

PATRÍCIA DUARTE DE OLIVEIRA

PROPAGAÇÃO "IN VITRO" DE CRISÂNTEMO
(*Dendranthema grandiflora* Tzvelev.) cv. ORANGE REAGEN

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura de Lavras, como parte das exigências do curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração em Fitotecnia, para obtenção do título de "MESTRE".

Orientador

Prof. MOACIR PASQUAL

LAVRAS

MINAS GERAIS - BRASIL

1994

Ficha Catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e Classificação da Biblioteca Central da ESAL

Oliveira, Patrícia Duarte de.

Propagação "in vitro" de crisântemo (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev.) cv. Orange Reagen / Patrícia Duarte de Oliveira. -- Lavras : ESAL, 1994.

116 p. : il.

Orientador: Moacir Pasqual.

Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura de Lavras.

Bibliografia.

1. Crisântemo - Cultura de Tecidos. 2. Crisântemo - Propagação "in vitro". I. Escola Superior de Agricultura de Lavras. II. Título.

CDD-635.93355

PATRÍCIA DUARTE DE OLIVEIRA

**PROPAGAÇÃO "IN VITRO" DE CRISÂNTEMO
(*Dendranthema grandiflora* Tzvelev.) cv. ORANGE REAGEN**

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura de Lavras, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração em Fitotecnia, para obtenção do título de "MESTRE".

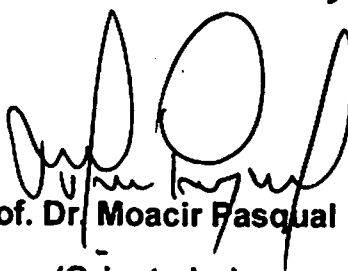
APROVADA: 30 de setembro de 1994



Prof. Dr. Amauri Alves Alvarenga



Prof. Dr. José Darlan Ramos



Prof. Dr. Moacir Fasqual
(Orientador)

À meus pais,

Benedito e Maria José

e meus irmãos,

Ana Paula, Jorge e Daniela

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

Às Instituições,

ESAL - Escola Superior de Agricultura de Lavras

CAPES - Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino
Superior

pela oportunidade de realizar este curso;

A

Prof. Dr. Moacir Pasqual

Prof. Dr. Amauri Alves Alvarenga

Prof. Dr. José Darlan Ramos

Prof. Dr. Nilton Nagib Jorge Chalfun

Prof. Dr. Augusto Ramalho de Moraes

Prof. Dr. Renato Paiva

Prof. Thadeu de Pádua

Evaldo Souza Arantes

Vantuil Antônio Rodrigues

Denise Garcia Santana

Jorge Susumo Ishida

pela amizade, apoio, incentivo e colaboração;

A todos os colegas e amigos conquistados neste período de convivência e que tornaram tão engrandecedor os momentos aqui partilhados,

MUITO OBRIGADA

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE ABREVIATURAS	xii
RESUMO	xiii
SUMMARY	xv
CAPITULO I - INTRODUÇÃO GERAL	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	6
CAPITULO II - EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO MEIO MS, CONCENTRAÇÕES DE NITROGÊNIO E NÍVEIS DE SACAROSE NA PROPAGAÇÃO "IN VITRO" DE CRISÂNTEMO	9
1 RESUMO	10
2 REFERENCIAL TEÓRICO	11
2.1 Meio de Cultura	11
2.2 Nitrogênio	12
2.3 Sacarose	12
3 EXPERIMENTO A : EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO MEIO MS E NÍVEIS DE SACAROSE NA PROPAGAÇÃO "IN VITRO" DE CRISÂNTEMO	15
3.1 MATERIAL E MÉTODOS	15
3.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO	16
3.3 CONCLUSÃO	27

4 EXPERIMENTO B: AVALIAÇÃO DO EFEITO DE DIFERENTES NIVEIS DE NITROGÊNIO E CONCENTRAÇÕES DE SACAROSE NO MEIO DE CULTURA PARA A PROPAGAÇÃO "IN VITRO" DE CRISÂNTEMO..	28
4.1 MATERIAL E MÉTODOS	28
4.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
4.3 CONCLUSÃO	38
5 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38
CAPITULO III - EFEITO DE CONCENTRAÇÕES DE ÁGAR E NIVEIS DE pH NA PROPAGAÇÃO "IN VITRO" DE CRISÂNTEMO	42
1 RESUMO	43
2 REFERENCIAL TEÓRICO	44
2.1 Ágar	44
2.2 pH	47
3 MATERIAL E MÉTODOS	48
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
5 CONCLUSÃO	56
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
CAPITULO IV - EFEITO DE DIFERENTES REGULADORES DE CRESCIMENTO SOBRE A PROLIFERAÇÃO "IN VITRO" DE BROTOS DE CRISÂNTEMO	58
1 RESUMO	60
2 REFERENCIAL TEÓRICO	61
2.1 Reguladores de Crescimento	61

2.1.1 Citocininas	62
2.1.2 Auxinas	65
2.1.3 Acido Giberélico (GA3)	67
3 EXPERIMENTOS A E B: EFEITO DE CITOCININAS (BAP E CINETINA) COMBINADAS COM ANA NA PROLIFERAÇÃO "IN VITRO" DE BROTOS DE CRISÂNTEMO	68
3.1 MATERIAL E MÉTODOS	68
3.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO	69
3.3 CONCLUSÃO	69
4 EXPERIMENTO C: EFEITO DO ACIDO GIBERÉLICO (GA3) SOBRE O DESENVOLVIMENTO DE PLANTAS DE CRISANTEMO CULTIVADAS "IN VITRO"	90
4.1 MATERIAL E MÉTODOS	90
4.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO	91
4.3 CONCLUSÃO	93
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	94
CONCLUSÕES GERAIS	97
ANEXOS	98
APÊNDICE	102

LISTA DE TABELAS

Tabela		Página
1	Resumo das análises de variância para número e tamanho de brotos, número de folhas, peso da matéria seca da parte aérea e das raízes e número de raízes em função de concentrações do meio MS e sacarose.....	17
2	Resumo das análises de variância para número e tamanho de brotos, número de folhas, peso da matéria seca da parte aérea e das raízes e número de raízes em função de níveis de sacarose e nitrogênio no meio de cultura.	30
3	Resumo das análises de variância para número e tamanho de brotos, número de folhas, peso da matéria seca da parte aérea e número de raízes em função de diferentes níveis de ágar e pH no meio de cultura.....	51
4	Variações observadas de valores de pH nas fases de preparo do meio de cultura e trinta dias após a inoculação dos explantes, em relação aos valores inicialmente ajustados.....	55
5	Resumo das análises de variância para número e tamanho de brotos, número de folhas, peso da matéria seca da parte aérea e das raízes, número de raízes e peso da matéria fresca dos calos em função de diferentes concentrações de BAP e ANA no meio de cultura.....	70
6	Resumo das análises de variância para número e tamanho de brotos, número de folhas, peso da matéria seca da parte aérea e das raízes, número de raízes e peso da matéria fresca dos calos em função de níveis de cinetina e ANA no meio de cultura.....	71
7	Resumo das análises de variância para número e tamanho de brotos, número de folhas e peso da matéria seca da parte aérea em função de diferentes concentrações de ácido giberélico (GA3).....	92

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Número de brotos formados em diferentes concentrações do meio MS e de sacarose.....	18
2	Tamanho dos brotos obtidos em diferentes concentrações do meio MS e de sacarose.....	20
3	Número de folhas formadas por broto em diferentes concentrações do meio MS e de sacarose.....	21
4	Peso da matéria seca da parte aérea obtida em diferentes concentrações de meio MS e de sacarose.....	22
5	Número de raízes formadas em diferentes concentrações de meio MS.....	24
6	Número de raízes formadas em diferentes concentrações de sacarose no meio de cultura.....	25
7	Peso da matéria seca das raízes obtidas em diferentes concentrações de meio MS e de sacarose.....	26
8	Número de brotos obtidos em diferentes concentrações de nitrogênio e de sacarose no meio de cultura.....	31
9	Tamanho dos brotos formados em diferentes concentrações de nitrogênio e de sacarose no meio de cultura.....	32

Figura	Página
10	Número de folhas formadas em diferentes concentrações de nitrogênio e de sacarose no meio de cultura..... 33
11	Peso da matéria seca da parte aérea obtida em diferentes concentrações de nitrogênio no meio de cultura..... 34
12	Peso da matéria seca da parte aérea obtida em diferentes concentrações de sacarose no meio de cultura..... 34
13	Número de raízes formadas em diferentes concentrações de nitrogênio no meio de cultura..... 35
14	Número de raízes formadas em diferentes concentrações de sacarose no meio de cultura..... 36
15	Peso da matéria seca das raízes obtidas em diferentes concentrações de nitrogênio e de sacarose no meio de cultura..... 37
16	Peso da matéria seca da parte aérea obtida em diferentes concentrações de ágar e níveis de pH no meio de cultura..... 53
17	Número de brotos obtidos em diferentes concentrações de BAP e ANA no meio de cultura..... 72
18	Número de brotos obtidos em diferentes concentrações de cinetina e ANA no meio de cultura..... 73

Figura		Página
19	Tamanho dos brotos formados em diferentes concentrações de BAP e ANA no meio de cultura.....	76
20	Tamanho dos brotos formados em diferentes concentrações de cinetina e ANA no meio de cultura.....	77
21	Número de folhas formadas em diferentes concentrações de BAP no meio de cultura.....	78
22	Número de folhas formadas em diferentes concentrações de ANA no meio de cultura.....	79
23	Número de folhas formadas em diferentes concentrações de cinetina e ANA no meio de cultura.....	79
24	Peso da matéria seca da parte aérea obtida em diferentes concentrações de BAP e ANA no meio de cultura.....	80
25	Peso da matéria seca da parte aérea obtida em diferentes concentrações de cinetina e ANA no meio de cultura.....	81
26	Número de raízes formadas em diferentes concentrações de BAP no meio de cultura.....	82
27	Número de raízes formadas em diferentes concentrações de ANA no meio de cultura.....	82

Figura		Página
28	Número de raízes formadas em diferentes concentrações de cinetina no meio de cultura.....	83
29	Número de raízes formadas em diferentes concentrações de ANA no meio de cultura.....	84
30	Peso da matéria seca das raízes obtidas em diferentes concentrações de BAP e ANA no meio de cultura.....	86
31	Peso da matéria seca das raízes obtidas em diferentes concentrações de cinetina no meio de cultura.....	86
32	Peso da matéria seca das raízes obtidas em diferentes concentrações de ANA no meio de cultura.....	87
33	Peso da matéria fresca dos calos obtidos em diferentes concentrações de BAP e ANA no meio de cultura.....	88
34	Peso da matéria fresca dos calos obtidos em diferentes concentrações de cinetina e ANA no meio de cultura....	88

LISTA DE ABREVIATURAS

ANA	Acido naftalenoacético
BAP (BA)	6-Benzilaminopurina = 6-Benziladenina
CIN	Cinetina; 6-furfurilamino-purina
GA3	Acido Giberélico
HCl	Acido Clorídrico
MS	Meio básico de Murashige e Skoog (1962)
N.Brotos	Número de brotos
N.Folhas	Número de Folhas
N.Raizes	Número de raizes
NaOH	Hidróxido de Sódio
PMFcalos	Peso da matéria fresca dos calos
PMSpa	Peso da matéria seca da parte aérea
PMSraizes	Peso da matéria seca das raizes
Tam.Brotos	Tamanho de brotos

RESUMO

OLIVEIRA, Patricia Duarte de. Propagação "in vitro" de crisântemo (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev.) cultivar Orange Reagen. Lavras: ESAL, 1994. 116p. (Dissertação - Mestrado em Fitotecnia)*

O efeito de componentes do meio de cultura na propagação "in vitro" de crisântemo (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev. cv. Orange Reagen), foi avaliado. No primeiro experimento objetivou-se otimizar o meio básico MS, o qual foi testado nas concentrações de 0, 25, 50, 75, 100, 125 e 150%, combinadas com 0; 1,5; 3,0; 6,0 e 12,0% de sacarose. No segundo experimento foram testadas concentrações de nitrogênio (0, 25, 50, 75, 100, 125 e 150%), segundo o nível básico do MS, combinadas com 0; 1,5; 3,0; 6,0 e 12,0% de sacarose. Bons resultados foram obtidos em meio com 75% MS, utilizando o nitrogênio na concentração de 75% do recomendado para o meio MS, acrescido de 6% de sacarose. Avaliou-se também o efeito de concentrações de ágar (0; 0,35; 0,7 e 1,05%) combinadas com diferentes pHs (4,6; 5,0; 5,4; 5,8; 6,2; 6,6; 7,0), sendo recomendada a utilização de 0,7% de ágar, e ajustar-se o pH para 5,8, antes da autoclavagem. O efeito de reguladores de

*Orientador: Moacir Pasqual. Membros da Banca: Amauri Alves Alvarenga e José Darlan Ramos.

crescimento também foi avaliado, testando-se BAP (0,0; 1,5; 3,1; 6,2; 12,4; 24,8; 49,7 μM) x ANA (0; 0,075; 0,75 e 7,5 μM), cinetina (0,0; 1,6; 3,2; 6,5; 13,0; 26,0; 52,0 μM) x ANA (0; 0,075; 0,75 e 7,5 μM) e GA3 (0,0; 1,37; 2,75; 5,5; 11,0; 22,0; 44,0 μM). BAP apresentou maior efetividade do que cinetina, no entanto, não houve proliferação satisfatória de brotos. A melhor combinação foi de 6,2 ou 12,4 μM de BAP e 0.0 de ANA. O regulador de crescimento GA3 não foi efetivo no alongamento dos brotos.

SUMMARY

"IN VITRO" PROPAGATION OF CHRYSANTHEMUM (*Dendranthema grandiflora*
Tzvelev.) CULTIVAR ORANGE REAGEN

The effect of culture medium on "in vitro" propagation of chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev. cv. Orange Reagen) was investigated. In the first part, basic MS medium was tested using the following concentrations: 0, 25, 50, 75, 100, 125 and 150 % combined with 0, 0.75, 1.5, 3.0, 6.0 and 12.0 % saccharose. On the second part, according to the basic MS medium, different concentrations of nitrogen (0, 25, 50, 75, 100, 125 and 150%) combined with 0, 0.75, 1.5, 3.0, 6.0 and 12.0 % saccharose was evaluated. Best results were obtained using 75% MS containing 75% nitrogen and 6% saccharose. The effect of different agar concentrations (0, 0.35, 0.7, 1.5%) combined with different pHs (4.8, 5.0, 5.4, 5.8, 6.2, 6.6, 7.0) was also tested. Results of this experiment suggest the use of 0.7% agar with pH adjusted to 5.8 before the autoclaving process. As a last part of this work, the effect of different growth regulators was studied. The growth regulator GA3 was tested using the following concentrations: 0.0, 1.37, 2.75, 5.5, 11.0, 22.0, 44.0 μM . The growth regulators BAP, ANA and Kinetin were tested according to the following combinations: BAP - 0.0, 1.5, 3.1, 6.2, 12.4, 24.8, 49.7 μM x ANA - 0.0, 0.075, 0.75, 7.5 μM and Kinetin - 0.0, 1.6, 3.2, 6.5,

13.0, 26.0, 52.0 μM x ANA - 0.0, 0.075, 0.75, 7.5 μM . Results of these experiments demonstrated that although no satisfactory shoot proliferation was observed, the use of BAP was more effective than Kinetin. The best concentrations of BAP X ANA were 6.2 μM and 0.0 μM or 12.4 and 0.0 μM , respectively. There was no effective shoot elongation when GA3 was used.

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO GERAL

CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO GERAL

O crisântemo é a segunda flor de corte em volume de produção no Brasil, sendo o primeiro lugar ocupado pelas rosas e o terceiro por cravos. Atualmente existem mais de 1000 variedades conhecidas, sendo que dentre estas, aproximadamente 200 são cultivadas comercialmente (Langton, 1987).

O mercado de flores tem exigido espécies e/ou cultivares diferentes e exóticas. Devido a isso utilizou-se nesse trabalho a variedade Orange Reagen, que apresenta as flores em forma margarida, de coloração amarelo-alaranjado, muito atrativa e bastante diferente dos tradicionais crisântemos polares branco e amarelo.

Os crisântemos eram anteriormente denominadas de *Chrysanthemum morifolium* Ramat. Atualmente, as plantas cultivadas para a produção de flores de corte e vaso e em jardim são denominadas *Dendranthema grandiflora* Tzvelev. Família: ASTERACEAE; tribo: Anthemideae; subtribo: Chrysantheminae

(Anderson, 1987). Estas plantas têm como centro de diversidade a China, Japão, Sibéria, Tibet, Europa central e oriental, sudoeste da Asia e Cáucaso e Mediterrâneo (Constant, 1976).

O crisântemo é propagado convencionalmente através de estacas (May e Trigiano, 1981), mas as plantas assim produzidas, têm apresentado sérios problemas por infecção de viroses, ocasionando prejuízos aos viveiristas e produtores.

A utilização da cultura de tecidos para a propagação clonal de plantas tem sido aceita em numerosas áreas da agricultura comercial (McCown, 1988), especialmente com ornamentais herbáceas (Murashige, 1974; Bhojwani, 1990). Os laboratórios têm dado especial atenção ao uso da tecnologia de cultura de tecidos para a produção de plantas matrizes (Debergh, 1990; Debergh e Read, 1991) e propagação assexuada de plantas economicamente importantes (Hu e Wang, 1983; Jones, 1987; Bhojwani, 1990).

A cultura de tecidos tem sido utilizada com o objetivo de eliminar patógenos e viroses das plantas (Holdgate, 1977; Ahmed e Andrea, 1987; Horst, 1990), ou para introduzir e selecionar mutantes desejáveis (Broertjes, Roest e Bokelmann, 1976; Jong e Custers, 1986; Dalsou e Short, 1987; Huitema et al., 1987).

Earle e Langhans (1974), Jones (1987) e Bhojwani (1990) apresentaram algumas justificativas para a propagação "in vitro" do crisântemo: 1. Propagação rápida de plantas, facilitando a introdução de novas cultivares; 2. Possibilidade de indexação de plantas para viroses; 3. Possibilidade de produção

de plantas livres de vírus; 4. Produção de plantas livres de patógenos.

A propagação de crisântemo e cravos é ainda muito cara, entretanto, há grande interesse na produção de plantas matrizes sadias com o objetivo de melhorar a produção "in vivo" (Queralt et al., 1991)

Cada clone a ser propagado requer, no entanto, um meio individual otimizado e o estabelecimento de um protocolo para proporcionar adequada razão de multiplicação, assim como, de enraizamento e aclimação (Jones, 1987 e Bhojwani, 1990).

Uma das maneiras de viabilizar a produção "in vitro" é a utilização de segmentos nodais como explantes para a propagação. Prasad e Chaturvedi (1988) testando ápices, segmentos foliares, segmentos nodais, segmentos internodais e raízes como explantes para a propagação de crisântemo, obtiveram brotações apenas em ápices e segmentos nodais. Pierik (1987) e Bhojwani (1990) sugerem a utilização de segmentos nodais simples (um nó apenas) para a propagação de crisântemo.

As condições de incubação utilizadas nas salas de crescimento variam de acordo com os diversos autores; Lu, Nugent e Wardley (1990) e May e Trigiano (1991) trabalharam com temperatura em $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo com 16 horas de luz. Hu e Wang (1983) e Blakesley e Constantine (1992) utilizaram temperatura em 25°C e 16 horas de luz e Malaure et al. (1991) conduziram as plantas em $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e 16 horas de luz. Prasad e Chaturvedi (1988) e Bhattacharya et al. (1990) utilizaram $27 \pm 1^{\circ}\text{C}$ e 15 horas de fotoperíodo. Apesar da diversidade de condições de incubação utilizadas e propostas, estas estão em

intervalos muito próximos, apresentando pequenas variações.

Para os experimentos de biotecnologia, os materiais utilizados são normalmente de tamanho pequeno e conseqüentemente muito sensíveis a pequenas mudanças em fatores externos (Isquierdo e Lopes Filho, 1991). Isto explica as altas variações que ocorrem e devem ser consideradas ao se determinar o número de repetições neste tipo de experimento.

Para se determinar o número de repetições, Isquierdo e Lopes Filho (1991) sugerem que se considere as condições físicas (sala de crescimento, por exemplo) e a natureza do material utilizado (espécie, tipo de explante). Além disto é indispensável o critério do pesquisador por ser este "conhecedor das características biológicas do material".

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMED, H.A.; ANDREA, M. Effect of heat treatment on acceleration chrysanthemum multiplication by meristem-tip culture. *Acta Horticulturae*, Skierniewice, v.212, p.99-106, 1987.
- ANDERSON, N.O. Reclassifications of the genus *Chrysanthemum* L. *HortScience*, Wallingford, v.22, p.313, 1987.
- BHATTACHARYA, P.; DEY, S.; DAG, N.; BHATTACHARYA, B.C. Rapid mass propagation of *Chrysanthemum morifolium* by callus derived from stem and leaf explants. *Plant Cell Reports*, Berlin, v.9, p.439-442, 1990.
- BHOJWANI, S.S. *Plant tissue culture: applications and limitations*. Amsterdam: Elsevier, 1990. 461p.
- BLAKESLEY, D.; CONSTANTINE, D. Uptake and metabolism of 6-benzyladenine in shoot cultures of a range of species. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Dordrecht, v.28, p.183-186, 1992.
- BROERTJES, C.; ROEST, S.; BOKELMANN, G.S. Mutation breeding of *Chrysanthemum morifolium* Ramat. using in vivo and in vitro adventitious bud techniques. *Euphytica*, Wageningen, v.25, p.11-19, 1976.
- CONSTANT, R.B. *Pyrethrum - Chrysanthemum* spp. In: SIMMONDS, N.W. *Evolution of crop plants*. London: Longman, 1976. p.33-36.
- DALSOU, V.; SHORT, K.C. Selection for sodium chloride tolerance in chrysanthemums. *Acta horticulturae*, Skierniewice, v.212, p.329-334, 1987.
- DEBERGH, P.C.A. Recent trends in the applications of tissue culture to ornamentals. In: GREEN, C.G., SOMERS, D.A., HACKETT, W.P.; BLESBOER, D.D. *Plant tissue and culture*. New York: A.R. Liss, 1990. p.383-393.
- DEBERGH, P.C.; READ, P.E. Micropropagation. In: DEBERGH, P.C.; ZIMMERMAN, R.H. (ed.). *Micropropagation - Tecnology and Application*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1991. p.1-14.
- EARLE, E.D.; LANGHANS, R.W. Propagation of *Chrysanthemum* in vitro. II. Production, growth and flowering of plantlets from tissue cultures. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, Alexandria, v.99, n.4, p.352-358, 1974.

