una concentración del 20% V/V, se sembraron luego en macetas con un sustrato húmedo, previamente desinfectado con agua caliente por 10 min, a base de 2:1 fibra de coco y cascarilla de arroz respectivamente. Por último las plantas se colocaron en una cámara húmeda hasta lograr su aclimatación.

Los valores para cada una de las variables fueron tabulados y analizados utilizando el paquete estadístico Statistycal Analysis System (SAS) 1987, bajo ambiente WINDOWS para calcular la media, valores máximos y mínimos y diferencias entre los métodos de desinfección o tratamientos aplicados.

to induce the formation of roots. The variables taken into consideration were the contaminated and polluted explants, expressed in percentage, number of buds per callus, rooted buds and survival of plants.

Once obtained the plants, these were taken out from the *in vitro* condition, washing carefully the roots with water to eliminate the rest of the crop media. Subsequently, these were immersed for 5 min in a commercial fungicide (CROPZIM 500 SC) at a concentration of 20% V/V, later were sowed in pots with a wet substrate previously disinfected with hot water for 10 min, based on 2:1 coconut fiber and rice peels, respectively. Finally, the plants were put on a wet chamber until its acclimatization.

Each of the variables were tabulated and analyzed using the Statistical Analysis System (SAS), 1987, with Windows, to measure the media, maximum and minimum values and differences among the disinfection or treatments applied.

Results and discussion

In the disinfection of both varieties of Gerbera, the treatments where the explants where exposed to HgCl_2 registered more than 50% of fungi and bacteria contamination mainly growing in the floral capitulum (table 1). The high contamination rate in this specie was due to the big quantity of pubescence present in all the plants, especially in the floral capitulum, creating an ideal place to hide spores of fungi and bacteria, which will pollute the crop media when contacting the explant (Severín *et al.*, 2000).

Resultados y discusión

En la desinfección de las dos variedades de Gerbera, los tratamientos donde los explantes no fueron expuestos al $HgCl_2$ se registró más de un 50% de contaminación por hongos y bacterias principalmente creciendo en los capítulos florales (cuadro 1). La alta tasa de contaminación en esta especie se debió a la gran cantidad de pubescencia presente en toda las plantas y en especial los capítulos florales, creándose un lugar ideal para ocultar esporas de hongos y bacterias que más adelante contaminarán los medios de cultivo al contacto con el explante (Severín *et al.*, 2000).

Lo anterior ha sido reportado en otras investigaciones donde señalan que la contaminación de los explantes

The latter has been reported in other researches where is mentioned that the explant contamination is attributed to the big quantity of pubescence present in the epidermis of the tissue (Severín *et al.*, 2000). Mercury biochloride used in D1, by being a powerful disinfecting eliminated all the microorganisms in some of the floral capitulum of the Antibes variety, developing calluses and completely normal buds.

$HgCl_2$ has also been used as succesful disinfection strategy in buds of Gerbera and along to fungicides base don Magapin (0.05%) and ethanol at 70% (Nazki *et al.*, 2012). However, the problem on using mercury biochloride as a disinfectant in explants for tissue cropping, was its high toxicity to any living cell even in very low

Cuadro 1. Propagación *in vitro* de *Gerbera jamesonii* Bolus bajo dos métodos de desinfección.

Table 1. *In vitro* propagation of *Gerbera jamesonii* Bolus under two disinfection methods.

Desinfección	Variables						
	EXCO	EXO	NBE	NHB	NRB	LB	SP
	Var. Ross Roills						
D1	28	72	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
D2	60	40	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Var. Antibes						
D1	28	32	5,16	3,8	3,0	2,68	60
D2	56	44	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

n= 25

D1=Método de desinfección 1; D2=Método de desinfección 2. EXCO= Porcentaje de explantes contaminado; EXO=Porcentaje de explantes oxidado; NBE=Número de brotes por explante; NHB=Número de hojas por brote; NRB=Número de raíces por brote; LB: Longitud de los brotes en cm; SP=Supervivencia de plantas en %.

es atribuida a la gran cantidad de pubescencia que presentan los mismos en la epidermis del tejido (Severín *et al.*, 2000). El bicloruro de mercurio utilizado en la D1, por ser un poderoso desinfectante logró eliminar completamente microorganismos en algunos de los capítulos florales de la variedad Antibes, permitiéndoles así desarrollar callos y brotes completamente normales. La utilización de $HgCl_2$ también ha sido usado como estrategia para la desinfección exitosa en brotes de Gerbera y en combinación con fungicidas a base de Megapin (0,05%) y etanol al 70% (Nazki *et al.*, 2012). Sin embargo, el problema en la utilización del bicloruro de mercurio como desinfectante en explantes para cultivo de tejidos, fue su alta toxicidad para cualquier célula viva aun en concentraciones muy bajas.