- HOLDGATE, D.P. Propagation of ornamentals by tissue culture. In: REINERT, J.; BAJAJ, Y.P.S. (ed.). Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture. Berlin: Springer-Verlag, 1977. p.18-43.
- HORST, R.K. Chrysanthemum. In: AMMIRATO, P.V.; EVANS, D.A.; SHARP, W.R.; BAJAJ, Y.P.S. (ed.). Handbook of plant cell culture - Ornamental species. New York: McGraw-Hill, 1990. v.5, p.319-336.
- HU, C.Y.; WANG, P.J. Meristem, shoot tip and bud cultures. In: EVANS, D.A.; SHARP, W.R.; AMMIRATO, P.V.; YAMADA, Y. Handbook of Plant Cell Culture - Techniques for Propagation and Breeding. New York: Macmillan Publishing Company, 1983. v.1. p.177-277.
- HUITEMA, J.B.M.; GUSSENHOVEN, G.; DONS, J.J.M.; BROERTJES, C. Induction and selection of low-temperature-tolerant mutants of *Chrysanthemum morifolium* Ramat. Nuclear techniques and in vitro culture for plant improvement. Viena: International Atomic Energy Agency, 1986. p.321-327.
- ISQUIERDO, J.A.; LOPES FILHO, Y. Análisis e interpretación estadística de la experimentación in vitro. In: ROCA, W.M., MROGINSKI, L.A. (ed.). Cultivo de tejidos en la agricultura - Fundamentos e aplicaciones. Cali, CIAT, 1991 p.375-399.
- JONES, L.H. Clonal propagation of plantation crops. In: ABBOT, A. J.; ATKIN, R.K. Improving vegetatively propagated crops. London: Academic Press, 1987. p.385-405.
- JONG, J.de; CUSTERS, J.B.M. Induced changes in growth and flowering of chrysanthemum after irradiation and in vitro culture of pedicels and petal epidermis. Euphytica, Wageningen, v.35, p.137-148, 1986.
- LANGTON, F.A. Breeding for Improved Ornamental Plants. In: ABBOT, A.J.; ATKIN, R.K. Improving vegetatively propagated crops. London: Academic Press, 1987. p.159-180.
- LU, C.Y.; NUGENT, G.; WARDLEY, T. Efficient, direct plant regeneration from stem segments of chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium* Ramat. cv. Royal Purple). Plant Cell Reports, Berlin, v.8, p.733-736, 1990.
- McCOWN, B.H. Adventitious rooting of tissue cultured plants. In: DAVIS, T.D.; HAISSIG, B.E.; SANKHLA, N. Adventitious root formation in cuttings. Portland: Dioscorides Press, 1988. p.289-302.
- MALAURE, R.S.; BARCLAY, G.; POWER, J.B.; DAVEY, M.R. The production of novel plants from florets of *Chrysanthemum morifolium* using tissue culture. 1. Shoot regeneration from ray florets and somaclonal variation exhibited by regenerated plants. Journal of Plant Physiology, London, v.139, p.08-13, 1991.

- MAY, R.A.; TRIGIANO, R.N. Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaves of *Dendranthema grandiflora*. Journal of the American Society for Horticultural Science, Alexandria, v.116, n.2, p.366-371, 1991.
- MURASHIGE, T. Plant propagation through tissue cultures. Annual Review of Plant Physiology, Palo Alto, v.25, p.135-166, 1974.
- PIERIK, R.L.M. In vitro culture of higher plants. Dordrecht: Martinus Nyhoff Publishers, 1987. 344p.
- PRASAD, R.N.; CHATURVEDI, C. Effect of season of collection of explants on micropropagation of *Chrysanthemum morifolium*. Biologia Plantarum, The Hague, v.30, n.1, p.20-24, 1988.
- QUERALT, M.C.; BERUTO, M.; VANDERSCHAEGHE, A.; DEBERGH, P.C. Ornamentals. In: DEBERGH, M.C.; ZIMMERMAN, R.H. (ed.). Micropropagation - Tecnology and Aplication. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1991. p.215-230.

CAPÍTULO II

EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO MEIO MS, CONCENTRAÇÕES
DE NITROGÊNIO E NÍVEIS DE SACAROSE NA PROPAGAÇÃO "IN VITRO"
DE CRISÂNTEMO

CAPITULO II - EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO MEIO MS,
CONCENTRAÇÕES DE NITROGÊNIO E NÍVEIS DE SACAROSE NA PROPAGAÇÃO
"IN VITRO" DE CRISÂNTEMO

1 RESUMO

Experimentos foram realizados objetivando estabelecer concentrações satisfatórias do meio básico a ser utilizado (MS), de nitrogênio e de sacarose para a propagação "in vitro" de crisântemo (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev), cv. Orange Reagen. Testaram-se as concentrações 0; 25; 50; 75; 100; 125 e 150% do meio MS combinadas com 0; 0,75; 1,5; 3,0; 6,0 e 12,0% de sacarose e obteve-se como resultados satisfatórios 75% MS + 6% sacarose. Num segundo experimento as concentrações 0; 25; 50; 75; 100; 125 e 150% de nitrogênio em relação ao MS foram testadas em combinação com as mesmas concentrações de sacarose do experimento anterior. A concentração de 75% de nitrogênio apresentou bons resultados quando combinado com 6% de sacarose.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Meio de Cultura

Em cultura de tecidos, o meio de cultivo é constituído de macro e micronutrientes, vitaminas, aminoácidos, açúcares, agente solidificante e ainda, reguladores de crescimento (George e Sherrington, 1984).

O MS (Murashige e Skoog, 1962 - Tabela 1A) é o meio mais comumente utilizado para a propagação de várias espécies, no entanto, sua concentração de nutrientes é alta, podendo ser diminuída, segundo Pierik (1987). Muitas modificações neste meio básico têm sido sugeridas, visando, de acordo com George e Sherrington (1984), maior adaptação das culturas e redução de custos.

A concentração de sais do meio tem grande influência no enraizamento "in vitro". Hu e Wang (1983) e George e Sherrington (1984) relatam que pode não ocorrer enraizamento em meios com alta concentração de sais, independente do tipo de regulador de crescimento utilizado. Em concentrações menores do meio (1/2, 1/3 ou 1/4) o enraizamento tende a ser mais abundante (Skirvin e Chu, 1979; Lane, 1979; Kartha et al., 1981; Thorpe e Patel, 1984; Prasad e Chaturvedi, 1988). Lu, Nugent e Wardley (1990) utilizaram 50% do MS como bom meio para enraizamento de crisântemo. Apesar desta baixa concentração de sais no meio favorecer a indução radicular, isto pode resultar, conforme Hu e

Wang (1983), num menor desenvolvimento da parte aérea.

2.2 Nitrogênio

Crescimento e morfogênese em cultura de tecidos são marcadamente influenciados pela disponibilidade de nitrogênio (George e Sherrington, 1984). De acordo com Roest e Bokelmann (1975) a quantidade total de nitrogênio pode afetar o número de brotações obtidas a partir do pedicelo de crisântemo. Estes autores estudaram o efeito de KNO_3 e NH_4NO_3 na formação de brotos de crisântemo e obtiveram bons resultados com a utilização 0,5 a 2,0 vezes a concentração do MS, sendo ideal em torno de 0,7 MS. O nitrogênio, ainda, segundo Hyndman, Hasegawa e Bressan (1982) e Moe e Andersen (1988), parece ter maior influência na formação de raízes em comparação com outros macronutrientes no meio de cultura.

Do e Cormier (1991a) relataram que altas concentrações de sacarose combinadas com baixos níveis de nitrato apresentaram efeito positivo na acumulação intracelular de antocianinas, além de causar inibição no crescimento celular. Este efeito foi observado em cultivo de suspensão de células de videira em 4,5% de sacarose e 6,25 mM de nitrato por Do e Cormier (1991b).

2.3 Sacarose

Em cultura de tecidos, é necessário a incorporação de carbono como fonte de energia para o meio, sendo os carboidratos

essenciais para o crescimento e desenvolvimento "in vitro", pois, segundo George e Sherrington (1984) e Pierik (1987), a fotossíntese é insuficiente nessa condição, devido ao fato dos tecidos verdes não serem suficientemente autotróficos e a concentração de CO₂ ser limitante.

A sacarose é o carboidrato mais comumente utilizado, geralmente nas concentrações de 2 a 4% (p/v) (Murashige, 1974; Gamborg e Shyluk, 1981; George e Sherrington, 1984; Thorpe e Patel, 1984; Ozias-Akins e Vasil, 1985), variando de acordo com a espécie e/ou variedade.

Os carboidratos influenciam o potencial osmótico do meio (George e Sherrington, 1984), com efeito maior, segundo Pierik (1987) que os macronutrientes. O abaixamento do potencial osmótico afeta o crescimento e desenvolvimento "in vitro", por cessar a retirada de água do meio, causando estresse (Pierik, 1987; Do e Cormier, 1990). Shibli, Smith e Spomer (1992) não observaram efeito da sacarose provocando estresse osmótico em crisântemo e, apesar de ter sido alterado o potencial osmótico do meio, não houve influência no crescimento dos brotos.

Em estudos com várias cultivares de crisântemo, Shibli et al. (1992) observaram que o aumento no nível de sacarose tende a aumentar o crescimento dos brotos, mesmo em concentração elevada (8,8%), que parece não ter efeito inibitório no desenvolvimento como relatado por outros autores. Roest e Bobelmann (1975) obtiveram ótimo desenvolvimento de brotos adventícios de crisântemos nas concentrações de 3% para a cultivar Super Yellow e 5% para a Bravo. Cuello, Walker e Heuser

3 EXPERIMENTO A: EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO MEIO MS E NIVEIS DE SACAROSE NA PROPAGAÇÃO "IN VITRO" DE CRISÂNTEMO

OBJETIVO:

Objetivou-se neste trabalho estabelecer uma concentração satisfatória do meio MS e sacarose para a propagação de crisântemo através de cultura de tecidos.

3.1 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Cultura de Tecidos do Departamento de Agricultura da Escola Superior de Agricultura de Lavras (ESAL) em Lavras, Minas Gerais.

A cultivar utilizada, Orange Reagen, já se encontrava estabelecida "in vitro" e foi submetida à uniformização em meio MS. Os explantes se constituíram de microestacas, contendo 2 gemas, oriundas da região mediana. Em cada tubo de ensaio (25 x 150 mm) contendo aproximadamente 15 ml de meio, foi colocado uma microestaca. Esse processo foi realizado em sala asséptica, utilizando câmara de fluxo laminar.

O meio de cultura básico utilizado foi o de Murashige e Skoog (1962) (Tabela 1A), nas concentrações 0, 25, 50, 75, 100, 125 e 150% (Tabela 2A). Combinaram-se a estas concentrações diferentes níveis de sacarose P.Ã.: 0,0; 0,75; 1,5; 3,0; 6,0 e 12,0%, totalizando um fatorial 7 x 6. O meio foi solidificado com

0,7 % de ágar, sendo o pH ajustado para 5,8; utilizando NaOH ou HCl, antes do processo de autoclavagem (121°C, 1 atm, por 20 minutos). Utilizou-se o delineamento estatístico inteiramente casualizado, com 3 tubos por parcela e 4 repetições.

O experimento foi conduzido em sala de crescimento com temperatura de $26 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 16 horas de luz, com intensidade luminosa de 2500 lux.

A avaliação do experimento foi efetuada 30 dias após a instalação, através do número de brotos obtidos, tamanho dos brotos (cm) formados, número de folhas, número de raízes primárias, peso da matéria seca (g) da parte aérea e das raízes.

3.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 resume as análises de variância, mostrando que as variáveis número de brotos, comprimento dos brotos, número de folhas, PMSpa e PMSraízes foram afetadas significativamente pela interação de concentrações do meio de cultura e de sacarose. Estes dados contrariam observações de outros autores que testaram o efeito de concentrações relativas de meio MS (Skirvin e Chu, 1979; Lane, 1979; Kartha et al., 1981; Prasad e Chaturvedi, 1988; Lu, Nugent e Wardley, 1990) ou concentrações de sacarose (Roest e Bokelmann, 1975; Welander, 1976; Chong e Pua, 1985; May e Trigiano, 1991; Cuello, Walker e Heuser, 1992; Shibli, Smith e Spomer, 1992), mas não encontraram interação significativa entre concentrações do meio de cultura e de sacarose. O número de

raízes foi influenciado pelas concentrações do meio de cultura e de sacarose, isoladamente.

TABELA 1. Resumo das análises de variância para número e tamanho de brotos, número de folhas, peso da matéria seca da parte aérea e das raízes e número de raízes em função de concentrações do meio MS e sacarose. ESAL, Lavras/MG, 1984.

Causas da Variação	GL	Quadrados médios e significância ^{1/}					
		N.Brotos	Tam.Brotos	N.Folhas	PMSpa	N.Raízes	PMSraízes
MS	6	0.0011738	0.1439746**	0.6147978**	0.0000030**	0.1367090**	0.0000000
Sacarose	5	0.0015674*	0.2076127**	1.0423818**	0.0000065**	1.2859581**	0.0000001
MSxSacarose	30	0.0012837**	0.0167552**	0.0443306**	0.0000030**	0.0245059	0.0000004**
Resíduo	126	0.0006734	0.0026050	0.0107721	0.0000005	0.0192679	0.0000001
CV (%)		0.78	1.57	2.59	0.02	3.768	0.012

1/ Dados transformados segundo raiz(x+10)

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade

Mesmo diminuindo-se as concentrações dos nutrientes do meio MS não houve inibição da formação de brotos. Concentrações de 50 e 75% combinadas com 6% de sacarose ou de 25 e 50% do MS combinadas com 3% de sacarose proporcionaram médias de brotos formados superiores àquelas obtidas no meio comumente utilizado nos processos de micrôpropagação (MS(100%) + 3% de sacarose) - Figura 1.

sacarose) - Figura 1.

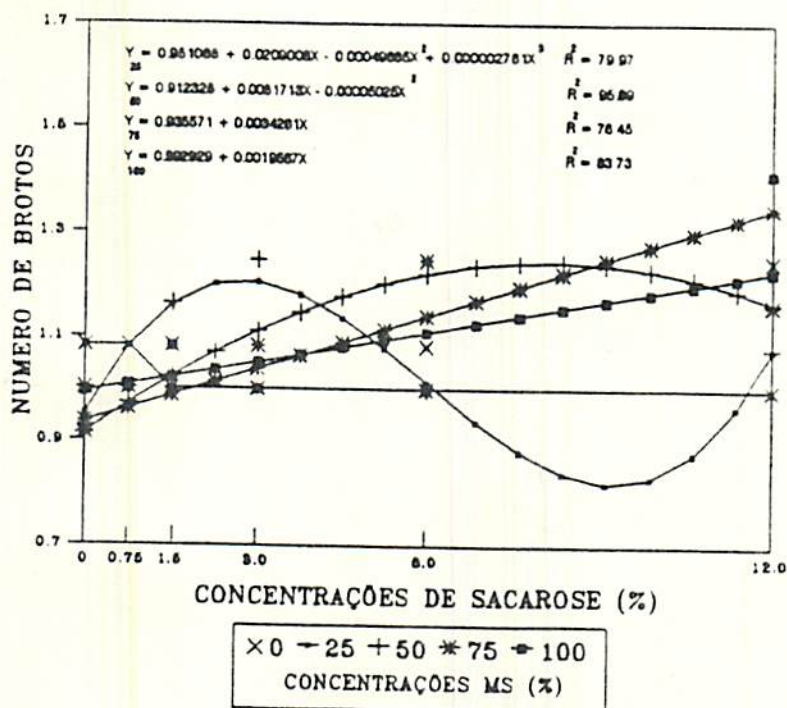


FIGURA 1 - Número de brotos formados em diferentes concentrações do meio MS e de sacarose. ESAL, Lavras/MG, 1984.

Nas concentrações 0, 125 ou 150% do meio MS, a produção de brotos foi constante - 1.0 por explante, independente do nível de sacarose no meio de cultura.

No meio preparado sem nenhum componente do meio MS, constituído apenas de água, ágar e diferentes níveis de sacarose, observou-se a formação de parte aérea e raízes nos segmentos nodais. Não se observou, no entanto, nenhuma diferença quanto a número de brotos formados devido às diferentes concentrações de sacarose, ocorrendo a formação de brotos mesmo em meios sem

sacarose.

A formação de brotos nas microestacas em meio sem nutrientes pode ser devido ao efeito de reservas existentes nas mesmas, devendo ser suficientes para a iniciação do processo de desenvolvimento.

Estes resultados sugerem que a sacarose tem importante função não só como substância fornecedora de energia, mas também como fonte de carbono, essenciais ao desenvolvimento das plantas (George & Sherrington, 1984; Pierik, 1987). O nível de carbono fornecido à planta deve ser equilibrado com outros nutrientes, especialmente com nitrogênio, mantendo uma relação C:N adequada. Isso justifica os resultados obtidos, onde se observou que meios com menor concentração de nutrientes exigem menor nível de sacarose, ao contrário, meios mais concentrados proporcionam melhores resultados em presença de maior nível de sacarose.

Em todos os tratamentos observa-se que houve desenvolvimento de apenas um broto, ocorrendo brotação apenas de uma das gemas presentes no explante inicial. Há tendência de ocorrer a brotação da outra gema da estaca à medida que se aumenta a concentração de sacarose no meio (Figura 1).

Meios com concentrações mais elevadas do meio MS, não proporcionaram aumento no número de brotos formados, independente dos níveis de sacarose utilizados. Concentrações elevadas de sacarose no entanto, afetaram negativamente o tamanho dos brotos. Esta inibição pode ser devido à elevação do potencial osmótico do meio, diminuindo assim a disponibilidade de água. Shibli, Smith e Spomer (1992) e May e Trigiano (1991), porém, não observaram

efeito de concentrações de sacarose afetando o crescimento do crisântemo, ao contrário, estimulou-se o processo. As diferentes respostas observadas por estes autores e neste trabalho podem ser atribuídas a diferenças intrínsecas às variedades testadas.

Observa-se na Figura 2, que o meio MS utilizado nos níveis 75, 100, 125 ou 150% proporcionou brotos com maior tamanho quando combinados com 6% de sacarose. Em concentrações menores, 25 e 50%, brotos maiores foram observados na presença de 3% de sacarose.

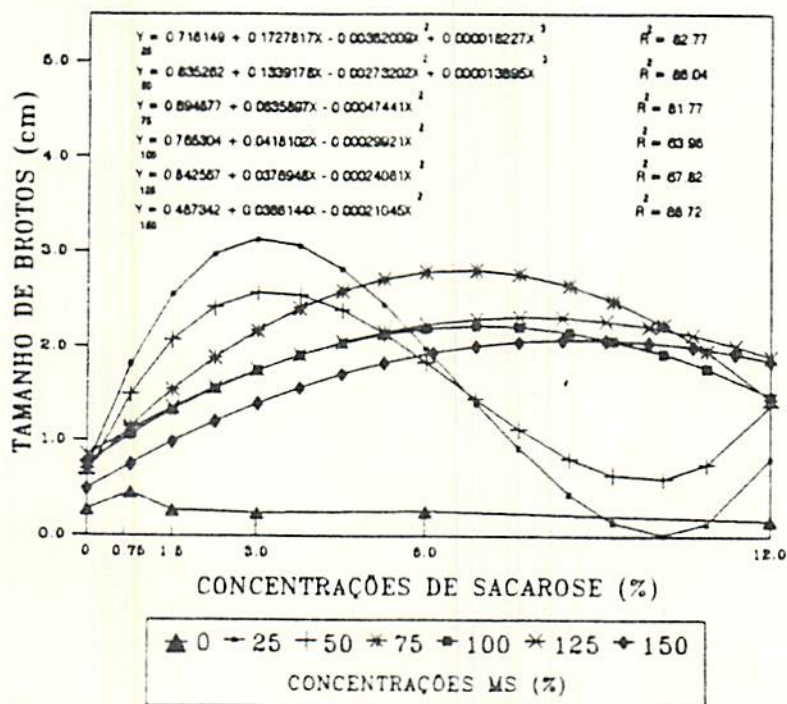


FIGURA 2 - Tamanho dos brotos obtidos em diferentes concentrações do meio MS e de sacarose. ESAL, Lavras/MG, 1994.

Quanto ao número de folhas obtidas, observa-se na Figura 3, que na maioria dos meios testados o maior número de

folhas ocorre em presença de 6% de sacarose. Observa-se ainda que há a tendência de brotos de maior tamanho apresentarem maior número de folhas e ao contrário, em brotos de tamanho menor, ocorre menor número de folhas.