De esta forma, en la variedad Ross Roills a pesar de presentar poca contaminación, se observó una alta mortandad de los capítulos florales debido a una mayor sensibilidad al elemento mercurio que en la variedad Antibes, produciéndose un oscurecimiento grisáceo en los capítulos florales a los tres días después de colocado en el medio de cultivo. Este oscurecimiento se diferenció de la tonalidad negra típica de un tejido vegetal que presenta oxidación fenólica cuando es seccionado. Probablemente concentraciones más bajas del desinfectante, con tiempos más cortos de exposición (5 min) y un lavado adicional con agua destilada estéril, pudieran permitir una desinfección total sin afectar a las células del tejido del capítulo floral. Esto pudo observarse en la oxidación de los explantes, dado que capítulos flo-

concentrations. Thus, in the variety Ross Roills, in spite of presenting little contamination, it was observed a high death rate of floral capitulum due to a higher sensitiveness to mercury than in the variety Antibes, causing a grayish darkening in the floral capitulum within three days after introduced in the cropping media. This darkening differentiated from the typical black tone of a vegetal tissue with phenolic oxidation when is sectioned. Probably, lower concentrations of the disinfectant with shorter exposure times (5 min) and an additional wash with sterile distilled water, might produce a total disinfection without affecting the cells of the floral capitulum tissue. This was observed in the oxidation of the explants, since the floral capitulum that did not die by contamination, died by excessive oxidation (70%) of their tissues in both varieties. In Gerbera, it has been proved that an increment from 10 to 15% of sodium hypochlorite to disinfect the explants of leaves, reduced the infection in 44% but increased the death by necrosis in 37% (Shabbir *et al.*, 2012). As observed in this research, generally the explants that presented clear tissue in the center of the floral capitulum after three days under in vitro conditions and in absence of light, were the explants that probably survived and generated calluses.

According to the results of this research and for these two varieties, the use of commercial chloride to the concentration used was enough to achieve a complete disinfection of the explants.

Out of the evaluated varieties, only the variety Antibes developed

rales que no murieron por contaminación lo hicieron por excesiva oxidación (70%) de sus tejidos en ambas variedades. En Gerbera, se ha demostrado que un incremento del 10 al 15% del hipoclorito de sodio para la desinfección de explantes de hojas redujo la infección en un 44% pero aumentó la muerte por necrosis en un 37% (Shabbir *et al.*, 2012). Según lo observado en esta investigación, en general explantes que presentaban tejido claro en el centro del capítulo floral, luego de pasado tres días bajo condiciones *in vitro* y en ausencia de luz, fueron explantes que probablemente sobrevivieron y generaron callo.

Según los resultados de esta investigación y para estas dos variedades, la utilización de cloro comercial a la concentración utilizada fue insuficiente para lograr una desinfección completa de los explantes.

De las variedades evaluadas solo la variedad Antibes fue la que logró desarrollar callos y brotes en 10 de los 25 (40%) capítulos florales sembrados con el sistema de desinfección uno (D1). El tiempo transcurrido desde el establecimiento de los capítulos florales en el medio de iniciación hasta la observación de los primeros callos fue de 10 a 14 días aproximadamente. Dos tipos de callo fueron observados en la variedad Antibes, un callo friable nodular de coloración cremosa a blanca inicialmente que cambia a un color verde claro intenso, ideal para la obtención de brotes (figura 1A). Lo anterior coincide con lo reportado como callo ideal en Gerbera para la generación de brotes (Shabbir *et al.*, 2012). El otro tipo de callo fue de consistencia compacta o dura, de coloración verdosa oscura que

calluses and buds in 10 out of the 25 (40%) floral capitulum sowed with the disinfection system number one (D1). The time passed from the establishment of the floral capitulum in the middle of the initiation until observing the first calluses was from 10 to 14 days, approximately.

Two types of calluses were observed in the variety Antibes, a nodular friable callus with coloration from cream to white and later changes to an intense light green color, ideal for obtaining the buds (figure 1A). The latter agrees to the reported as ideal callus in Gerbera for generating buds (Shabbir *et al.*, 2012). The other type of callus had a more compact or tough consistency, with a dark greenish coloring that keeps, generating more callus and few buds, no matter these transport to a fresh media and free of hormonal regulators (Shabbir *et al.*, 2012).

In the variety Gerbera Antibes, the obtaining of the first buds was observed (figure 1B) after 60 days under *in vitro* conditions, separating the buds and changes to a fresh media, every 25 days. It has been reported that the variety Sciella, a sprouting 42 days after introduced the explants in the culture media (Karnataka, 2008), a lower time than the one observed in the variety Antibes. The idea sprout to be transferred to a rooting media must have a longitude superior or higher to 2.5 cm and 3.4 or more well defined leaves (figure 1C).

Other researchers suggest inducing the rooting using Gerbera sprouts with 5cm of longitude put in a media with 10 mg.L⁻¹ naphthaleneacetic

se mantiene así generando más callo y pocos brotes indiferentemente de que se traslade a un medio fresco y libre de reguladores hormonales (Shabbir *et al.*, 2012).

En la variedad de Gerbera Antibes, la obtención de los primeros brotes se observó (figura 1B) después de los 60 días bajo condiciones *in vitro*, pudiéndose realizar separación de brotes o repiques y cambios a medio fresco, cada 25 días. Se ha reportado en la variedad Sciella, inicio de brotación a los 42 días después de colocado el explante en el medio de cultivo (Karnataka, 2008), tiempo menor a lo observado en la variedad Antibes. El brote ideal para ser transferido a un medio de enraizamiento debe poseer una longitud superior o igual a los 2,5 cm y de 3, 4 o más hojas bien definidas (figura 1C). Otras investigaciones sugieren inducir el enraizamiento utilizando brotes de Gerbera con 5 cm de longitud colocados en un medio con 10 mg.L⁻¹ de ácido naftalenacético (ANA) para obtener un 80% de brotes enraizados (Shagufta *et al.*, 2012). Estas concentraciones del regulador auxínico son muy elevadas con respecto a las utilizadas (1,5 mg.L⁻¹ de ANA) en Gerbera variedad Sunglow (Shabbir *et al.*, 2012), variedad Japuir o simple amarilla (0,5 mg.L⁻¹ de AIA) (Purnima y Kothari, 2004) y en la variedad Sciella (0,5 mg.L⁻¹ de ANA) (Karnataka, 2008). Sin embargo, el número de raíces por brote obtenido en la variedad Antibes (3,0) fue mucho menor a lo obtenido en la variedad Sunglow (7,56 raíces por explante) utilizando AIA a 1,5 mg.L⁻¹ como regulador hormonal y similar (3,56 raíces por explantes)

acid (ANA) to obtain 80% of rooted sprouts (Shagufta *et al.*, 2012). These concentrations of the auxin regulator are very elevated regarding the ones used (1.5 mg.L⁻¹ of ANA) in Gerbera of the variety Sunglow (Shabbir *et al.*, 2012) Japuir or simple yellow variety (0.5 mg.L⁻¹ of AIA) (Purnima and Kothari, 2004) and the variety Sciella (0.5 mg.L⁻¹ of ANA) (Karnataka, 2008). However, the number of roots per sprout obtained in the variety Antibes (3.0) was much lower than the one obtained in the variety Sunglow (7.56 roots per explant) using AIA at 1.5 mg.L⁻¹ as a hormonal regulator and similar (3.56 roots per explants) in the same variety and concentration but using ANA (Shabbir *et al.*, 2012).

In this phase, the variety Antibes rooted 30 days after put in the rooting media (figure 1D). The latter was also reported in Gerbera but in the Sciella variety, which rooted four weeks after inoculated in the media (Karnataka, 2008). Gerbera plants, which were completely ready for its acclimatization in wet chamber, remained in these conditions for 30 days in pots with a survival percentage of 60%.

This value was lower to the reported (70 to 80%) in Gerbera coming from cell suspensions of calluses induced with 2.4-D (Kumar and Kanwar, 2014). In general, Gerbera plants might be obtained using explants of floral capitulum 125 days after their establishment under *in vitro* conditions. Gerbera is a plant with fast propagation under *in vitro* conditions, and its crop would reduce the importation of plants and the production costs of this flower in this country.

en la misma variedad y concentración pero utilizando ANA (Shabbir *et al.*, 2012).