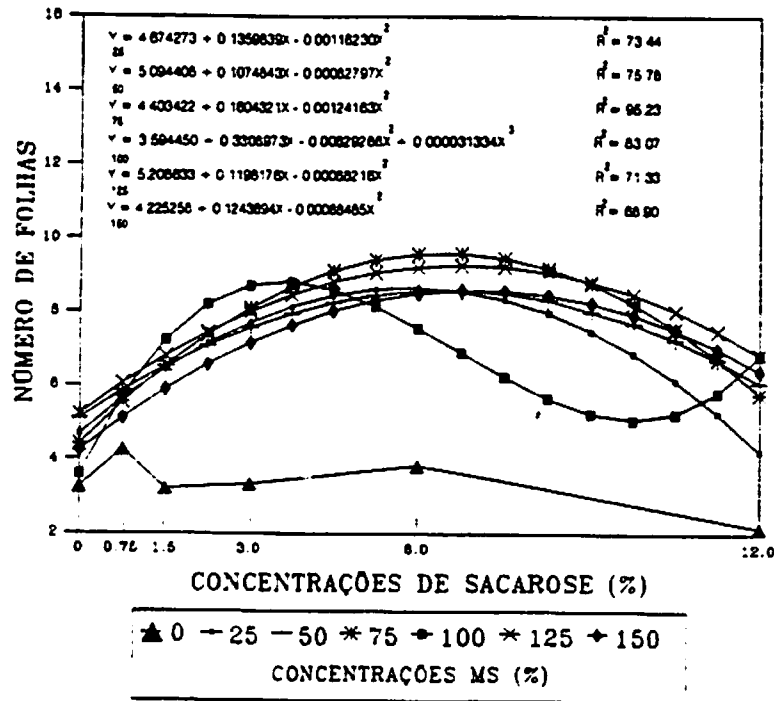


FIGURA 3 - Número de folhas formadas por broto em diferentes concentrações do meio MS e de sacarose. ESAL, Lavras/MG, 1994.

Pode-se atribuir o alongamento dos brotos à formação de novos internódios, não ocorrendo assim estiolamento. Este

resultado é de grande importância no cultivo de segmentos nodais, pois pode-se obter maior número de explantes a partir de brotos grandes, com bom número de nós e entre-nós espaçados, o que não ocorre em brotos pequenos e com muitas folhas. Nesses, há muitos nós e os entre-nós são curtos.

Observa-se na Figura 4 que valores mais elevados de PMSpa ocorreram em meios com 12% de sacarose.

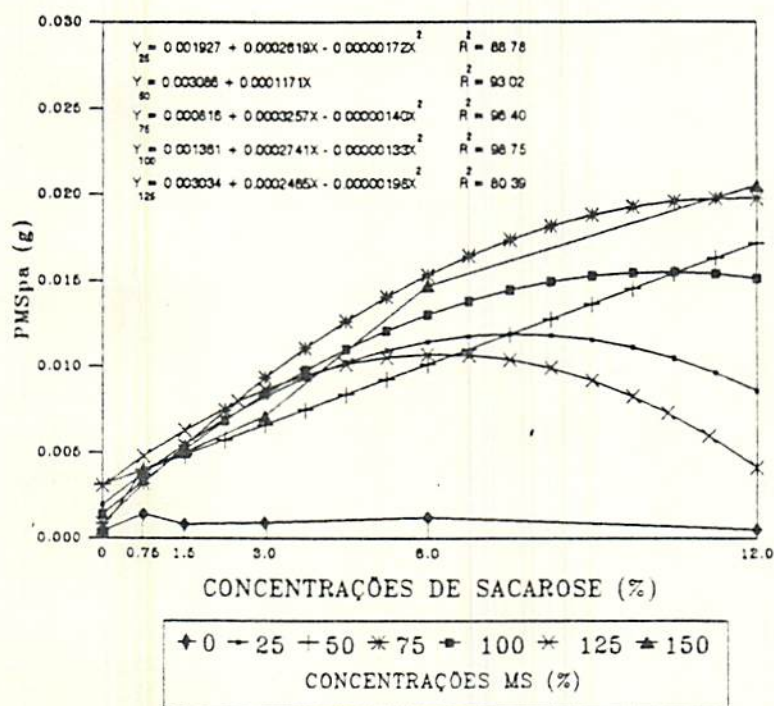


FIGURA 4 - Peso da matéria seca da parte aérea obtida em diferentes concentrações de meio MS e de sacarose. ESAL, Lavras/MG, 1994.

Em meios MS menos concentrados, o PMSpa foi menor do

que o obtido em meios com concentração acima de 75%, possivelmente devido à menor concentração de nutrientes disponível no meio. A formação de raízes (Figura 5) foi menor em meios com menor porcentagem de nutrientes do MS ou de sacarose. Em concentração mais elevada de MS (125 ou 150%) houve uma pequena tendência de queda no número de raízes formadas. Formação radicular satisfatória foi obtida em meios com 50 ou 75% do MS. Este resultado concorda com Lu, Nugent e Wardley (1990), que obtiveram como melhor meio para enraizamento 50% do MS. Nota-se por estes resultados que valores extremos são limitantes para a ocorrência de enraizamento, tendendo ser este, menor tanto em meios com alta ou baixa concentração de nutrientes.

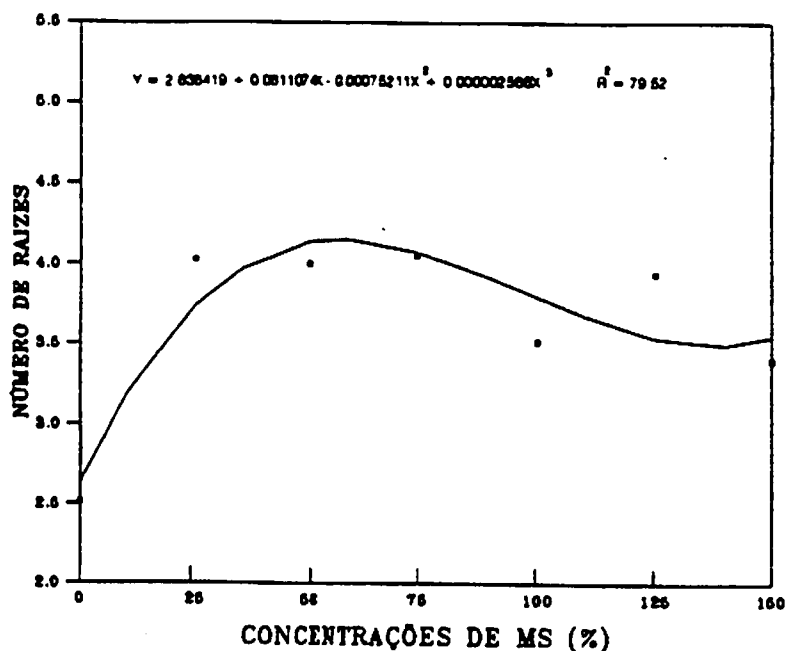


FIGURA 5 - Número de raízes formadas em diferentes concentrações de meio MS. ESAL, Lavras/MG, 1994.

O nível de sacarose, como pode ser observado na Figura 6, também influenciou a formação de raízes "in vitro". Maior enraizamento pode ser obtido em meios com nível de sacarose acima de 3%. Este resultado concorda com Welander (1976), Chong e Pua (1985), Pierik (1987), e Shibli, Smith e Spomer (1992), que observaram a necessidade de fornecimento de alta concentração de sacarose para a emissão de raízes em várias espécies, inclusive em crisântemo, espécie estudada por Shibli, Smith e Spomer (1992).

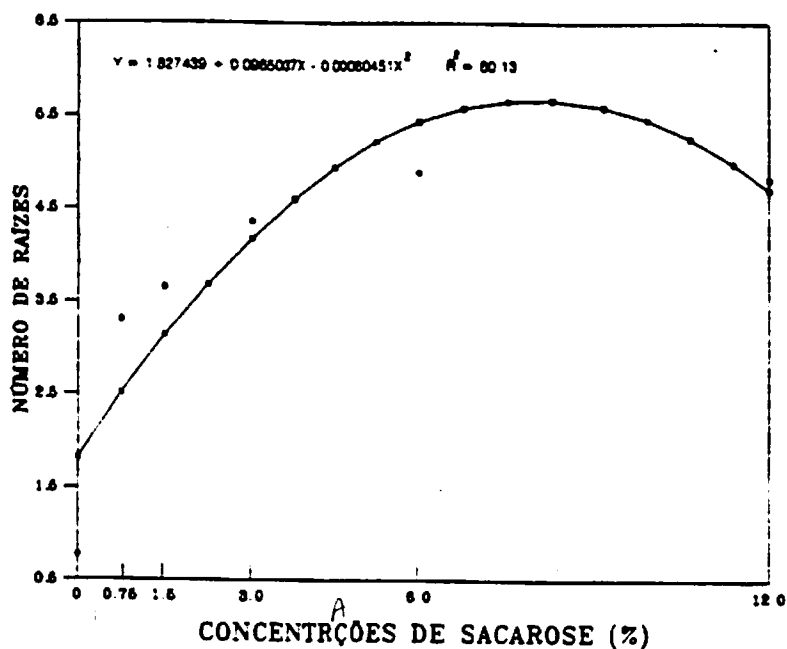


FIGURA 6 - Número de raízes formadas em diferentes concentrações de sacarose no meio de cultura. ESAL, Lavras/MG, 1994.

O PMSraízes (Figura 7) apresentou a tendência de aumentar, a medida que se elevou os níveis de sacarose, mas não tem a mesma tendência em relação aos níveis de MS, já que maiores pesos da matéria seca foram observados na concentração 50% do MS.

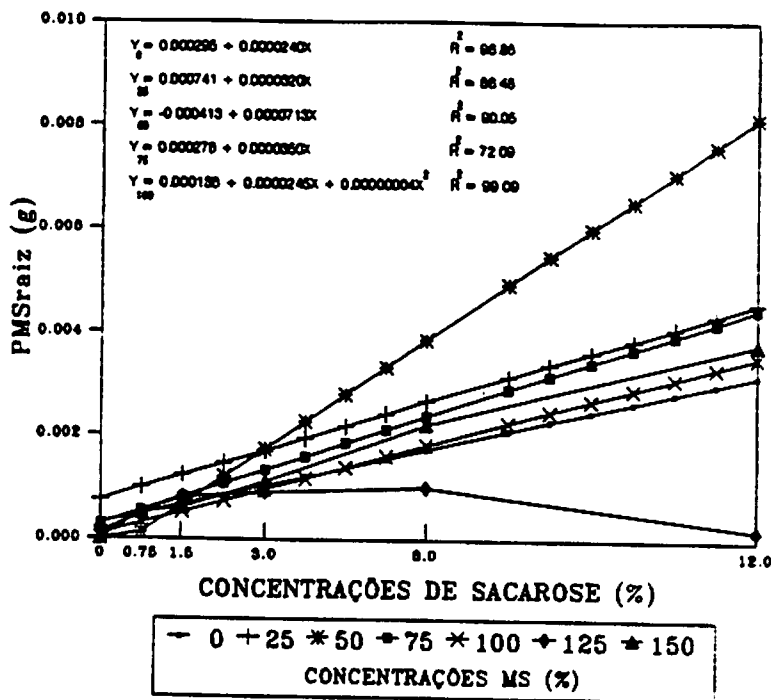


FIGURA 7 - Peso da matéria seca de raízes obtidas em diferentes concentrações de meio MS e de sacarose. ESAL, Lavras/MG, 1994.

Maior número de raízes foi obtido em menor concentração de MS, no entanto, estas eram bastante tenras. Ao contrário, em meios com maior concentração do MS, produziu-se menor número de raízes, porém com maior vigor, o que justifica os maiores pesos observados nestas concentrações.

Em segmentos nodais cultivados em meios com 12% de sacarose, observou-se o acúmulo de antocianina, efeito este atribuído à concentração elevada de sacarose. Este mesmo efeito foi observado por Do e Cormier (1991a,b) em cultura de células extraídas das folhas de videira em meios com níveis elevados de

sacarose, sendo a ocorrência de antocianina atribuída à elevada concentração de sacarose. Para a formação de antocianina é necessário a ligação na sua estrutura de moléculas de açúcar (Taiz e Zeiger 1991), o que justifica o efeito da elevada concentração de sacarose proporcionando a ocorrência de antocianinas nos segmentos nodais.

3.3 CONCLUSÃO

Observou-se neste experimento ser possível diminuir as concentrações do meio utilizado, sem prejuízos para o processo de propagação. Melhores resultados foram obtidos em meio de cultivo contendo 75% do MS e 6% de sacarose.

4 EXPERIMENTO B: AVALIAÇÃO DO EFEITO DE DIFERENTES NÍVEIS DE NITROGÊNIO E CONCENTRAÇÕES DE SACAROSE NO MEIO DE CULTURA PARA A PROPAGAÇÃO "IN VITRO" DE CRISÂNTEMO

OBJETIVO:

Objetivou-se estabelecer a melhor concentração de nitrogênio e de sacarose no meio de cultura, para a propagação "in vitro" de crisântemo.

4.1 MATERIAL E MÉTODOS

Desenvolveu-se o experimento no Laboratório de Cultura de Tecidos do Departamento de Agricultura da ESAL - Escola Superior de Agricultura de Lavras, em Lavras, Minas Gerais.

No ensaio foram utilizados explantes da região mediana da brotação (segmentos nodais com 2 gemas) da cultivar Orange Reagen de crisântemo, já estabelecida "in vitro". Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 6 x 7, com 4 repetições e 3 tubos por parcela.

A sacarose foi testada nas concentrações 0; 0,75; 1,5; 3,0; 6,0 e 12,0% e o nitrogênio total do meio, nas concentrações 0, 25, 50, 75, 100, 125, 150% baseando-se nos níveis propostos

por Murashige e Skoog (1962) (Tabela 3A). Os outros componentes do meio foram utilizados em 75% do MS, acrescido de 0,7% de ágar. O pH do meio foi ajustado para 5,8 autoclavando-o em seguida a 121°C, pressão de 1 atm por 20 minutos.

Os explantes foram inoculados em câmaras de fluxo laminar, em sala asséptica. Em cada tubo de ensaio (25 x 150 mm) contendo 15 ml de meio, inoculou-se um segmento nodal. Os tubos foram levados para sala de crescimento com temperatura de $26 \pm 1^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 16 horas de luz e 2500 lux de intensidade luminosa, permanecendo por 30 dias. Após este período, realizou-se a avaliação, observando-se número e tamanho (cm) dos brotos formados, número de folhas, número de raízes primárias, peso (g) da matéria seca da parte aérea e das raízes.

4.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 2 estão apresentados os resultados das análises de variância. As concentrações de nitrogênio e sacarose estudadas tiveram influência no desenvolvimento do crisântemo, afetando o número e tamanho dos brotos, número de folhas. O PMSpa e o número de raízes não foi influenciado pela interação destes dois fatores, mas por cada um isoladamente. O peso da matéria seca das raízes foi influenciado pela interação de nitrogênio e sacarose.

TABELA 2. Resumo das análises de variância para número e tamanho de brotos, número de folhas, peso da matéria seca da parte aérea e das raízes e número de raízes em função de níveis de sacarose e nitrogênio no cultivo "in vitro" de crisântemo. ESAL, Lavras/MG, 1994.

Causas da Variação	GL	Quadrados médios e significância					
		N.Brotos ^{1/}	Tan.Brotos ^{1/}	N.Folhas ^{2/}	PMSpa ^{1/}	N.Raízes ^{1/}	PMSraízes ^{1/}
Sacarose	5	0.1461659**	0.6646828**	6.6704643**	0.0062685**	0.3006969**	0.0000000
Nitrogênio	6	0.0449186**	0.3984376**	3.6503770**	0.0016090**	0.0716107*	0.0000000
Sacarose x Nitrogênio	30	0.0105571**	0.0277038**	0.4076932**	0.0006602	0.0389297	0.0000005**
Resíduo	126	0.0040867	0.0091707	0.0773393	0.0005170	0.0270563	0.0000002
CV(%)		2.51	3.72	10.91	1.09	7.11	0.018

1/ Dados transformados segundo raiz(x+5)

2/ Dados transformados segundo raiz(x+0)

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade

Na Figura 8, verifica-se que a formação de brotos é crescente até a concentração de 6% de sacarose e em meios com 50% da concentração de nitrogênio ou mais. Em meios sem nitrogênio ou com apenas 25%, há maior produção de brotos quando combinado com 3% de sacarose, assim como se observou no experimento onde se testou concentrações do meio e de sacarose. As concentrações de nitrogênio e sacarose apresentaram efeitos limitantes entre si, provavelmente em função da relação C:N.

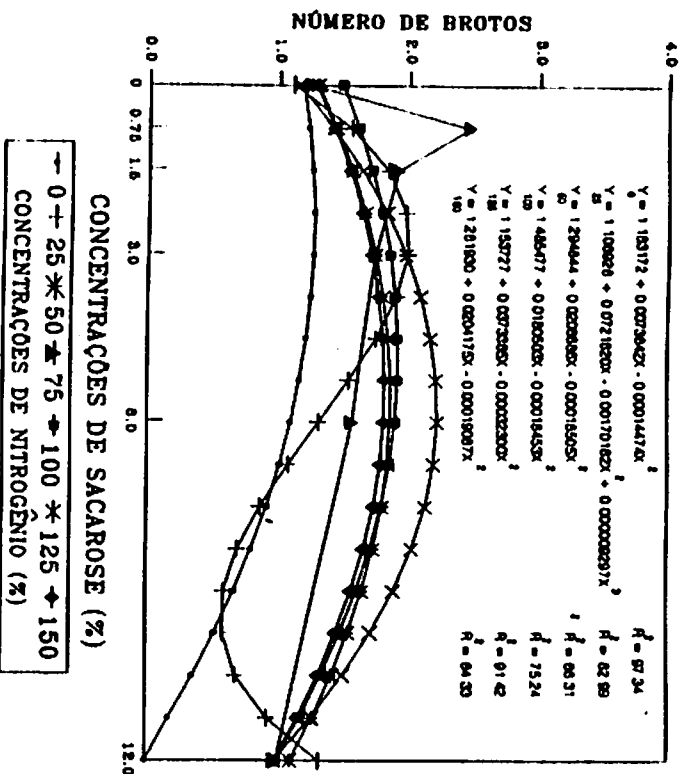


FIGURA 8 - Número de brotos obtidos em diferentes concentrações de nitrogênio e de sacarose no meio de cultura. ESAL, Lavras/MG, 1984.

Apesar de ocorrer a formação de brotos em meios sem nitrogênio, estes apresentavam-se com pequeno tamanho como pode se observar na Figura 9.

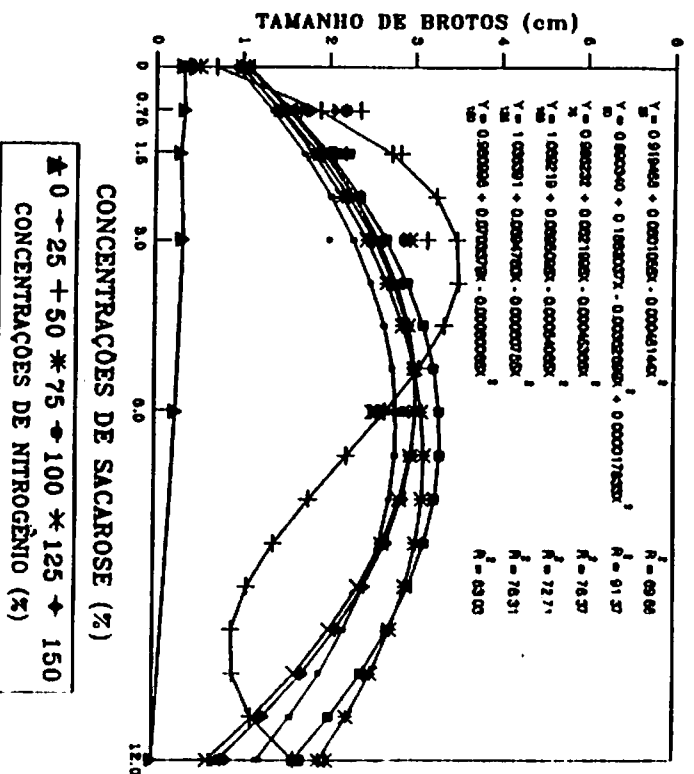


FIGURA 9 - Tamanho dos brotos formados em diferentes concentrações de nitrogênio e de sacarose no meio de cultura. ESAL, Lavras/MG, 1984.

O tamanho dos brotos formados foi incrementado até a concentração de 6% de sacarose, declinando após. Observou-se também a tendência de concentrações menores de nitrogênio serem efetivas para o crescimento dos brotos, quando combinadas com concentrações mais baixas de sacarose.

Brotos de maior tamanho foram obtidos utilizando-se 100% de nitrogênio e 6% de sacarose ou 50% de nitrogênio e 3% de sacarose no meio de cultura. As outras concentrações de nitrogênio (com exceção de 0%), apresentaram respostas muito próximas a estas. Roest e Bokelmann (1975) observaram boa formação de brotos em crisântemo utilizando as concentrações de nitrogênio entre 50% e 200% do MS, sendo a ideal 70%, próximo dos

valores observados neste trabalho.

O número de folhas formadas (Figura 10) foi maior em meios com 3% de sacarose, declinando em concentrações maiores. As concentrações de nitrogênio testadas não proporcionaram diferenças quanto ao número de folhas obtidas, à exceção do meio sem nitrogênio.

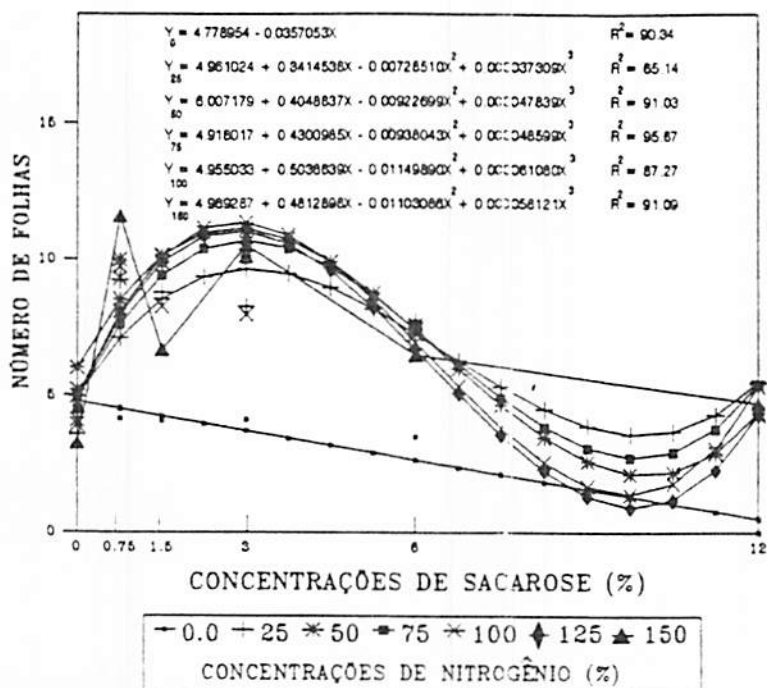


FIGURA 10 - Número de folhas formadas em diferentes concentrações de nitrogênio e de sacarose no meio de cultura. ESAL, Lavras/MG, 1994.

A matéria seca obtida da parte aérea apresentou maiores pesos em meios com concentrações de nitrogênio entre 50 e 125% (Figura 11). A Figura 12 representa o peso da matéria seca obtido em função de diferentes concentrações de sacarose, sendo os maiores valores obtidos em níveis próximos a 6%.

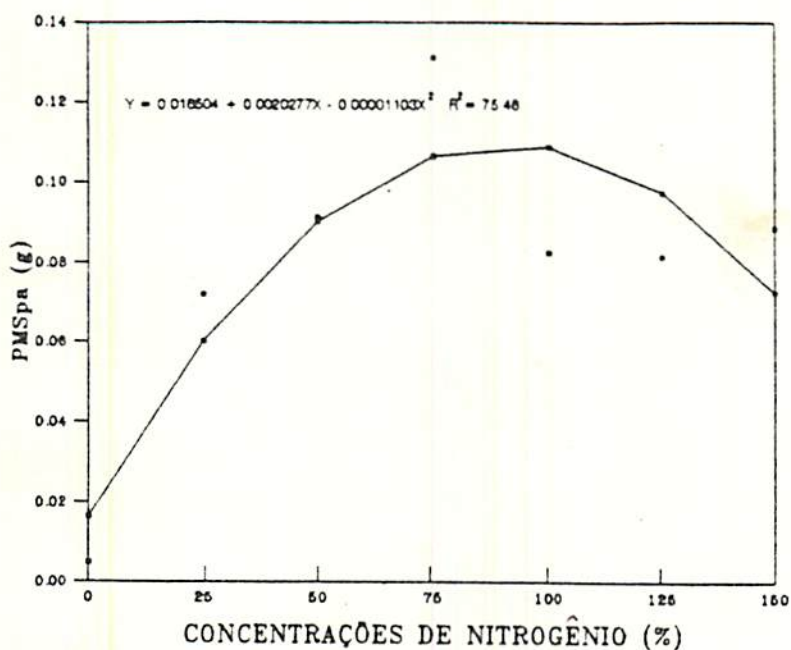


FIGURA 11 - Peso da matéria seca da parte aérea obtida em diferentes concentrações de nitrogênio no meio de cultura. ESAL, Lavras/MG, 1994.

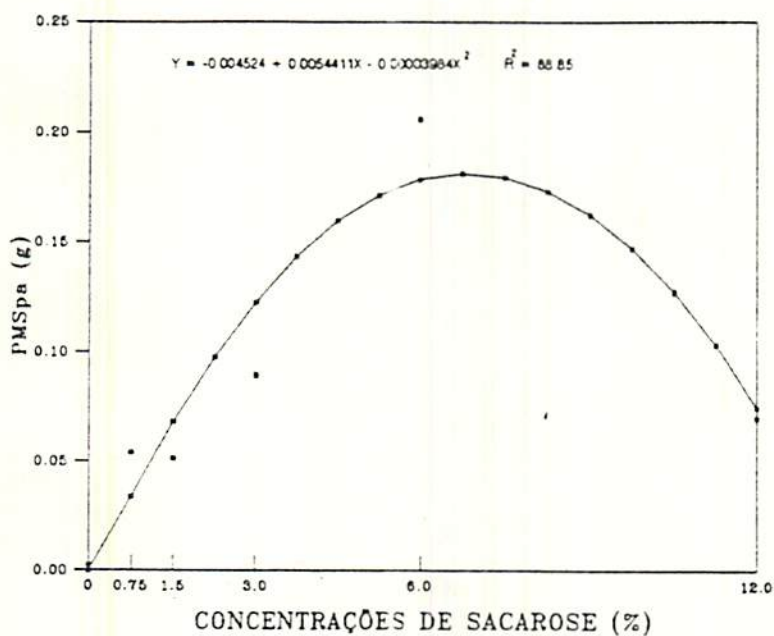


FIGURA 12 - Peso da matéria seca da parte aérea obtida em diferentes concentrações de sacarose no meio de cultura. ESAL, Lavras/MG, 1994.

A ocorrência de brotos em microestacas cultivadas em meios sem nitrogênio pode ser devido ao efeito de reservas do explante. No entanto, estes brotos não desenvolveram, por ser limitante a ausência deste nutriente no meio de cultura.

Maior número de raízes foi obtido nas concentrações de 75% de nitrogênio e 6% de sacarose (Figura 13 e 14). Meios com concentrações superiores a estas, proporcionaram menor formação radicular.

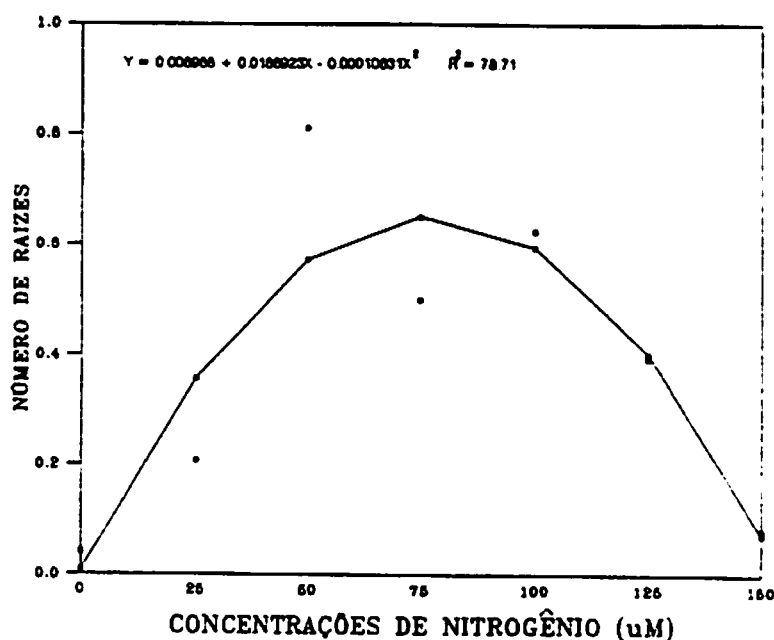


FIGURA 13 - Número de raízes formadas em diferentes concentrações de nitrogênio no meio de cultura. ESAL, Lavras/MG, 1994.

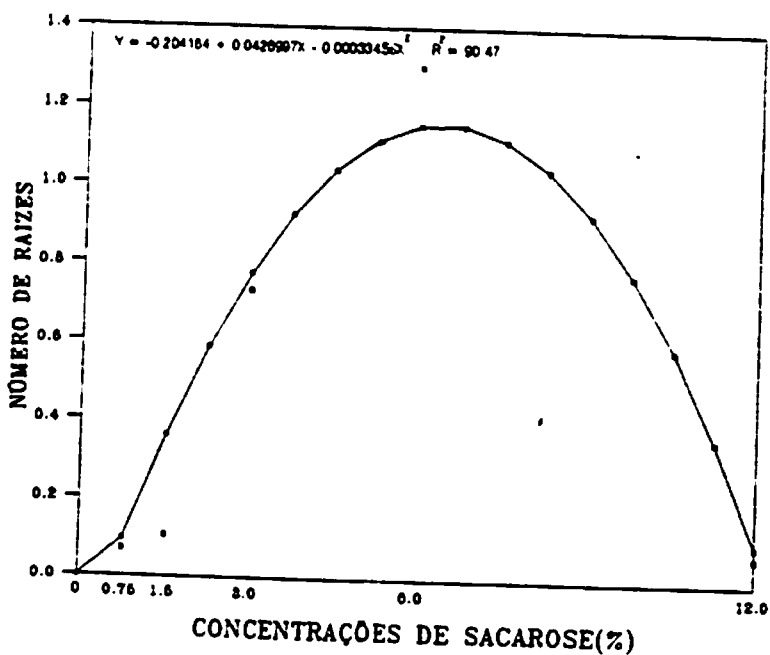


FIGURA 14 - Número de raízes formadas em diferentes concentrações de sacarose no meio de cultura. ESAL, Lavras/MG, 1994.

Shibli, Smith e Spomer (1992) já haviam registrado a essencialidade da sacarose para a formação de raízes. May e Trigiano (1991) citam que não ocorre enraizamento em meios com concentração menor que 9%. Os resultados obtidos neste experimento discordam destes autores, pois obteve-se melhor enraizamento em meios com 6% de sacarose, ocorrendo também em concentrações menores, embora em menor intensidade. Exceção ocorreu em meios sem nitrogênio ou sacarose, onde a formação de raízes foi totalmente inibida.

O peso da matéria seca das raízes (Figura 15) também apresentou melhores resultados em meios com 75% do MS e 6% de sacarose, o mesmo observado para número de raízes.

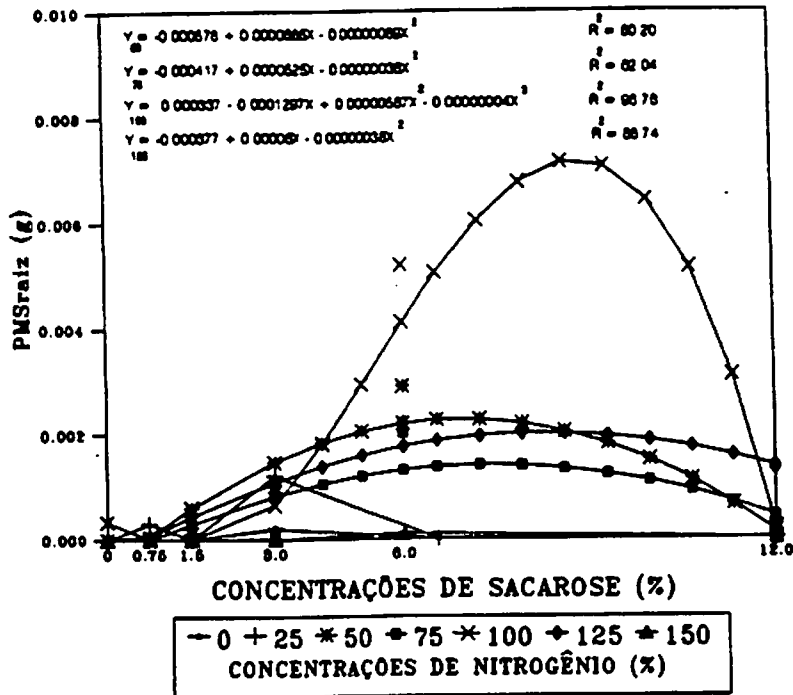


FIGURA 15 - Peso da matéria seca das raízes obtidas em diferentes concentrações de nitrogênio e de sacarose no meio de cultura. ESAL, Lavras/MG, 1994.

Nos meios com 12% de sacarose, observou-se acúmulo de antocianina nos segmento nodais, ocasionado por concentrações elevadas de sacarose, efeito este também observado por Do e Cormier (1991a,b). Este resultado pode ser atribuído à formação estrutural da antocianina, que possui moléculas de açúcar ligadas (Taiz e Zeiger, 1991).

4.3 CONCLUSÃO

A concentração de nitrogênio normalmente utilizada no meio MS pode ser reduzida a 75% quando combinada com 6% de sacarose, proporcionando bom desenvolvimento das plantas de crisântemo.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CHONG,C.; PUA, E.C. Carbon nutrition of Ottawa three apple rootstocks during stages of in vitro propagation. *Journal of Horticultural Science, Kent*, v.60, p.285-290, 1985.
- CUELLO,J.L.; WALKER,P.N.; HEUSER,C.W. Controlled in vitro environment for stage II micropropagation of chrysanthemum. *Transactions of the ASAE, General edition*, v.35, n.3, p.1078-1083, 1992.
- DO,C.B.; CORMIER,F. Accumulation of anthocyanins enhanced by a high osmotic potential in grape (*Vitis vinifera* L.) cell suspension. *Plant Cell Reports, Berlin*, v.9, p.143-146, 1990.
- DO,C.B.; CORMIER,F. Effects of low nitrate and high sugar concentration on anthocyanin content and composition on grape (*Vitis vinifera* L.) cell suspension. *Plant Cell Reports, Berlin*, v.9, p.500-504, 1991a.
- DO,C.B.; CORMIER,F. Effects of high ammonium concentrations on growth and anthocyanin formation in grape (*Vitis vinifera* L.) cell suspension cultured in a production medium. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture, Dordrecht*, v.27, p.169-174, 1991b.
- GAMBORG,O.L.; SHYLUK,D.P. Nutrition media and characteristics of plant cell and tissue cultures. In: THORPE,T.A. *Methods and applications in agriculture*. New York: Academic Press, 1981. p.21-44.
- GEORGE,E.F.; SHERRINGTON,P.D. *Plant propagation by tissue culture - Handbook and directory of commercial laboratories*. Eversley: Exegetics Limited, 1984. 583p.
- HU,C.Y.; WANG,P.J. Meristem, shoot tip and bud cultures. In: EVANS,D.A.; SHARP,W.R.; AMMIRATO,P.V.; YAMADA,Y. *Handbook of Plant Cell Culture - Techniques for Propagation and Breeding*. New York: Macmillan Publishing Company, 1983. v.1, p.177-277.
- HYNDMAN,S.G.; HASEGAWA,P.M.; BRESSAN,R.A. The role of sucrose and nitrogen in adventitious root formation on cultured rose shoots. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture, Dordrecht*, v.1, p.229-238, 1982.
- KARTHA,K.K.; PAHL,K.; LEUNG,N.L.; MROGINSKI,L.A. Plant regeneration from meristems of grain legumes: soybean, cowpea, peanut, chickpea and bean. *Canadian Journal of Botany, Ottawa*, v.59, p.1671-1679, 1981.

- LANE, W.D. In vitro propagation of *Spiraea bumalda* and *Prunus cistena* from shoot apices. *Canadian Journal of Plant Science*, Ottawa, v.59, p.1025-1029, 1979.
- LU, C.Y.; NUGENT, G.; WARDLEY, T. Efficient, direct plant regeneration from stem segments of chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium* Ramat. cv. Royal Purple). *Plant Cell Reports*, Berlin, v.8, p.733-736, 1990.
- MAY, R.A.; TRIGIANO, R.N. Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaves of *Dendranthema grandiflora*. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, Alexandria, v.116, n.2, p.366-371, 1991.
- MOE, R.; ANDERSEN, A.S. Stock plant environment and subsequent adventitious rooting. In: DAVIES, T.D.; HAISSIG, B.E.; SANKHLA, N. Adventitious root formation in cuttings, 1988. p.214-234.
- MURASHIGE, T. Plant propagation through tissue cultures. *Annual Review of Plant Physiology*, Palo Alto, v.25, p.135-166, 1974.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v.15, p.473-497, 1962.
- OZIAS-AKINS, P.; VASIL, I.K. Nutrition of plant tissue cultures. In: VASIL, I.K. Cell culture and somatic cell genetics on plants, - Cell growth, nutrition, cytodifferentiation and cryopreservation. New York: Academic Press, 1985. v.2. p.129-147.
- PIERIK, R.L.M. In vitro culture of higher plants. Dordrecht: Martinus Nyhoff Publishers, 1987. 344p.
- PRASAD, R.N.; CHATURVEDI, C. Effect of season of collection of explants on micropropagation of *Chrysanthemum morifolium*. *Biologia Plantarum*, The Hague, v.30, n.1, p.20-24, 1988.
- ROEST, S.; BOKELMANN, G.S. Vegetative propagation of *Chrysanthemum morifolium* Ram. in vitro. *Scientia Horticulturae*, Amsterdam, v.3, p.317-330, 1975.
- SHIBLI, R.A.; SMITH, M.A.L.; SPOMER, L.A. Osmotic adjustment and growth responses of three *Chrysanthemum morifolium* Ramat. cultivars to osmotic stress induced in vitro. *Journal of Plant Nutrition*, Montcello, v.15, n.9, p.1373-1381, 1992.
- SKIRVIN, R.M.; CHU, M.C. In vitro propagation of "Forever Yours" rose. *HortScience*, Wallingford, v.14, p.608-610, 1979.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Plant physiology*. Redwood City: The Benjamin/Cummings Publishing Company, 1991. 559p.

THORPE, T.A.; PATEL, K.R. Clonal propagation: Adventitious buds.
In: VASIL, I.K. Cell culture and somatic cell genetics of
plants - Laboratory procedures and their applications. New
York: Academic Press, 1984. v.1, p.49-60.

WELANDER, T. Effect of nitrogen, sucrose, IAA and Kinetin on
explants of *Beta vulgaris* growth in vitro. *Physiologia*
Plantarum, Copenhagen, v.36, p.7-10, 1976.

CAPITULO III

EFEITO DE CONCENTRAÇÕES DE ÁGAR E NÍVEIS DE PH NA PROPAGAÇÃO
"IN VITRO" DE CRISÂNTEMO

CAPITULO III: EFEITO DE CONCENTRAÇÕES DE ÁGAR E NÍVEIS DE pH NA PROPAGAÇÃO "IN VITRO" DE CRISÂNTEMO

1 RESUMO

O experimento foi realizado com o objetivo de avaliar o comportamento do crisântemo em diferentes níveis de pH e meios com diferentes consistências. Utilizaram-se meios com 0,0; 0,35; 0,7 e 1,05% de ágar combinados com pH ajustado para 4,6; 5,0; 5,4; 5,8; 6,2; 6,6 e 7,0. Nenhuma diferença foi observada nos tratamentos testados para produção de brotos e tamanho dos brotos formados. Mas devido às dificuldades de se utilizar meios líquidos ou semi-sólidos recomenda-se a utilização de 0,7% de ágar e ajustar o pH em 5,8 para proporcionar consistência adequada ao meio.

OBJETIVO

O trabalho teve como objetivo estabelecer um valor de pH para o cultivo da variedade de crisântemo Orange Reagen, assim como uma concentração de ágar adequada no meio de cultura.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Ágar

O sucesso da utilização de meio líquido ou sólido depende da espécie cultivada (George e Sherrington, 1984). Em meios líquidos torna-se necessário a utilização de suportes para os explantes, como os confeccionados com papel de filtro - "Pontes de Heller". Este método de suporte é excelente para a aeração dos tecidos, porém requer tempo para a preparação e inserção nos tubos de ensaio, sendo utilizados apenas em preparações especiais e não na rotina de micropropagação (George e Sherrington, 1984). Hussey (1986) observou também que os meios líquidos têm menor concentração de oxigênio, ficando as plantas mais sujeitas à vitrificação, e ainda, como houve um contato mais íntimo entre a planta e o meio, a concentração dos nutrientes e reguladores de crescimento deve ser revista. Nestes meios, Ghashgaie, Brenckmenn e Saugier (1991) observaram crescimento anormal de explantes de roseira, os quais apresentaram-se

pequenos, suculentos, translúcidos, mal formados e frágeis.

Os meios líquidos possuem a vantagem de serem preparados com maior rapidez e menor custo em relação aos meios sólidos e ainda, segundo Caldas, Haridasan e Ferreira (1980), apresentam maior homogeneidade. Short, Warburton e Roberts (1987) observaram, no entanto, que plantas de crisântemo (cv. Pennine Real) cultivadas em meio líquido apresentaram maior incremento no crescimento do que quando cultivadas em meio sólido, possivelmente devido à maior troca gasosa ocorrente neste meio. Estes autores obtiveram plantas com tamanho médio de 4,0 cm e bom sistema radicular.

O ágar é o agente solidificante mais utilizado em preparo de meios sólidos e semi-sólidos (George e Sherrington, 1984; Pierik, 1987). As vantagens de sua utilização, conforme George e Sherrington (1984), se concentram no fato de que, ao ser adicionado à água forma um gel, apresentando estado líquido a 100°C e solidificando a 45°C, mantendo-se estável nas temperaturas de incubação. Apresenta ainda as vantagens de não ser digerido pelas enzimas das plantas e não reagir com os constituintes do meio de cultura.

A concentração ideal é variável, em geral se encontra em intervalo de 0,6 a 0,8% (Pierik 1987). Von Arnold e Eriksson (1984) sugerem como ideal a concentração de 0,5%. Davis et al. (1984), em estudo com cravo, obtiveram número satisfatório de brotações utilizando 0,4% de ágar. Estes autores observaram ainda que o crescimento em meio sólido foi mais eficiente do que em meio líquido.

Ghashghaie, Brenckmenn e Saugier (1991) observaram que

explantes de roseira cultivados em meio com $4,0 \text{ g.L}^{-1}$ (0,4%) de ágar apresentaram maior peso da matéria seca que os cultivados em meio líquido. O número de brotos obtidos foi baixo em meio líquido, sendo incrementado até a concentração de $5,5 \text{ g.L}^{-1}$ (0,55%) e decrescendo após. Segundo estes autores, em meios com baixas concentrações de ágar, a água e os nutrientes são mais prontamente disponíveis, o que favorece o crescimento das plantas.

A solidez de meio com ágar, é dependente, além da concentração utilizada, do cozimento e da acidez do meio. Em pH levemente ácido, comumente utilizado em cultura de tecidos, e concentração de ágar entre 0,5-1,0%, tem-se um meio semi-sólido (George e Sherrington, 1984). Em pH baixo (4,5 a 4,8) o meio não solidifica (Murashige, 1974; Pierik, 1987).

Em meios com concentração elevada de ágar, o explante tem menor contato com o meio, o que limita a retirada de nutrientes, afetando assim o desenvolvimento (Pierik, 1987). Short, Warburton e Roberts (1987) e Ghashghaie, Brenckmenn e Saugier (1991) observaram que concentrações elevadas de ágar tendem a influenciar negativamente o tamanho de brotos, número de folhas e formação de raízes em crisântemo e rosa.