En esta última etapa, la variedad Antibes enraizó a los 30 días de colocada en el medio de enraizamiento (figura 1D). Lo anterior también fue reportado en *Gerbera* pero en la variedad Sciella, la cual enraizó a las cuatro semanas después de inoculada en el medio (Karnataka, 2008). Plantas

Conclusion

Considering the pubescent anatomic characteristics of the explants used for the *in vitro* propagation of *Gerbera jamesonii* Bolus, the use of mercury biochloride as a disinfection agent of floral capitulum was the adequate in the Antibes variety to eliminate microorganisms that might

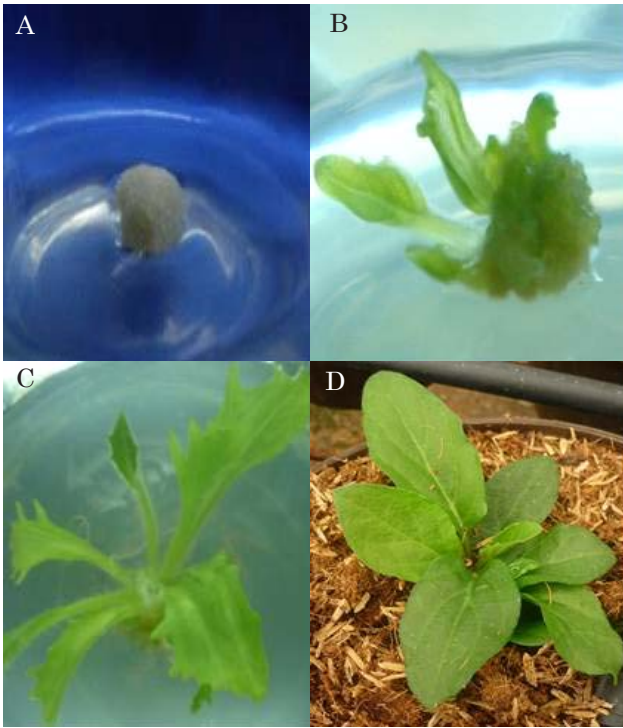


Figura 1. Propagación *in vitro* de *Gerbera jamesonii* Bolus. 1A: Callo blanco friable 1B: Callo generando brotes de *Gerbera*. 1C: Brote de *Gerbera* generando raíces y 1D: Planta de *Gerbera* variedad Antibes aclimatada.

Figure 1. In vitro propagation of *Gerbera jamesonii* Bolus. 1A: friable white callus, 1B: callus generating *Gerbera* sprouts. 1C: *Gerbera* sprout generating roots and 1D: *Gerbera* plant of the Antibes variety acclimatized.

de Gerbera completas listas para su aclimatación en cámara húmeda, permanecieron en estas condiciones por 30 días en macetas con un porcentaje de sobrevivencia del 60%. Este valor fue menor a lo reportado (70 a 80%) en Gerbera procedentes de suspensiones celulares de callos inducidos con 2,4-D (Kumar y Kanwar, 2014). En general las plantas de Gerbera pueden obtenerse usando explantes de capítulo floral después de los 125 días desde su establecimiento en condiciones *in vitro*. La Gerbera es una planta de rápida propagación bajo condiciones *in vitro* y su cultivo reduciría las importaciones de plántulas y los costos de producción de esta flor de corte en nuestro país.

Conclusión

Considerando las características anatómicas pubescente de los explantes utilizados para la propagación *in vitro* de *Gerbera jamesonii* Bolus, el uso de bicloruro de mercurio como agente de desinfección de capítulos florales, fue el adecuado en la variedad Antiibes para eliminar microorganismos que pudieran contaminar los medios de cultivo, evitando así el establecimiento en condiciones *in vitro* de esta especie de flor de corte de gran importancia comercial en nuestro país.

Literatura citada

Barbosa, M.H.P., J. Pinto, C. Pinto y R. Innecco. 1994. Propagación *in vitro* de *Gerbera jamesonii* Bolus ex Hook cv. Appelbloesem a través de capítulos jóvenes. Revista Ceres 41(236):387-394.

contaminate the culture media, avoiding the establishment *in vitro* conditions of this flower specie, with great commercial importance in this country.

End of english version

Cleiton M.S. 2008. Otimização de protocolos para a propagação *in vitro* de gerbera (*Gerbera jamesonii*). Universidade Federal Rural Do Rio De Janeiro Instituto De Agronomía. 75 p.

Huang M. y 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.

Hussein M., A. Ismail, E. Hashim, M. El-Meniawy y N. Abdallah. 2008 a. *In vitro* regeneration of gerbera. Agriculture and Forestry Research 58:97-102.