Von Arnold e Eriksson (1984) cultivando *Picea abies* em meio com concentrações elevadas de ágar observaram menor alongamento dos brotos e ocorrência de necrose nas folhas e ápices. Lane (1978) observou inibição do crescimento radicular de *Spirea* e *Prunus* quando utilizou a concentração de 0,6% de ágar no meio de cultura. Arello (1991), estudando *Kielmeyera coriacea*,

obteve melhor enraizamento em meio com 0,3% de ágar, e redução no número de raízes formadas com o aumento da concentração de ágar. Resultados contrários foram observados por Kitto e Young (1981) em cultura de *Carrizo citrange*, na qual o enraizamento foi estimulado pela elevação da concentração de ágar. Pierik (1987) observou que o enraizamento pode ocorrer tanto em meio sólido como líquido, porém com maior intensidade em meio sem solidificante. O enraizamento em menor intensidade observado em meio com ágar pode ser devido, conforme Hu e Wang (1983), à pequena aeração e baixa razão de difusão de metabólitos tóxicos, o que não ocorre em meio líquido.

2.2 pH

A relativa acidez ou alcalinidade do meio é medida pelo pH. Esta medida é feita pela concentração de íons H^+ na solução. O pH pode influenciar componentes do meio e reguladores de crescimento, sais que serão removidos, e a eficiência da solidificação do ágar (George e Sherrington, 1984). Segundo Murashige e Skoog (1962), o pH em 5,7 a 5,8 mantém todos os sais na forma solúvel.

O pH do meio será alterado durante a cultura, mas um pH inicial deve ser estabelecido, segundo George e Sherrington (1984), para garantir a integridade do meio e um rápido desenvolvimento da cultura. George e Sherrington (1984) recomendam que o ajuste do pH seja feito utilizando-se NaOH ou HCl, quando todos os componentes do meio já estiverem misturados

e pouco antes da autoclavagem. Usualmente, o pH é ajustado para 5,0 em meios líquidos e 5,8 em meios sólidos (Thorpe e Patel, 1984). Segundo Pierik (1987), o pH no intervalo 5,0 a 6,5 é suficiente para o crescimento, com valor ideal 6,0. Conforme George e Sherrington (1984) e Pierik (1987), o crescimento "in vitro" ocorre com pH entre 4,0 e 7,2, sendo que valores inferiores a 4,5 ou superiores a 7,0 podem paralisá-lo.

O processo de autoclavagem afeta o pH e a redução do seu valor depende do valor aferido inicialmente, segundo Singha (1982), as variações ocorrem com maior intensidade em valores entre 5,2 e 5,8. Segundo Skirvin et al. (1986), em meios com pH ajustado entre 5,0 e 7,0, geralmente ocorre queda de 0,3 a 0,5 unidades. Pasqual, Ribeiro e Barros (1982) sugerem que para se obter pH 5,7 no meio de cultura, deve-se ajustá-lo 0,4-0,5 pontos acima antes do processo de autoclavagem. A medida em que se aumenta a concentração de ágar no meio, aumenta-se também a variação ocorrente de pH, o que Pasqual, Ribeiro e Barros (1982) atribuem a uma possível interação entre componentes do meio de cultura e ágar, induzindo assim a acidificação do meio. Esta observação contraria o que George e Sherrington definem para ágar, como sendo uma substância não reage com componentes do meio de cultura. A variação de pH no meio de cultura pode ser atribuída também à liberação de substâncias pela planta durante o processo de absorção de outros nutrientes e que tenham propriedades acidificantes.

O desenvolvimento da planta também pode afetar o pH. Este efeito foi demonstrado por Skirvin et al. (1986), onde meios com pH ajustado em 6,0 no início do cultivo apresentaram

redução média de pH em 0,5 unidades após 30 dias de cultivo.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Cultura de Tecidos do Departamento de Agricultura da Escola Superior de Agricultura de Lavras (ESAL), em Lavras, Minas Gerais.

Utilizou-se a cultivar Orange Reagen, já estabelecida "in vitro", e submetida à uniformização em meio MS, em concentração de 75%, 6,0% de sacarose. Nesse experimento utilizou-se como meio 75% do MS, acrescido de 6,0 % de sacarose. Os tratamentos foram constituídos de 0,0; 0,35; 0,7 e 1,05% de ágar combinados com pH ajustado em 4,6; 5,0; 5,4; 5,8; 6,2; 6,6 e 7,0, formando um fatorial 4 x 7, com 3 tubos por parcela e 4 repetições, em delineamento inteiramente casualizado.

Nos tratamentos que não continham solidificante (meio líquido), utilizou-se "pontes de Heller" para sustentação do explante. O ajuste de pH foi realizado utilizando NaOH ou HCl, antes da adição de ágar, padronizando com os tratamentos que recebiam agente solidificante. O meio foi esterilizado por processo de autoclavagem a 121°C, pressão de 1 atm por 20 minutos.

A inoculação dos explantes foi realizada em sala asséptica, utilizando câmara de fluxo laminar. Em cada tubo de

ensaio (25 x 150 mm) contendo 15 ml de meio de cultura, inoculou-se uma microestaca retirada da parte mediana de um broto, contendo duas gemas. O experimento foi conduzido em sala de crescimento com temperatura de $26 \pm 1^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo de 16 horas de luz e intensidade luminosa de 2500 lux.

Após um período de 30 dias efetuou-se a avaliação do experimento, através dos seguintes parâmetros: número e tamanho (cm) de brotos, número de folhas, peso da matéria seca (g) da parte aérea e número de raízes primárias. O pH foi medido após a adição de ágar, após a autoclavagem e após 30 dias de cultivo dos explantes.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os níveis de ágar e pH testados não apresentaram efeitos significativos quanto ao número e tamanho dos brotos formados e número de folhas. Entretanto, o peso da matéria seca da parte aérea foi influenciado pela interação destes dois fatores, além do número de raízes (Tabela 3).

TABELA 3. Resumo das análises de variância para número de brotos, tamanho de brotos, número de folhas, peso da matéria seca da parte aérea e número de raízes em função de diferentes níveis de ágar e pH no meio de cultura. ESAL, Lavras/MG, 1994.

Causas da Variação	GL	Quadrados médios e significância				
		N. Brotos ^{1/}	Tam. Brotos ^{1/}	N. Folhas ^{1/}	PMSpa ^{1/}	N. Raízes ^{2/}
Ágar	3	0.0001467	0.0367634	0.0544100 †	0.0000564 **	0.0070073
pH	6	0.0006079	0.0048459	0.0101783	0.0000138 **	0.0095926
Ágar x pH	18	0.0014885	0.0182804	0.0117360	0.0000078 **	0.0440203 †
Resíduo	84	0.0014889	0.0146209	0.0158358	0.0000025	0.0230609
CV (%)		1.568	4.595	3.567	0.071	5.073

1/ Dados transformados segundo raiz(x+10)

2/ Dados transformados segundo raiz(x+5)

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade

Em todos os níveis de pH ou concentrações de ágar observou-se a formação média de apenas um broto, proveniente do desenvolvimento de uma das gemas da microestaca. Os fatores testados também influenciaram o tamanho e número de folhas. Short, Warburton e Roberts (1987) ao contrário, registraram maior crescimento de plantas de crisântemo cultivadas em meio líquido. Estas diferenças de respostas podem ser atribuídas às

diferentes variedades utilizadas nos experimentos.

A variedade Orange Reagen apresentou, alta adaptação a meios com diferentes consistências, desenvolvendo bem tanto em meio líquido, semi-sólido (0,35% ágar) ou sólidos (0,7 ou 1,05% de ágar). As plantas oriundas de meio líquido apresentavam-se com bom aspecto, vigorosas e desenvolvimento normal, não sendo observados os problemas citados por Ghashghaie, Brenckmenn e Saugier (1991). Estes autores verificaram que microestacas de rosa cultivadas em meio líquido apresentavam-se pequenas, frágeis e mal formadas. Meios líquidos apresentam, no entanto, como limitação a necessidade de utilização de pontes de Heller para sustentação do explante, processo este inviável em produções comerciais devido ao tempo e mão de obra necessários.

Nos meios semi-sólidos (0,35% ágar) ocorreram problemas com a sustentação do explante, ficando estes inclinados ou sobrenadantes, ocasionando a formação de brotos invertidos. Nesta concentração de ágar (0,35%) combinada com pHs mais baixos, o problema de sustentação foi acentuado, pois a solidificação foi menor. Em nível mais elevado de ágar (1,05%) o meio se torna bastante rígido, dificultando a penetração do explante, embora não tenha afetado o desenvolvimento dos brotos. Short, Warburton e Roberts (1987) ao contrário, observaram que crisântemos cultivados em concentrações elevadas de ágar produziram brotos com menor tamanho e menor número de folhas.

O peso da matéria seca da parte aérea foi afetado significativamente pela interação entre concentrações de ágar e pH. Utilizando-se 0,35% de ágar, o peso diminuiu a medida que se

elevou o pH. Em outras concentrações de ágar, este parâmetro foi pouco afetado pelas variações de pH (Figura 16).

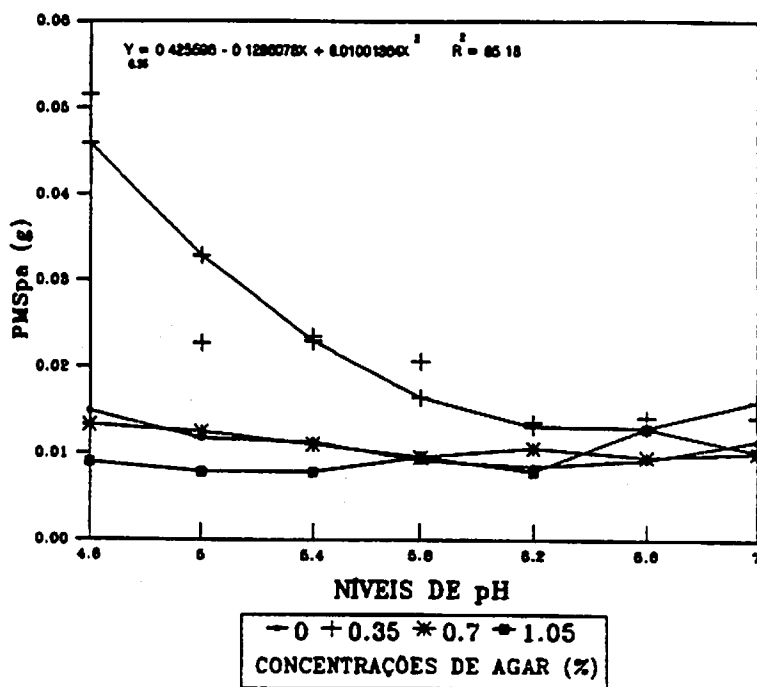


FIGURA 16 - Peso da matéria seca da parte aérea em diferentes concentrações de ágar e níveis de pH no meio de cultura. ESAL, Lavras/MG, 1994.

Resposta semelhante também foi observada por Ghashghaie, Brenckmenn e Saugier (1991), propagando roseira em meios com 0,4% de ágar. O aumento do peso pode ser atribuído ao aumento da absorção de nutrientes favorecida pela concentração de ágar e incremento da disponibilidade de água (Singha et al., 1985).

Para o número de raízes formadas, verificou-se também

interação entre as concentrações de ágar e níveis de pH, porém não houve variações significativas, sendo o número de raízes formadas semelhante nas diferentes concentrações de ágar.

Muitos autores (Hu e Wang, 1983; Pierik, 1987; Short, Warburton e Roberts, 1987 e Ghashghaie, Brenckmenn e Saugier, 1991) observaram menor intensidade de formação de raízes em meios com elevadas concentrações de ágar, sendo este efeito atribuído à menor aeração e menor difusão de metabólitos tóxicos.

A pequena influência do pH no desenvolvimento da planta pode ser atribuída a adaptações metabólicas desta variedade, pois sabe-se que ocorrem trocas iônicas através das raízes. Como se observa na Tabela 4, no final do período de 30 dias, independente do pH inicialmente ajustado, todos os tratamentos apresentavam valores de pH próximos e muito ácidos, podendo-se atribuir este efeito à eliminação de íons pela planta para promover o equilíbrio específico de pH do meio.

TABELA 4. Variações observadas de valores de pH nas fases de preparo do meio de cultura e trinta dias após a inoculação dos explantes, em relação aos valores inicialmente ajustados. ESAL. Lavras/MG, 1994.

CONC. DE ÁGAR(%):	0.0			0.35			0.7			1.05		
pH	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
4.60	4.75	4.31	4.35	5.37	4.71	3.31	5.44	5.02	3.63	5.54	5.19	3.96
5.00	5.12	4.54	3.55	5.53	5.01	3.90	5.62	5.19	3.65	5.70	5.35	3.94
5.40	5.40	4.90	5.62	5.75	5.29	3.60	5.82	5.44	3.39	5.86	5.51	3.40
5.80	5.80	5.37	3.49	6.01	5.59	3.54	6.06	5.60	3.50	6.07	5.70	3.51
6.20	6.24	5.79	3.62	6.34	5.91	3.49	6.34	5.87	3.87	6.35	5.95	3.54
6.60	6.63	6.15	3.91	6.68	6.21	3.52	6.69	6.21	3.39	6.66	6.18	3.75
7.00	7.00	6.42	3.85	7.00	6.49	3.67	7.01	6.64	3.77	6.96	6.46	3.90

A = pH medido após a adição de ágar ao meio de cultura
(Temperatura: 40° C)

B = pH medido em meio após o processo de autoclavagem
(Temperatura: 45° C)

C = pH medido 30 dias após o cultivo "in vitro".

OBS.: O pH inicial do meio foi ajustado em temperatura ambiente - 22° C.

Nessa tabela estão apresentadas ainda, as alterações de pH em função das fases de preparo do meio. Observa-se que há influência da adição de ágar, como já demonstrado por Pasqual, Ribeiro e Barros 1992, além do efeito da elevação de temperatura.

5 CONCLUSÃO

Concentrações de ágar ou níveis de pH não influenciaram número e tamanho de brotos formados, mas pelas dificuldades de se trabalhar com meios líquidos ou semi-sólidos, recomenda-se a utilização de 0,7% de ágar e ajuste do pH em 5,8 antes da autoclavagem, objetivando manter o meio em consistência adequada.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARELLO, E.F. Aspectos gerais do comportamento "in vitro" de *Kielmeyera coriacea* Martinus (Guttiferae): Produção e Enraizamento de Brotações. Lavras: ESAL, 1991. 148p.
- CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M.E. Meios nutritivos. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas. Brasília: EMBRAPA-CNPq/ABCTP, 1990. p.37-70.
- DAVIES, F.T. Shoot RNA, cambial activity and indolebutyric acid effectivity in seasonal rooting of juvenile and mature *Ficus pumila* cuttings. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v.62, p.571-575, 1984.
- GEORGE, E.F.; SHERRINGTON, P.D. Plant propagation by tissue culture - Handbook and directory of commercial laboratories. Eversley: Exegetics Limited, 1984. 593p.
- GHASHGHAIE, J.; BRECKMENN, J.; SAUGIER, B. Effects of agar concentration on water status and growth of rose plants cultured in vitro. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v.82, p.73-78, 1991.
- HU, C.Y.; WANG, P.J. Meristem, shoot tip and bud cultures. In: EVANS, D.A.; SHARP, W.R.; AMMIRATO, P.V.; YAMADA, Y. Handbook of Plant Cell Culture - Techniques for Propagation and Breeding. New York: Macmillan Publishing Company, 1983. v.1, p.177-277.
- HUSSEY, G. Problems and prospects in the in vitro propagation of herbaceous plants. In: WITHERS, L.A.; ALDERSON, P.G. Plant tissue culture and its agricultural applications. London: Butterworths, 1986. p.69-84.
- KITTO, S.L.; YOUNG, M.J. In vitro propagation of *Carrizo citrange*. *HortScience*, Wallingford, v.16, p.305-306, 1981.
- LANE, W.D. In vitro propagation of *Spiraea bumalda* and *Prunus cistena* from shoot apices. *Canadian Journal of Plant Science*, Ottawa, v.59, p.1025-1029, 1979.
- MURASHIGE, T. Plant propagation through tissue cultures. *Annual Review of Plant Physiology*, Palo Alto, v.25, p.135-166, 1974.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v.15, p.473-497, 1962.

- PASQUAL.M.; RIBEIRO,V.G.; BARROS,I.de. Influência da chapa aquecedora e autoclave sobre o pH do meio de cultura. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v.27, n.4, p.603-606, 1992.
- PIERIK,R.L.M. In vitro culture of higher plants. Dordrecht: Martinus Nyhoff Publishers, 1987. 344p.
- SHORT,K.C.; WARBURTON,J.; ROBERTS,A.V. In vitro hardening of cultured cauliflower and chrysanthemum plantlets to humidity. Acta Horticulturae, Skierniewice, v.212, p.329-335,1987.
- SINGHA,S. Influence of agar concentration on in vitro shoot proliferation of *Malus* sp. Almey and *Pyrus communis* Seckel. Journal of the American Society for Horticultural Science, Alexandria, v.107, p.657-660, 1982.
- SKIRVIN,R.M.; CHU,M.C.; MANN,M.L.; YOUNG,H.; SULLIVAN,J.; FERMANIAN,T. Stability of tissue culture medium pH as a function of autoclaving, time and cultured plant material. Plant Cell Reports, Berlin, v.5, p.292-294, 1986.
- THORPE,T.A.; PATEL,K.R. Clonal propagation: Adventitious buds. In: VASIL,I.K. Cell culture and somatic cell genetics of plants - Laboratory procedures and their applications. New York: Academic Press, 1984. v.1, p.49-60.
- Von ARNOLD,S.; ERIKSSON,T. Effects of agar concentration on growth and anatomy of adventitious shoots of *Picea abies* (L.) Karst. Plant Cell Tissue and Organ Culture, Dordrecht, v.3, p.257-264, 1984.

CAPITULO IV

**EFEITO DE DIFERENTES REGULADORES DE CRESCIMENTO SOBRE A
PROLIFERAÇÃO "IN VITRO" DE BROTOS DE CRISÂNTEMO**

CAPITULO IV - EFEITO DE DIFERENTES REGULADORES DE CRESCIMENTO SOBRE A PROLIFERAÇÃO "IN VITRO" DE BROTOS DE CRISÂNTEMO

1 RESUMO

Avaliou-se o efeito de concentrações de citocininas (BAP e Cinetina) combinadas com ANA e de GA3 na proliferação e alongamento dos brotos. A variedade estudada não apresentou respostas satisfatórias ao estímulo dos reguladores de crescimento quanto à produção de brotos. A citocinina BAP foi mais efetiva do que a cinetina na formação de brotos. Pode-se recomendar a utilização de 6,2 ou 12,4 uM de BAP, sem ANA, no meio de cultura, apenas para manter a produção média de brotos próximo de dois por explante. O ácido giberélico (GA3) não foi efetivo no alongamento de brotos.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Reguladores de Crescimento

A razão de proliferação de plantas determina a viabilidade da propagação "in vitro" de uma determinada espécie. Esta razão pode ser afetada por vários fatores como a composição química do meio e o estado fisiológico da planta. Os fatores químicos são determinados em grande parte pela concentração e tipo de reguladores de crescimento exógenos (Hu e Wang 1983).

Os reguladores de crescimento são substâncias que atuam em baixas concentrações, em vários processos do desenvolvimento, sendo também conhecidos como substâncias de crescimento de planta ou hormônios de plantas (George e Sherrington, 1984). Os principais reguladores de crescimento são as auxinas, citocininas, giberelinas, etileno e ácido abscísico. As auxinas e citocininas conforme descrevem George e Sherrington (1984) compõem os mais importantes reguladores de crescimento da morfogênese em cultura de tecidos.

O estímulo de respostas para diferenciação, crescimento, alongamento, multiplicação e enraizamento é regulado pela interação e balanço entre os reguladores de crescimento supridos ao meio e os produzidos endógenamente na planta (Grattapaglia e Machado, 1990).

2.1.1 Citocininas

As citocininas têm sua função primordial na divisão celular (Jacobsen, 1983; George e Sherrington, 1984; Pierik, 1987; Taiz e Zeiger, 1991). George e Sherrington (1984) ainda sugerem que estas substâncias podem estar envolvidas na síntese de proteínas fundamentais ao processo de mitose. As citocininas desempenham importante papel na indução de brotações (Gamborg, 1984; Pierik, 1987; Blakesley e Constantine, 1992).

O principal sitio de síntese das citocininas são as raízes (Hu e Wang, 1983), podendo também ocorrer síntese em pequenas quantidades em brotos crescendo "in vitro" (Koda e Okazawa, 1980).

Uma relação elevada citocinina/auxina segundo George e Sherrington (1984), Thorpe (1984) e Taiz e Zeiger (1991) é requerida para a indução direta de brotações nos explantes. Ao contrário, o processo de rizogênese exige uma relação menor sendo que a presença de concentrações elevadas de citocininas no meio de cultura, geralmente inibe a formação de raízes.

A combinação de tipo e concentrações de reguladores de crescimento é fundamental para o desenvolvimento "in vitro" (Malaure et al., 1991). No entanto, nenhum tipo ou concentração de regulador de crescimento pode ser ótimo para produção de brotos para todas as cultivares, mesmo sendo de uma mesma espécie, conforme descrevem Malaure et al. (1991).

As três citocininas mais frequentemente utilizadas em cultura de tecidos são BAP, C1N (Thorpe, 1984; Ozias-Akins e Vasil, 1985; Pierik, 1987) e 2iP (Hu e Wang, 1983; Gamborg, 1984;

Pierik, 1987). Dentre estas, o BAP é a mais utilizada (Blakesley, Lenton e Morgan, 1991; Blakesley e Constantine, 1992) e a 2iP, menos, devido ao seu custo mais elevado e menor efeito (Hu e Wang, 1983). Deve-se considerar no entanto, que uma citocinina pode ser inefetiva em algumas espécies e ativa em outras (Hu e Wang, 1983).

Prasad e Chaturvedi (1988), testando o efeito de BAP e cinetina em crisântemo, observaram que a cinetina, em todas as concentrações utilizadas, foi menos efetiva do que o BAP em concentrações similares, na formação de brotos e de calos.

Em um grande número de espécies estudadas, Evans, Sharp e Flick (1981) observaram que BAP e CIN foram utilizadas em concentrações variando entre 0,05 a 46,0 μM para a indução de brotações. Malaure et al. (1991), estudando diversas variedades de crisântemo, observaram que estas produziram bom número de brotos nas concentrações 2,2 - 46,0 μM de BAP combinadas com 2,6 - 21,5 μM de ANA, sendo os melhores resultados obtidos com 17,7 μM de BAP e 10,7 μM de ANA. Prasad e Chaturvedi (1988) não obtiveram brotações em meio sem adição de BAP, mesmo em presença de ANA, trabalhando com a cultivar de crisântemo Bural Sahni.

Blakesley e Constantine (1992), estudando várias espécies submetidas a condições idênticas "in vitro", observaram diferenças marcantes entre estas na retirada e absorção de BAP suprido ao meio de cultura. Uma das espécies estudadas foi o crisântemo, que apresentou baixos níveis de absorção de BAP.

Para a proliferação de brotos em segmentos nodais de crisântemo, Prasad e Chaturvedi (1988) obtiveram melhores

resultados utilizando 6,6 uM de BA e 0,59 uM ANA, produzindo uma média de $5,2 \pm 1,4$ brotos/explante. Além da formação de brotos, estes autores observaram ainda a formação de calos nos segmentos utilizados como explantes, quando cultivados em meio contendo 2,2 uM de BAP ou Cin e 1,16 uM de ANA. Lu, Nugent e Wardley (1990) cultivando estacas da cultivar Royal Purple, não observaram formação de calos ao testarem diversas concentrações de BAP e ANA.

Ahmed (1986) recomenda para o desenvolvimento de brotos em crisântemo as concentrações de 0,22 a 0,44 uM de BAP e 0,14 a 2,85 uM de AIA. Dentro desse intervalo, Bhattacharya et al. (1990) obtiveram média de 3,8 brotos por explante, utilizando 0,88 uM de BAP. Para as cultivares Bravo e Super Yellow, Roest e Bokelmann (1975) obtiveram como bons níveis para a formação de brotos adventícios 4,44 uM de BAP + 0,05 de uM AIA e 4,4 de uM BAP + 5,7 de uM AIA, respectivamente.

Donato e Perucco (1983) recomendam acrescentar ao meio de multiplicação 0,22 uM de BAP e 0,53 uM de ANA. Estes autores, estudando a proliferação de brotos a partir de segmentos nodais de crisântemo, obtiveram a seguinte produção de brotos/explante por variedade: 29 - White Marble, 47 - Bronze Marble, 31 - Coloured Marble, 51 - Red Marble, 42 - White Spider, 9 - Golden Spider, 13 - Snowdon. Por um período de 30 dias obtiveram em média a produção de 2,67 novos nós. Para a cultivar Royal Purple, Lu, Nugent e Wardley (1990) recomendam a utilização de 2,2 uM de BAP e 5,37 uM de ANA para a produção de brotos e 2,2 uM de BAP em meio para alongamento destes brotos. Em *C. coccineum*, Fujii e Shimizu (1990) obtiveram formação de 5-10 brotos/explante em meio

com 8,8 uM de BAP e 1,07 uM de ANA.

2.1.2 Auxinas

A biossíntese de auxinas ocorre em ápices jovens (Hu e Wang, 1983) e induzem o alongamento celular em raízes e brotos, indução da formação de raízes adventícias e, em altas concentrações, podem causar a desorganização do crescimento (Jacobsen, 1983; Pierik, 1987).

Segundo Hu e Wang (1983), a presença de auxinas externas não promove a proliferação de brotos, mas podem ter efeito no crescimento. Uma função possível das auxinas no meio é suprimir o efeito de altas concentrações de citocininas.

Em concentrações elevadas de auxina, ocorre formação de calos (Hasegawa, 1979; Pierik, 1987) na base do broto, inibindo a formação normal de raízes (Lane, 1979), assim, a formação de raízes adventícias é favorecida por baixas concentrações de auxinas (Pierik, 1987). Taiz e Zeiger (1991), ao contrário, sugerem que a iniciação radicular pode ser estimulada por altos níveis de auxinas. O alongamento das raízes é uma fase muito sensível à concentração de auxinas, podendo, conforme Thimann (1977) e Taiz e Zeiger (1991), ser inibido em presença de concentrações elevadas.

As auxinas 2,4-D, AIA, ANA e IBA (Thorpe, 1984; Pierik, 1987) são mais comumente utilizadas. Evans, Sharp e Flick (1981) observaram em várias espécies cultivadas em cultura de tecidos e produzindo brotações, que as auxinas AIA ou ANA foram

utilizadas nas concentrações 0,06 a 27,0 μM . Pierik (1987) recomenda a utilização das auxinas IBA, ANA e 2,4-D nas concentrações de 0,005 a 53,7 μM .

Estudando o efeito de ANA e AIA combinadas com BAP ou Cin, Prasad e Chaturvedi (1988) observaram que meios com 0,53 μM de ANA combinado com BAP em qualquer concentração foi superior a qualquer outra concentração de ANA ou do que o AIA para o enraizamento da cultivar Burbal Sahni. Donato e Perucco (1983) obtiveram 100% de enraizamento de brotos de crisântemo das variedades White Marble, Bronze Marble, Colored Marble, Red Marble, White Spider, Golden Spider e Snowdon, cultivadas em meio com 2,68 μM de ANA. O enraizamento de crisântemo tem sido observado nos meios MS (Ahmed, 1986; Fujii e Shinizu, 1990) ou MS + 0,53 μM de ANA (Ahmed, 1986).

Segundo McCown (1988), o fator que mais afeta a capacidade de enraizamento das microestacas é a estabilização da cultura de brotos. Uma vez que o estágio estabilizado foi atingido, o potencial biológico para enraizamento começa a funcionar. A resposta à indução do enraizamento por reguladores de crescimento pode estar condicionada a este fator.

Microestacas retiradas de brotos em crescimento geralmente enraizam mais rápido do que as obtidas de culturas senescentes (McCown, 1988) possivelmente devido à atividade do câmbio vascular (Davies, 1984).

2.1.3 Ácido Giberélico (GA3)

Um dos efeitos das giberelinas é estimular o crescimento de órgãos já formados, mas podem também inibir a iniciação de outros processos de formação de órgãos (Murashige, 1974). As giberelinas incrementam tanto a divisão celular como o alongamento das células, porque aumentam o número e tamanho das células formadas.

George e Sherrington (1984) observam que a adição de giberelina ao meio de cultura apresenta respostas adversas. Em algumas plantas, o regulador de crescimento GA3 pode inibir a formação de brotos e raízes, mesmo em meio contendo auxinas e citocininas. Em outras ocorre efeito contrário: é estimulado a formação dos brotos e raízes.

Poucas espécies, conforme Caldas, Haridasan e Ferreira (1990), apresentam respostas à indução "in vitro" por giberelina. Em geral, os trabalhos realizados com giberelina estudam o efeito deste regulador em embriões ou células, no entanto, raros são os trabalhos realizados testando o efeito do GA3 no crescimento de brotos "in vitro". Sabe-se que plantas "in vivo" apresentam respostas à aplicação de GA3, tendo o seu tamanho aumentado.

Earle e Langhans (1974), trabalhando com crisântemo, observaram que a utilização de 27,47 μM de GA3 estimulou a formação e o alongamento de brotos e folhas, sendo superior à utilização de cinetina isoladamente. Entretanto o melhor resultado foi obtido utilizando-se GA3 + 9,3 μM de cinetina.

3 EXPERIMENTOS A E B: EFEITO DE CITOCININAS (BAP E CINETINA) COMBINADAS COM ANA NA PROLIFERAÇÃO DE BRODOS DE CRISÂNTEMO "IN VITRO"

OBJETIVO:

Objetivou-se nestes experimentos, através da adição dos reguladores de crescimento BAP e cinetina ao meio de cultura, combinados com ANA, maximizar a multiplicação de brotos e conseqüentemente a eficiência da regeneração "in vitro".

3.1 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram desenvolvidos no Laboratório de Cultura de Tecidos do Departamento de Agricultura da Escola Superior de Agricultura de Lavras (ESAL), em Lavras, Minas Gerais.

Utilizou-se a cultivar Orange Reagen, que já se encontrava estabelecida "in vitro". As plantas foram submetidas à uniformização em meio contendo 75% do MS, 6% de sacarose e 0,7% ágar, para se evitar que eventuais resíduos pudessem estar presentes e influir nos resultados.

Conduziram-se dois experimentos para avaliar o efeito de BAP x ANA e cinetina x ANA, ambos em fatorial 7 x 4, delineamento inteiramente casualizado, em 4 repetições e 3 tubos

por parcela. As concentrações testadas de BAP foram 0,0; 1,5; 3,1; 6,2; 12,4; 24,8 e 49,7 uM e de cinetina, 0,0; 1,6; 3,2; 6,5; 13,0; 25,0; 52,0 uM. Em ambos os experimentos, combinaram-se as citocininas com 0,0; 0,075; 0,075 e 7,5 uM de ANA.

O meio de cultura básico utilizado foi 75% do MS, 6% de sacarose, 0,7% de ágar e pH ajustado em 5,8, utilizando NaOH e HCl. Distribuiu-se o meio em tubos de ensaio de dimensão 25 x 150 mm, colocando-se 15 ml em cada. Procedeu-se então a autoclavagem por 20 minutos, à temperatura de 121°C e 1 atm de pressão.

A inoculação dos tubos foi realizada em sala asséptica, em câmaras de fluxo laminar, utilizando como explante segmentos nodais com duas gemas, retirados da região mediana, sendo colocado um segmento por tubo de ensaio.

O experimento foi conduzido em sala de crescimento, com temperatura $26 \pm 1^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 16 horas de luz e 2500 lux de intensidade luminosa.

Após 30 dias, efetuou-se a avaliação do experimento, analisando-se número e tamanho (cm) de brotos, número de folhas, número de raízes, peso (g) da matéria seca de parte aérea e das raízes, peso (g) da matéria fresca dos calos.

3.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os reguladores de crescimento BAP e ANA apresentaram efeito significativo no desenvolvimento das plantas como pode ser

observado na Tabela 5. A interação de BAP e ANA afetou o número e tamanho dos brotos formados, número de folhas, PMSraizes e PMFcalos. O número de raízes não foi afetado pela interação desses dois reguladores de crescimento. O número de raízes foi influenciado apenas por concentrações de BAP.

TABELA 5. Resumo das análises de variância para número e tamanho de brotos, número de folhas, peso da matéria seca da parte aérea e de raízes, número de raízes e peso da matéria fresca dos calos em função de diferentes concentrações de BAP e ANA no meio de cultura. ESAL, Lavras/MG, 1994.

Causas da Variação	GL	Quadrados médios e significância						
		N. Brotos	Tam. Brotos	N. Folhas	PMSpa	N. Raízes	PMSraizes	PMFcalos
BAP	6	0.7013480 ^{**}	0.2705805 ^{**}	1.7993995 ^{**}	0.0000666 ^{**}	1.0234221 ^{**}	0.0000010 ^{**}	0.0415850 ^{**}
ANA	3	1.5931725 ^{**}	0.0334351 ^{**}	0.3348714 ^{**}	0.0004718 ^{**}	0.0089947	0.0000000	0.0126951 ^{**}
BAP x ANA	18	0.1036726 ^{**}	0.0082790 ^{**}	0.1008343 [*]	0.0000202 [*]	0.0141477	0.0000003 ^{**}	0.0034981 [*]
Resíduo	84	0.0263559	0.0035353	0.0573175	0.0000098	0.0101613	0.0000001	0.0017295
CV(%)		9.92	2.35	8.70	0.099	3.04	0.009	1.267
1/Transformação		raiz(x+0.5)	log(x+10)	log(x+0.5)	raiz(x+10)	raiz(x+10)	raiz(x+10)	raiz(x+10)

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade

Utilizando-se cinetina e ANA, apenas o número de raízes e não apresentou diferenças ocasionadas pelo uso combinado destes dois reguladores de crescimento, entretanto houve efeito quando utilizados isoladamente. A Tabela 6 apresenta a análise de variância deste experimento.

TABELA 6. Resumo das análises de variância para número e tamanho de brotos, número de folhas, peso da matéria seca da parte aérea e de raízes, número de raízes e peso da matéria fresca dos calos em função dos níveis de cinetina e ANA no meio de cultura. ESAL, Lavras/MG, 1984.

Causas da Variação	GL	Quadrados médios e significância						
		N.Brotos ^{1/}	Tam.Brotos ^{2/}	N.Folhas ^{1/}	PMSpa ^{1/}	N.Raízes ^{3/}	PMSraízes ^{3/}	PMFcalos ^{3/}
Cinetina	6	0.0566886**	0.5682177**	0.2993290**	0.0000704**	1.5571704**	0.0000026**	0.0139403**
ANA	3	0.1165291**	3.7801231**	1.4922434**	0.0006865**	0.1952389**	0.0000000	0.0202850**
CinetinaxANA	18	0.0068253**	0.1295997**	0.0820407**	0.0000303**	0.0309867	0.0000003**	0.0019050**
Resíduo	84	0.0025169	0.0429399	0.0296763	0.0000096	0.0225435	0.0000001	0.0005442
CV(%)		1.958	12.686	4.845	0.138	5.81	0.016	1.006

1/ Dados transformados segundo raiz(x+5)

2/ Dados transformados segundo raiz(x+0)

3/ Dados transformados segundo raiz(x+10)

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade

As citocininas utilizadas não foram efetivas na formação de brotos, como pode ser observado nas Figuras 17 e 18. Mesmo utilizando concentrações elevadas, o número de brotos formados foi pequeno (variando de 1 a 5 brotos/explante), principalmente comparando-se ao que Roest e Bokelmann (1975); Donato e Perucco (1983); Prasad e Chaturvedi (1988); Bhattacharya et al. (1990); Lu, Nugent e Wardley (1990) e Fujii e Shimizu (1990) obtiveram com outras variedades de crisântemo.

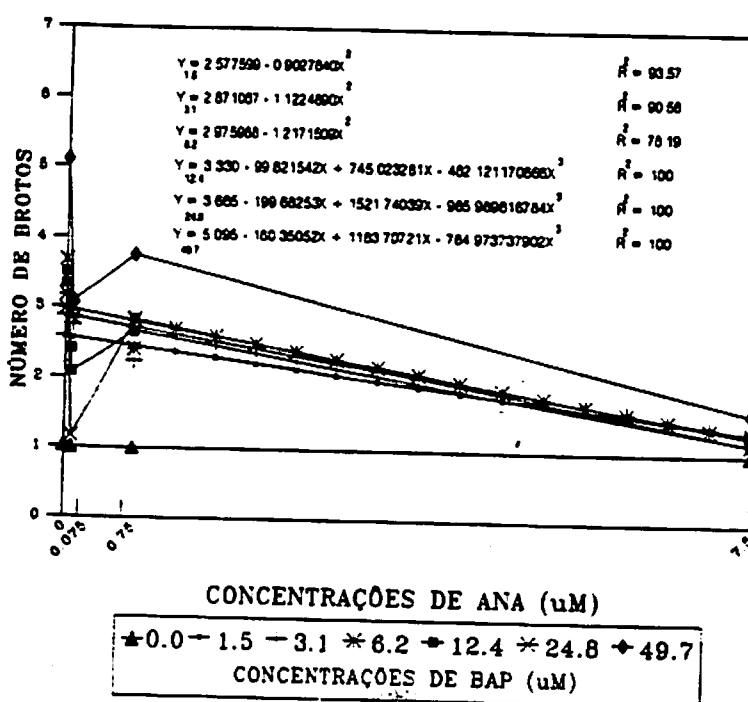


FIGURA 17 - Número de brotos obtidos em diferentes concentrações de BAP e ANA no meio de cultura. ESAL, Lavras/MG, 1994.

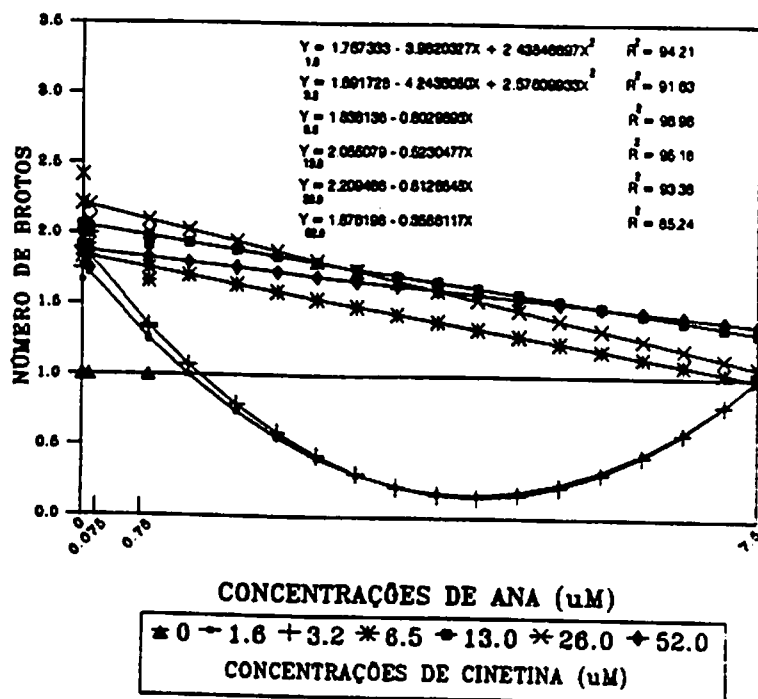


FIGURA 18 - Número de brotos obtidos em diferentes concentrações de cinetina e ANA no meio de cultura. ESAL, Lavras/MG, 1994.

Não foi observada a formação de rosetas nos cortes da estaca, estrutura característica de organogênese dos brotos. Os brotos formados originaram-se de brotações das gemas e às vezes da base da estaca.

Maior número de brotos foi obtido utilizando concentrações mínimas ou nula de ANA. Aumentando-se o nível desta auxina no meio de cultura, houve tendência de diminuir o número de brotos formados. Por outro lado, este efeito não foi observado na ausência de citocininas no meio de cultura. Observa-se nas Figuras 17 e 18 que ocorreu a produção de apenas um broto e foi constante, independente da concentração de ANA utilizada.

A cultivar Burbal Sahni estudada por Prasad e

Chaturvedi (1988) ao contrário, não apresentou brotações em meios sem citocinina, mesmo na presença de ANA, indicando a essencialidade dos reguladores de crescimento para esta variedade, porém este efeito não ocorre para a variedade testada no presente experimento.

Na Figura 17, observa-se que a produção de brotos foi superior a três por explante somente quando se utilizou acima de 6,2 uM de BAP e 0,0 de ANA.

A cinetina foi menos efetiva do que o BAP na proliferação de brotações (Figura 18), efeito este, já observado por Prasad e Chaturvedi (1988). Ocorreu uma produção média próxima de dois brotos por explante para todos os níveis utilizados, à exceção dos meios sem este regulador de crescimento.

O uso de concentrações elevadas de reguladores de crescimento não proporcionou acréscimo no número de brotos obtidos, principalmente considerando-se que dois dos brotos produzidos, eram provenientes das gemas presentes no segmento nodal.

A indução de brotações "in vitro" ocorre pelo desequilíbrio hormonal induzido por uma concentração adequada e balanceada de reguladores de crescimento adicionados ao meio. A resposta a este processo depende de fatores inerentes à planta. Blakesley e Constantine (1992) já haviam observado que o crisântemo tem pequena absorção de BAP "in vitro".

A ação de reguladores de crescimento depende da presença de receptores específicos a nível celular. Um receptor

crescimento, por exemplo), gerando respostas consequentes destas ligações (Napier e Venis, 1990; Taiz e Zeiger, 1991). A CBP - Cytokinin-binding protein = proteína ligante de citocinina (Brinegar, Stevens e Fox, 1985) ou também denominada de CBF - Cytokinin-binding factor = fator de ligação de proteína (Taiz e Zeiger, 1991) atua como receptor específico para citocininas. Brinegar, Stevens e Fox (1985) discutem a CBP não como um receptor, mas como uma proteína sequestradora de citocininas, regulando assim a concentração de citocininas.

Somente conhecendo-se a função das proteínas ligantes poderá se dizer se elas são ou não receptores. Napier e Venis (1990) recomendam a utilização dos termos "sítios ligantes" ou "proteínas ligantes" ao invés de receptores.

A eficiência das citocininas é dependente então da presença destas "proteínas ligantes" em quantidade e especificidade satisfatórias para provocar respostas desejáveis. Isto sugere que a ausência de respostas para a cultivar Orange Reagen, mediante a indução de citocininas pode ser devido à ausência destas "proteínas ligantes" específicas ou à presença destas em quantidades limitantes para proporcionar respostas desejáveis, como a proliferação de brotos.

Nas Figuras 19 e 20 observa-se que o tamanho de brotos foi influenciado pelas concentrações elevadas de citocininas e de ANA. Brotos de maior tamanho foram obtidos em meios sem reguladores de crescimento. Em segmentos nodais que produziram maior número de brotos, estes ocorreram em menor tamanho, ao contrário, onde obteve-se a formação de apenas um

broto, com maior desenvolvimento e sem influência das concentrações de ANA utilizadas.

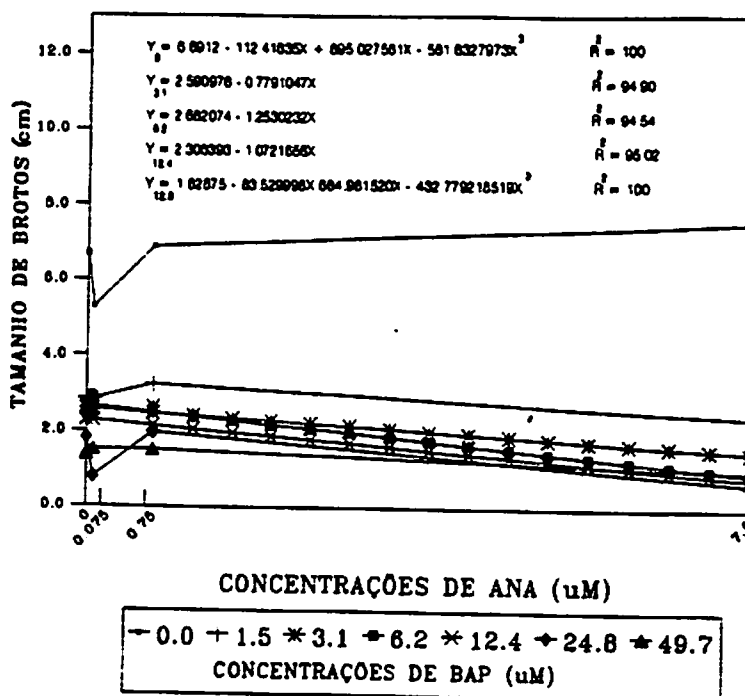


FIGURA 19 - Tamanho dos brotos formados em diferentes concentrações de BAP e ANA no meio de cultura. ESAL, Lavras/MG, 1994.