Hussein M., I. Ahmed, E. Mahmoud, M. Salah y N. Abdallah. 2008 b. *In vitro* regeneration of gerbera. Agriculture and Forestry 1/2(58):97-102.

Jerzy, M. y M. Lubomski. 1991. Adventitious shoot formation on *ex vitro* derived leaf explants of *Gerbera jamesonii*. *Scientia Horticulturae* 47:115-124.

Kanwar, J.K. y S. Kumar. 2008. *In vitro* propagation of *Gerbera* - A Review. *Horticulture Science*. (Prague) 35(1):35-44.

Karnataka J. 2008. Effect of cytokinins with auxin on proliferation of multiple shoots in gerbera (*Gerbera jamesonii* B.) var. Sciella. *Agriculture Science*. 21(4):597-599.

Laliberté, S., L. Chrétien y J. Vieth. 1985. *In vitro* plantlet production from young capitulum explants of *Gerbera jamesonii*. *Horticulture Science* 20 (1): 137-139.

- Mohammed S. y M. Ozzambak. 2007. *In vitro* formation of gerbera (*Gerbera jamesonii* Bolus) plantlets from capitulum explants. Propagation of Ornamental Plants 7(1):37-42.
- Murashige, T., M. Serpa y J. Jones. 1974. Clonal propagation of Gerbera through tissue culture *Horticulture Science*. 9:175-180.
- Nazkit I., M. Siddique, Z.A. Rather, N. Hussain y M.A. Mir. 2012. Sterilization strategies for aseptic *in vitro* establishment and survival of shoot tip explant in *Gerbera jamesonii* bolus. S.K University of Agricultural plants. 1:191-121.
- Radice S. y P.L. Marconi. 1998. Clonación *in vitro* de diversos cultivares de *Gerbera jamesonii* a partir de capitulos florales. Revista de la Facultad de Agronomía. La Plata 103(2).
- Reddy A. y M. Choudhary. 2002. Rapid plant regeneration from *Gerbera jamesonii* Bolus callus cultures. *Acta Botanical. Croat.* 61(2):0365-0588.
- SAS. Institute, INC. 1987. Statistycal Analysis system. The institute INC, Cary, NC, USA.
- Severin C., M. González y R. Murria. 2000. Micropropagación de *Gerbera* spp. A partir de diferentes explantos. Revista FAVE 14(1):67-71.
- Shabanpour K., A. Sharifi, A. Bagheri y N. Moshtaghi. 2011. Effect of genotype and culture medium on shoot regeneration and proliferation of *Gerbera jamesonii*. African Journal of Biotechnology 10(57): 12211-12217.
- Shabbir K., T. Ahmad, I. Ahmad Hafiz, A. Hussain Y N. Akhtar y J. Ahmad. 2012. *In vitro* regeneration of *Gerbera jamesonii* cv. Sunglow. African Journal of Biotechnology. 11(42):9975-9984.
- Shagusfta N., N. Fozia, A. Tariq, F. Aslam, A. Ali y M. Athar. 2012. Effect of different explants on *in vitro* propagation of gerbera (*Gerbera jamesonii*). African Journal of Biotechnology 11(37). 9048-9048.
- Silva R., L. Vilela, L. Paiva, P. Torga y E. de Castro. 2008. Capitulum organogenesis and anatomical characterization of *Gerbera jamesonii* Adlan leaves. *Ciência. agrotecnol.*, Lavras, 32(3):821-827.
- Van Son N. 2007. Response of Gerbera (*Gerbera jamesonii* Bolus) varieties to micropropagation. Department of Horticulture, University of Dharwad. Thesis.1-85.
- Vuyksteke, D.R., I. Ekanayake y R. Ortiz. 1998. Conductancia estomática de las hojas y morfología de los estomas del material genético de *Musa*. *Euphytica*. (NDL). 99(3), 211-229.
- Zabulla N., R. Taha y A. Asmah. 2008. Growth optimization and organogenesis of *Gerbera jamesonii* Bolus ex. Hook f. *in vitro*. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 11(11) 1449-1454.
- Kumar S. y J.K. Kanwar. 2014. Plant Regeneration from Callus and Cell Suspension Cultures of *Gerbera jamesonii* cv. 'Diablo. Department of Biotechnology, University of Horticulture and Forestry, Solan, India. *European Journal Horticultural Science*. 79:115-121.