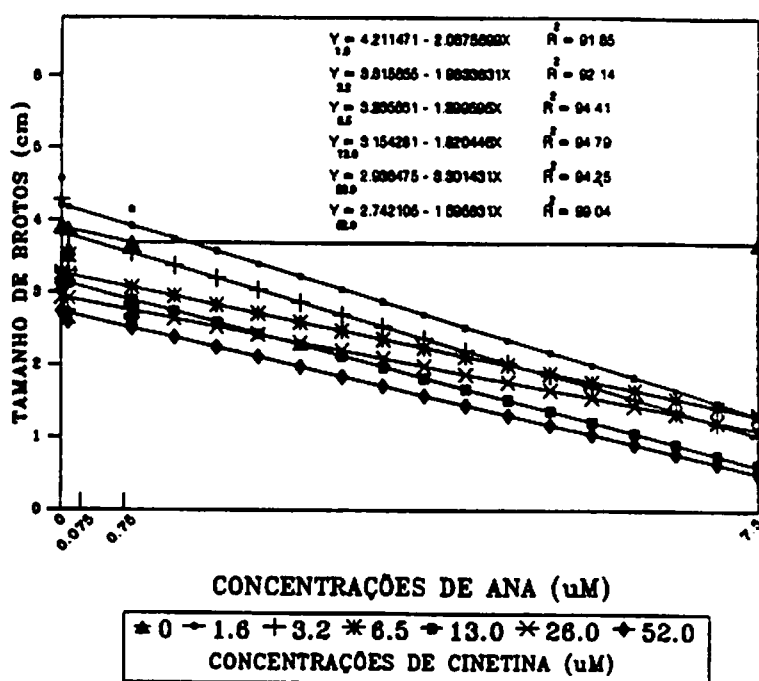


FIGURA 20 - Tamanho dos brotos formados em diferentes concentrações de cinetina e ANA no meio de cultura. ESAL, Lavras/MG, 1994.

O número de folhas observadas nos brotos foi maior nas concentrações mais baixas de BAP (0,0 a 12,4 uM) ou cinetina (0,0 ou 1,6 uM) (Figuras 21 e 23). Os brotos produzidos nestas concentrações foram os de maior tamanho, como já observado nas figuras 19 e 20. Em meios com menor concentração de citocininas, ocorre menor brotação, entretanto, o tamanho dos brotos proporciona a obtenção de maior número de segmentos nodais, e conseqüentemente, mais explantes. Em brotos com tamanho próximo a 3 cm, pode-se obter em média 7 novos explantes por repicagem.

As concentrações de ANA tiveram pequena influência sobre o número de folhas, como pode ser observado nas figuras 22 e 23, apresentando pequenas variações entre as concentrações de ANA utilizadas.

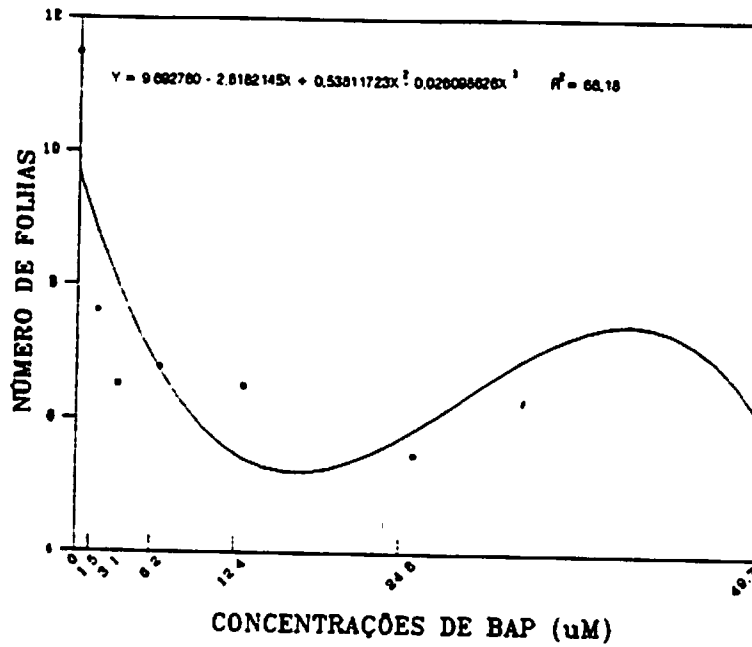


FIGURA 21 - Número de folhas formadas em diferentes concentrações de BAP no meio de cultura. ESAL, Lavras/MG, 1984.

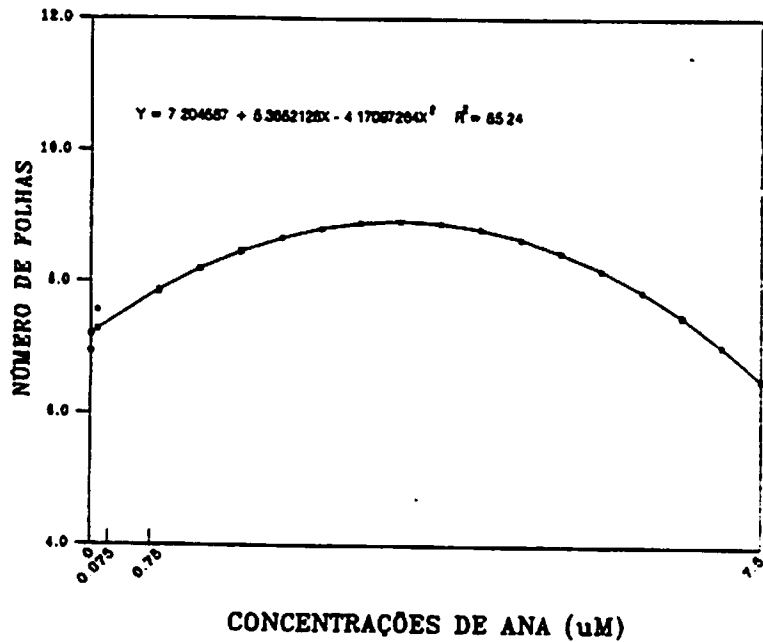


FIGURA 22 - Número de folhas formadas em diferentes concentrações de ANA no meio de cultura. ESAL,

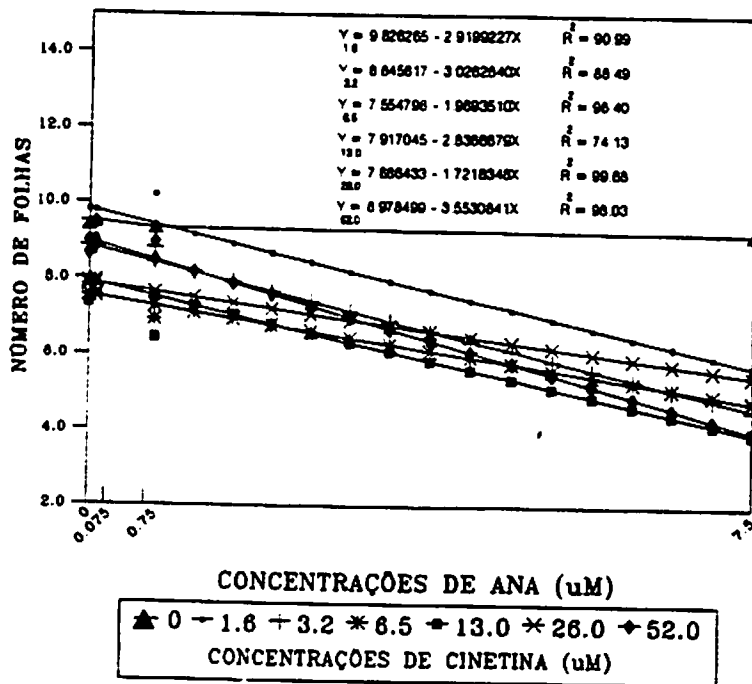


FIGURA 23 - Número de folhas formadas em diferentes concentrações de cinetina e ANA no meio de cultura. ESAL, Lavras/MG, 1994.

O PMSpa decresceu linearmente à medida que se elevou o nível de ANA no meio (Figuras 24 e 25). Em meios sem citocininas, no entanto, o PMSpa apresentou valores constantes, não sendo influenciado pelos níveis de ANA.

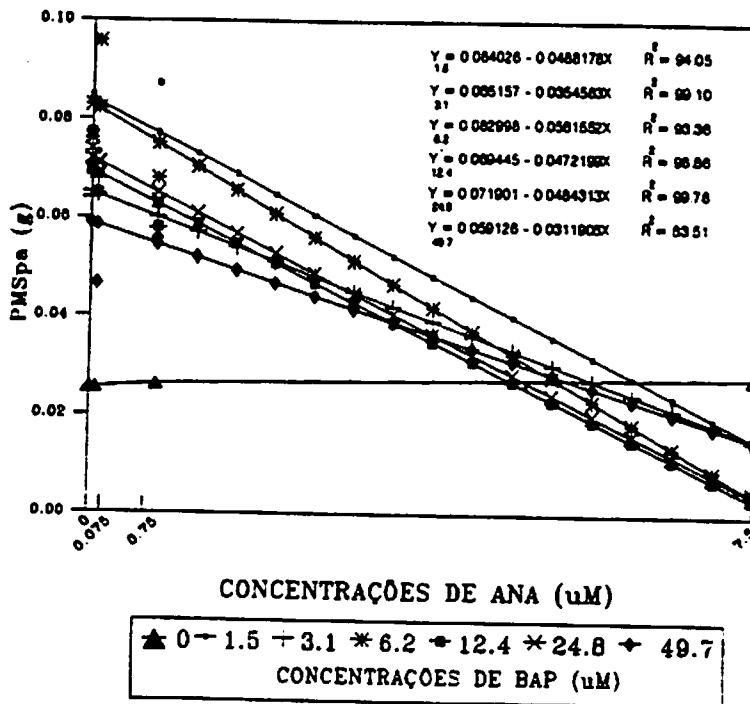


FIGURA 24 - Peso da matéria seca da parte aérea obtido em diferentes concentrações de BAP e ANA no meio de cultura. ESAL, Lavras/MG, 1994.

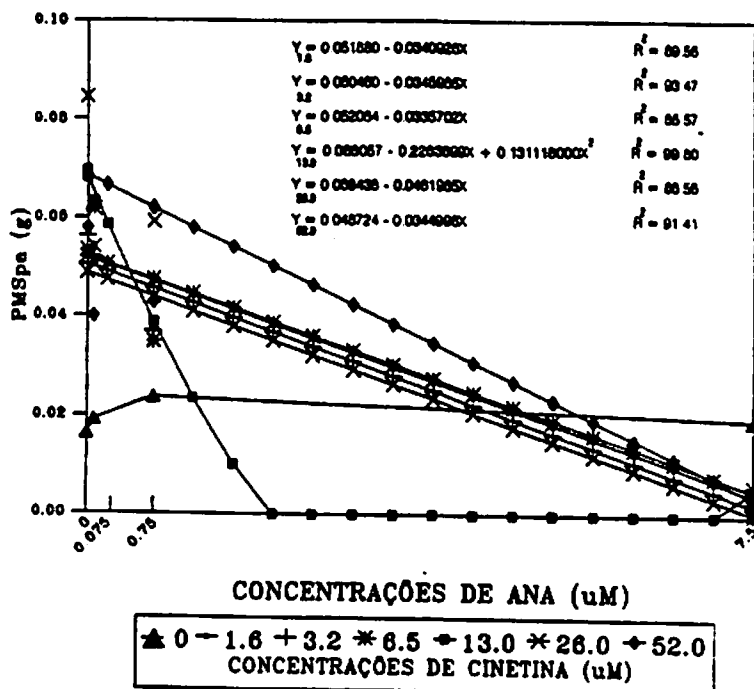


FIGURA 25 - Peso da matéria seca da parte aérea obtida em diferentes concentrações de cinetina e ANA no meio de cultura. ESAL, Lavras/MG, 1994.

Nas Figuras 26 e 27 nota-se que o aumento da concentração de BAP ou de ANA afetou o número de raízes formadas. Acima de 6,2 uM de BAP, a formação de raízes nos segmentos nodais é mínima, sendo que maior número de raízes foi obtido quando na ausência deste regulador. Também em meios sem ANA, obteve-se maior número de raízes, ocorrendo pequeno decréscimo a medida que se aumentou as concentrações desta no meio de cultura, sem contudo ocorrer inibição. Este resultado concorda com as observações de Hasegawa (1979), Pierik (1987) e Lane (1979), que observaram menor formação de raízes ou inibição em meios com elevadas concentrações de auxinas.

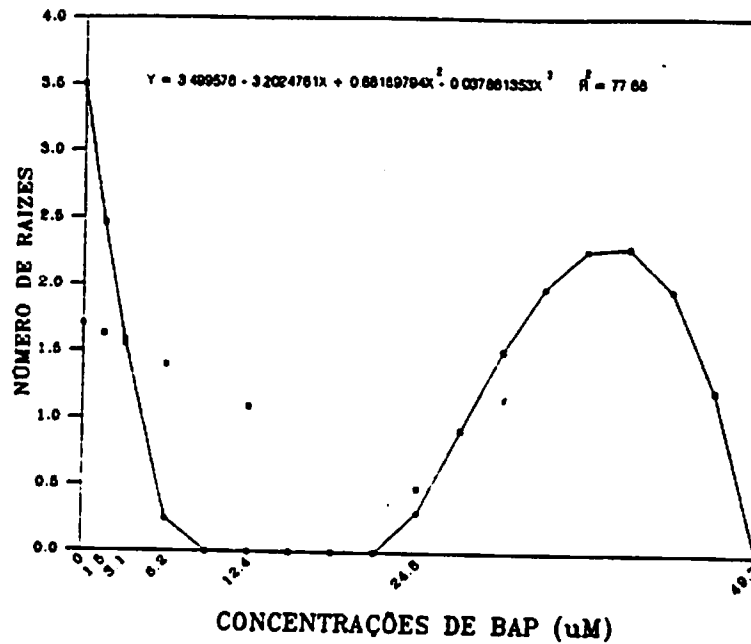


FIGURA 26 - Número de raízes formadas em diferentes concentrações de BAP no meio de cultura. ESAL, Lavras/MG, 1994.

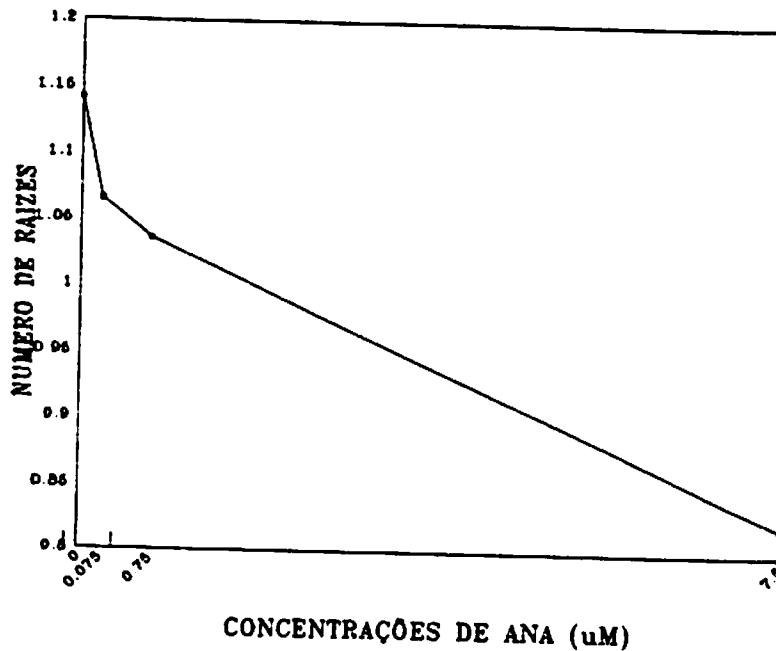


FIGURA 27 - Número de raízes formadas em diferentes concentrações de ANA no meio de cultura. ESAL, Lavras/MG, 1994.

Em meios com cinetina em concentrações superiores a 26,0 uM (Figura 28), ocorreu também inibição da formação de raízes, sendo maior número de raízes observado em meios onde não se utilizou a cinetina ou em baixa concentração (1,6 uM).

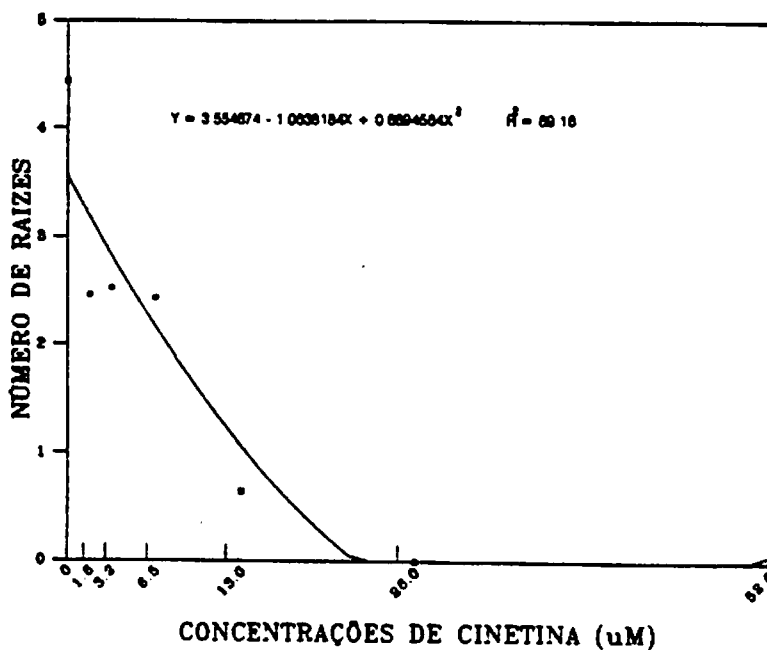


FIGURA 28 - Número de raízes formadas em diferentes concentrações de cinetina no meio de cultura. ESAL, Lavras/MG, 1994.

Ao contrário do que se observou em meios com BAP e ANA, nos meios com cinetina e ANA, o número de raízes não foi afetado pela elevação dos níveis de ANA (Figura 29). O número de raízes apresentou-se constante apesar de ter ocorrido uma menor formação em meios com 7,5 uM.

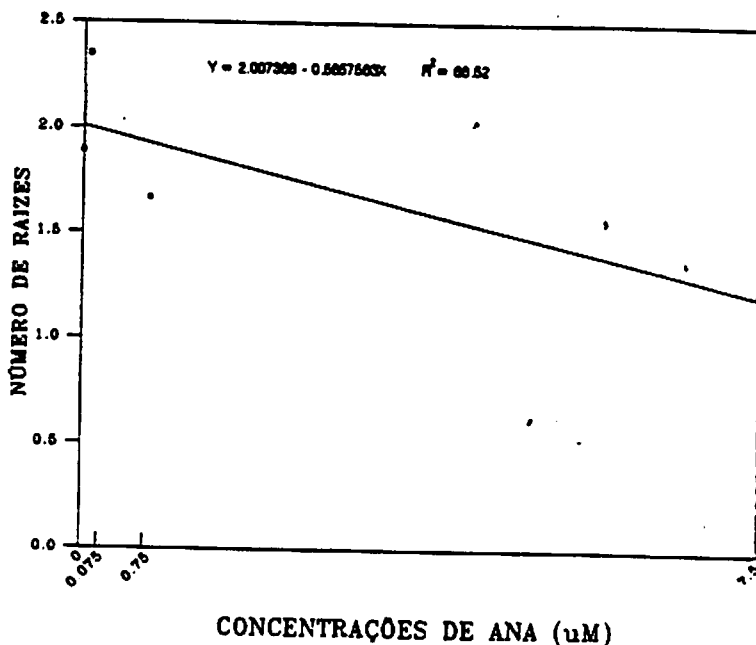


FIGURA 29 - Número de raízes formadas em diferentes concentrações de ANA no meio de cultura. ESAL, Lavras/MG, 1994.

Donato e Perucco (1983) e Prasad e Chaturvedi (1988) registraram como boas concentrações para enraizamento de crisântemo, 2,68 e 0,53 μM de ANA, respectivamente. Como observado neste experimento, concentrações mais baixas de ANA (0,0 a 0,75 μM) proporcionaram maior formação de raízes. O número de raízes formadas pode ser conseqüência das combinações de reguladores de crescimento ou da adaptação e estabilização dos explantes no meio de cultivo, conforme já observado por McCown (1988).

Nas figuras 30, 31 e 32 estão representados os resultados observados para peso da matéria seca das raízes. Em meios sem BAP observa-se que houve influência dos níveis de ANA, ao contrário, quando se utilizou BAP, não houve efeito da auxina. Pelo número de raízes obtidas, observa-se que foi pequena a formação de raízes em concentrações elevadas de citocininas, o que justifica o menor peso obtido nestes níveis. A cinetina não mostrou interação com ANA para o PMSraízes observado. Observa-se na Figura 32 que em concentrações elevadas de ANA obteve-se maiores valores.

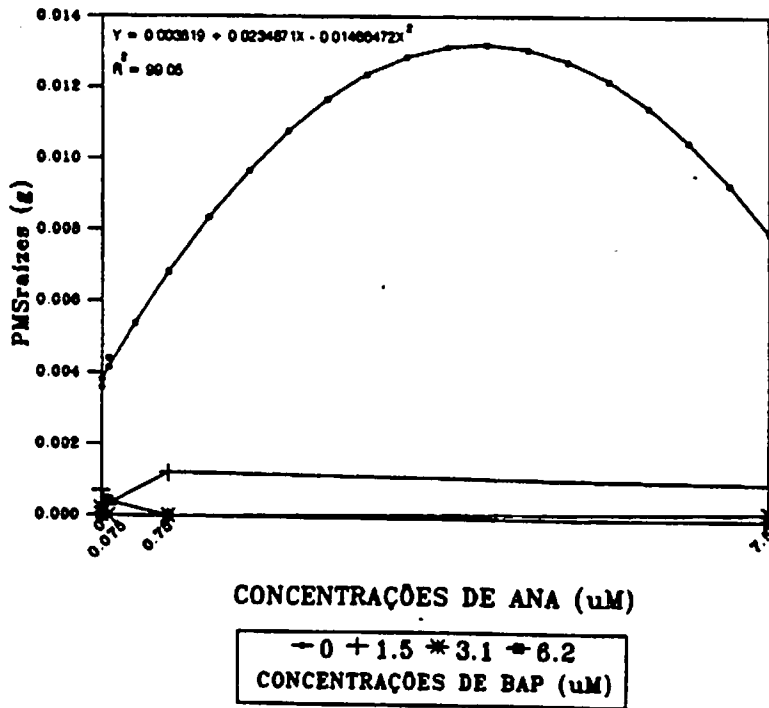


FIGURA 30 - Peso da matéria seca das raízes obtidas em diferentes concentrações de BAP e ANA no meio de cultura. ESAL, Lavras/MG, 1994.

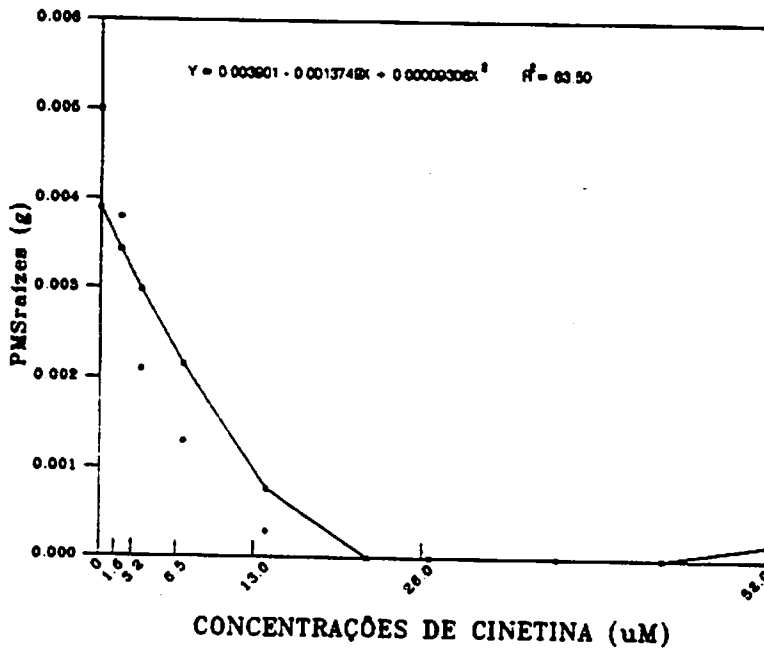


FIGURA 31 - Peso da matéria seca das raízes obtidas em diferentes concentrações de cinetina no meio de cultura. ESAL, Lavras/MG, 1994.

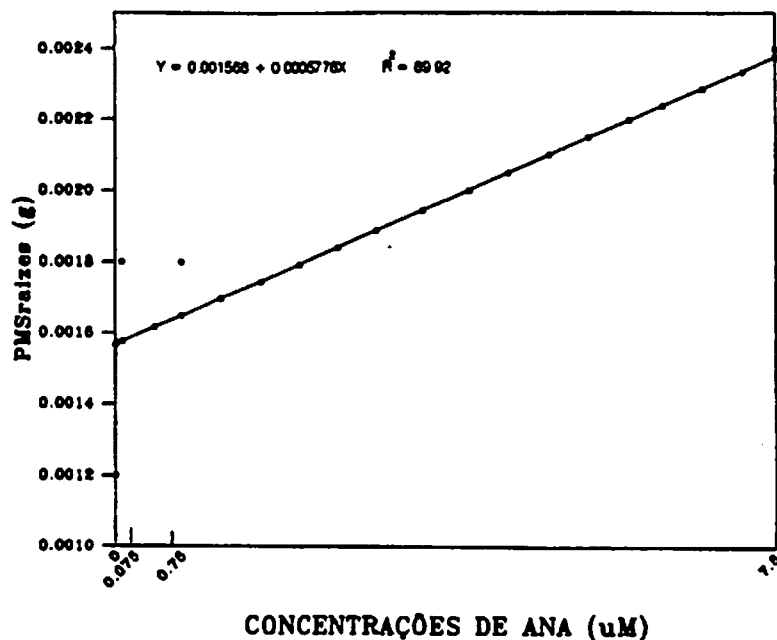


FIGURA 32 - Peso da matéria seca das raízes obtidas em diferentes concentrações de ANA no meio de cultura. ESAL, Lavras/MG, 1994.

Observou-se nestes experimentos a formação de calos na base das estacas sendo a presença de BAP ou cinetina no meio de cultura fundamental como pode ser observado nas Figuras 33 e 34. Em meios sem citocininas, observou-se formação de pequenos calos na presença de 7,5 uM de ANA ou mais.

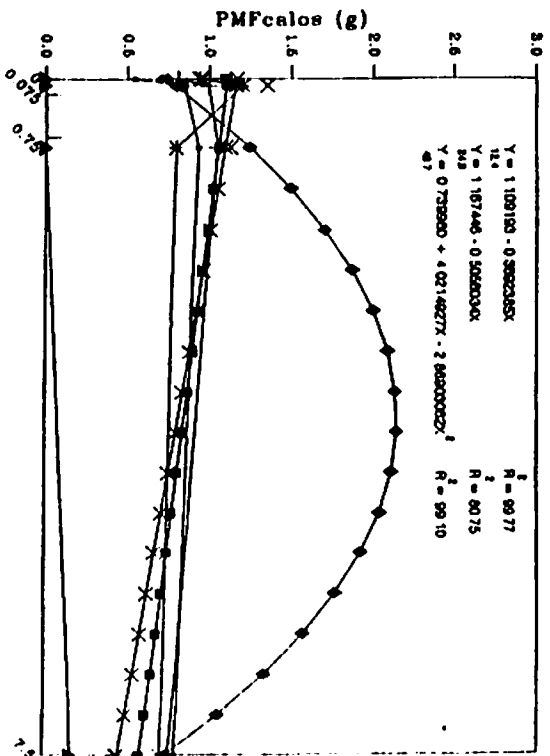


FIGURA 33 - Peso da matéria fresca dos calos obtidos em diferentes concentrações de BAP e ANA no meio de cultura. ESAL, Lavras/MG, 1994.

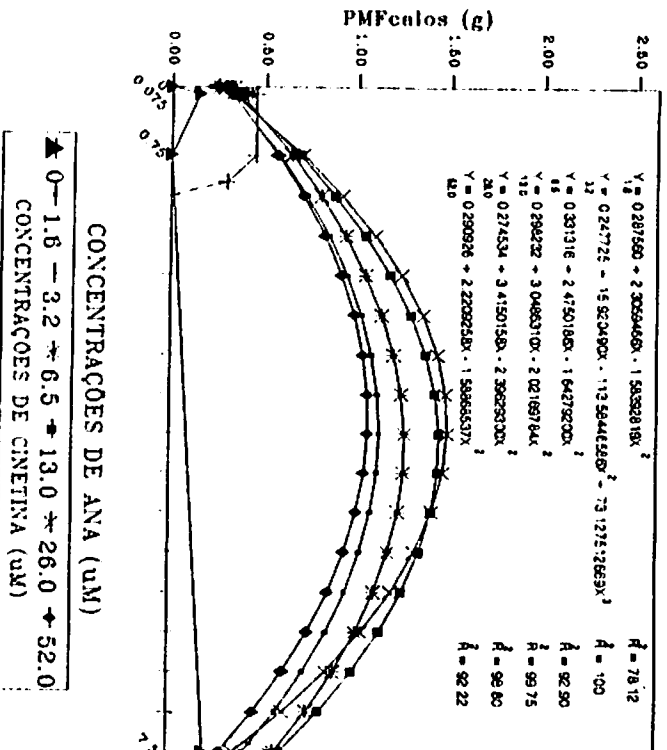


FIGURA 34 - Peso da matéria fresca dos calos obtidos em diferentes concentrações de cinetina e ANA no meio de cultura. ESAL, Lavras/MG, 1994.

Na formação de calos houve pequena influência das concentrações de ANA testadas, ao contrário do que Hasegawa (1979) e Pierik (1987) sugeriram, atribuindo a formação de calos a elevadas concentrações de auxinas.

A formação de raízes também não foi inibida pela presença de calos na base da estaca, como já observado por Lane (1979). O número de raízes foi influenciado principalmente pelas concentrações de ANA e citocininas e ocorreram em estacas com calos, embora em menor número.

3.3 CONCLUSÃO

Não houve efeito satisfatório das citocininas na proliferação de brotos. O BAP apresenta a tendência de maior efetividade do que a cinetina. Apesar do pequeno efeito dos reguladores de crescimento, pode-se recomendar a utilização de 6,2 ou 12,4 uM de BAP no meio de cultura, e não se utilizar ANA, para manter a produção de brotos média em dois/explante e o enraizamento destes.

4 EXPERIMENTO C: EFEITO DO ACIDO GIBBERELICO (GA3) SOBRE O DESENVOLVIMENTO DAS PLANTAS DE CRISÂNTEMO CULTIVADAS "IN VITRO"

OBJETIVO

Objetivou-se incrementar o crescimento de brotos através da adição do GA3, objetivando-se assim a produção de maior número de microestacas/planta.

4.1 MATERIAL E MÉTODOS

Desenvolveu-se o experimento no Laboratório de Cultura de Tecidos do Departamento de Agricultura da Escola Superior de Agricultura de Lavras (ESAL), em Lavras, Minas Gerais.

Para o ensaio foi utilizada a cultivar de crisântemo Orange Reagen, já estabelecida "in vitro" e submetida à uniformização em meio com 75% do MS, 6% de sacarose. O experimento foi instalado utilizando delineamento inteiramente casualizado, com 4 repetições e 3 tubos por parcela.

O meio básico constituiu-se de 75% do MS, 6% de sacarose, 0,7% de ágar, 6,2 uM de BAP, acrescido de 0,0; 1,37; 2,75; 5,5; 11,0; 22,0 e 44,0 uM de GA3. Ajustou-se o pH para 5,8 antes do processo de autoclavagem, realizado a 121°C e 1 atm, por 20 minutos.

Os explantes (segmentos nodais com duas gemas) foram

inoculados em câmara de fluxo laminar, colocando-se um por tubo de ensaio contendo 15 ml de meio de cultura. Conduziu-se o experimento em sala de crescimento, com temperatura $26 \pm 1^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo de 16 horas de luz e intensidade luminosa de 2500 lux.

Trinta dias após a instalação do experimento efetuou-se a avaliação, analisando-se os seguintes parâmetros: número e tamanho (cm) de brotos formados, número de folhas, número de raízes primárias, peso (g) da matéria seca da parte aérea e das raízes e peso (g) da matéria fresca dos calos.

4.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um dos objetivos de se utilizar GA3 em meio de cultura, é a obtenção de plantas de maior tamanho. Para a cultivar estudada no entanto, o GA3 não influenciou o tamanho dos brotos produzidos, assim como o número de brotos obtidos por explante. Observa-se na Tabela 7 que apenas o número de folhas e o peso da matéria seca da parte aérea apresentaram diferenças nas concentrações variadas de GA3.

TABELA 7. Resumo das análises de variância para número e tamanho de brotos, número de folhas, peso da matéria seca da parte aérea em função de diferentes concentrações de ácido giberélico (GA3). ESAL, Lavras/MG, 1984.

Causas da Variação	GL	Quadrados médios e significância ^{1/}			
		N.Brotos	Tam.Brotos	N.Folhas	PMSpa
GA3	6	0.0130969	0.0287335	0.1221661 **	0.0002130 **
Resíduo	21	0.0214778	0.0117474	0.0157438	0.0000336
CV (%)		8.93	8.45	5.44	0.79

1/ Dados transformados segundo raiz(x+0.5)

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade

Observa-se que não houve produção significativa de brotos, sendo que os brotos formados originaram da brotação simples das gemas presentes no segmento nodal.

Não houve diferença no tamanho dos brotos ocasionada pela utilização de GA3 no meio de cultura, com tendência de ocorrer brotos maiores quando não se utilizou este regulador de crescimento. Observou-se também que o número de folhas formadas não foi influenciado pelos diferentes níveis de GA3 utilizados.

O número de folhas já havia sido demonstrado por Earle e Langhans (1974) que fora incrementado com a utilização de GA3. Na variedade testada nesse experimento, no entanto, o número

de brotos também não apresentou respostas satisfatórias com as observadas por estes autores.

As concentrações de GA3 não influenciaram o peso da matéria seca (PMSpa) da parte aérea, porém este apresentou maiores valores em meios sem GA3.

Não se observou inibição da formação de parte aérea como já descrito por George e Sherrington (1984), mas a formação de raízes foi totalmente inibida pela adição de GA3 ao meio de cultura. O GA3 não teve efeito no alongamento dos brotos, como se esperava observar nesse experimento. A inefetividade do GA3 pode ser atribuída à ausência de receptores específicos para este regulador de crescimento, assim como já discutido por Brinegar, Stevens e Fox (1985) e Napier e Venis (1990) para a ação de citocininas. Não foi observado formação de calos, apesar de ter-se usado no meio de cultura BAP, e este ter proporcionado a formação de calos, como observado no experimento anterior. O GA3 pode ter efeito inibitório neste processo.

4.3 CONCLUSÃO

A adição de GA3 ao meio de cultura não proporcionou incremento no tamanho e número dos brotos formados, e ainda causou a inibição da formação de raízes.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMED, H.A. In vitro regeneration and propagation of meristem apices of *Chrysanthemum*. *Kerteszeti Egyetem Közleményei*, v.50, n.18 p.199-214, 1986.
- BHATTACHARYA, P.; DEY, S.; DAG, N.; BHATTACHARYA, B.C. Rapid mass propagation of *Chrysanthemum morifolium* by callus derived from stem and leaf explants. *Plant Cell Reports*, Berlin, v.8, p.439-442, 1990.
- BLAKESLEY, D.; CONSTANTINE, D. Uptake and metabolism of 6-benzyladenine in shoot cultures of a range of species. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Dordrecht, v.28, p.183-186, 1992.
- BLAKESLEY, D.; LENTON, J.R.; MORGAN, R. Uptake and metabolism of 6-benzylaminopurine in shoot cultures of *Gerbera jamesonii*. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v.81, p.343-348, 1991.
- BRINEGAR, A.C.; STEVENS, A.; FOX, F.E. Biosynthesis and degradation of a wheat embryo cytokinin-binding protein during embryogenesis and germination. *Plant Physiology*, Washington, v.79, p.706-710, 1985.
- CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M.E. Meios nutritivos. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. *Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas*. Brasília: EMBRAPA-CNPq ABCTP, 1990. p.37-70.
- DONATO, M.de; PERUCCO, E. Micropropagation of *Chrysanthemum* by means of lateral meristem stimulation. *Annali della Facoltà de Scienze Agrarie della Università degli Studi di Torino*, Torino, v.13, p.103-115, 1983.
- EARLE, E.D.; LANGHANS, R.W. Propagation of *Chrysanthemum* in vitro. II. Production, growth and flowering of plantlets from tissue cultures. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, Alexandria, v.89, n.4, p.352-358, 1974.
- EVANS, D.A.; SHARP, W.R.; FLICK, C.E. Growth and behaviour of cell culture. In: THORPE, T.A. (ed.). *Plant tissue culture: Methods and application in agriculture*. Academic Press, New York: 1981. p.45-113.
- FUJII, Y.; SHIMIZU, K. Regeneration of plants from achenes and petals of *Chrysanthemum coccineum*. *Plant Cell Reports*, Berlin, v.8, p.625-627, 1990.

- GAMBORG, O.L. Plant cell cultures: Nutrition and media. In: VASIL, I.K. Cell culture and somatic cell genetics of plants - Laboratory procedures and their applications. Orlando: Academic Press, 1984. v.1, p.18-26.
- GEORGE, E.F.; SHERRINGTON, P.D. Plant propagation by tissue culture - Handbook and directory of commercial laboratories. Eversley: Exegetics Limited, 1984. 583p.
- GRATAPAGLIA, D.; MACHADO, A.M. Micropropagação. TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas. Brasília: ABCTP/EMBRAPA-CNPq, 1990. p.99-170.
- HASEGAWA, P.M. In vitro propagation of rose. HortScience, Wallingford, v.14, p.610-612, 1979.
- HU, C.Y.; WANG, P.J. Meristem, shoot tip and bud cultures. In: EVANS, D.A.; SHARP, W.R.; AMMIRATO, P.V.; YAMADA, Y. Handbook of Plant Cell Culture, v.1 - Techniques for Propagation and Breeding. New York: Macmillan Publishing Company, 1983. p.177-277.
- JACOBSEN, H.J. Biochemical mechanisms of plant hormone activity. In: EVANS, D.A.; SHARP, W.R.; AMMIRATO, P.V.; YAMADA, Y. Handbook of plant cell culture - Techniques for propagation and breeding. New York: Macmillan Publishing Company, 1983. v.1, p.672-695.
- KODA, Y.; OKAZAWA, Y. Cytokinin production by *Asparagus* shoot apex cultured in vitro. Physiologia Plantarum, Copenhagen, v.49, p.193-197. 1980.
- LANE, W.D. The influence of growth regulators on root and shoot initiation from flax meristem tips hypocotyls in vitro. Physiologia Plantarum, Copenhagen, v.45, p.260-264, 1979.
- LU, C.Y.; NUGENT, G.; WARDLEY, T. Efficient, direct plant regeneration from stem segments of chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium* Ramat. cv. Royal Purple). Plant Cell Reports, Berlin v.8, p.733-736, 1990.
- MALAURE, R.S.; BARCLAY, G.; POWER, J.B.; DAVEY, M.R. The production of novel plants from florets of *Chrysanthemum morifolium* using tissue culture. 1. Shoot regeneration from ray florets and somaclonal variation exhibited by regenerated plants. Journal of Plant Physiology, London, p.139, p.08-13, 1991.
- MCCOWN, B.H. Adventitious rooting of tissue cultured plants. In: DAVIS, T.D.; HAISSIG, B.E.; SANKHLA, N. Adventitious root formation in cuttings. Portland: Dioscorides Press, 1988. p.289-302.
- MURASHIGE, T. Plant propagation through tissue cultures. Annual

- Review of Plant Physiology, Palo Alto, v.25, p.135-166, 1974.
- NAPIER, R.M.; VENIS, M.A. Receptors for plant growth regulators: recent advances. *Journal of Plant Growth Regulation*, New York, v.9, p.113-126, 1990.
- OZIAS-AKINS, P.; VASIL, I.K. Nutrition of plant tissue cultures. In: VASIL, I.K. *Cell culture and somatic cell genetics on plants - Cell growth, nutrition, cytodifferentiation and cryopreservation*. Orlando: Academic Press, 1985. v.2, p.129-147.
- PIERIK, R.L.M. *In vitro culture of higher plants*. Dordrecht: Martinus Nyhoff Publishers, 1987. 344p.
- PRASAD, R.N.; CHATURVEDI, C. Effect of season of collection of explants on micropropagation of *Chrysanthemum morifolium*. *Biologia Plantarum*, The Hague, v.30, n.1, p.20-24, 1988.
- ROEST, S.; BOKELMANN, G.S. Vegetative propagation of *Chrysanthemum morifolium* Ram. in vitro. *Scientia Horticulturae*, Amsterdam, v.3, p.317-330, 1975.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Plant physiology*. Redwood city: The Benjamin/Cummings Publishing Company, 1991. 559p.
- THIMANN, K.V. *Hormone action in the whole life of plant*. Amherst: University of Massachusetts Press, 1977.
- THORPE, T.A.; PATEL, K.R. Clonal propagation: Adventitious buds. In: VASIL, I.K. *Cell culture and somatic cell genetics of plants - Laboratory procedures and their applications*. Orlando: Academic Press, 1984. v.1, p.49-60.

CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados obtidos no presente trabalho permitem concluir que a cultivar de crisântemo Orange Reagen apresenta comportamento diferenciado no cultivo "in vitro". Esta cultivar não apresentou respostas satisfatórias em presença de reguladores de crescimento, não emitindo brotos, como normalmente ocorre com outras cultivares e espécies.

Observou-se ainda a insensibilidade desta cultivar à variações de pH e concentrações do ágar adicionado ao meio. No entanto, apresentou bom desenvolvimento em meios com menor concentração de nutrientes em relação ao MS (75%), inclusive quanto ao nível de nitrogênio. Este meio proporcionou melhor resultado quando combinado com 6% de sacarose.

A partir dos resultados obtidos pode-se sugerir o seguinte meio de cultivo "in vitro" para a cultivar Orange Reagen: 75% do MS, 6% de sacarose, 0,7% de ágar, 6,2 μ M de BAP e pH ajustado em 5,8.

A micropropagação comercial desta variedade só deverá ser sugerida para produção de plantas matrizes, pois o pequeno número de brotos obtidos eleva os custos de produção.

ANEXOS

TABELA 1A. Meio MS (Murashige & Skoog, 1962)

Componentes	Concentrações(mM)
NH ₄ NO ₃	20.60
KNO ₃	18.80
CaCl ₂ .2H ₂ O	2.89
MgSO ₄ .7H ₂ O	1.50
KH ₂ PO ₄	1.25
MnSO ₄ ,4H ₂ O	0.1000
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.0299
H ₃ BO ₃	0.1000
KI	0.0050
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.0010
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.0001
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.0001
Na ₂ .EDTA.2H ₂ O	0.1000
FeSO ₄ ,7H ₂ O	0.1000
Glicina	0.0266
Acido Nicotínico	0.0040
Piridoxina HCl	0.0024
Tiamina HCl	0.0003
MioInositol	0.55
Sacarose	87.60

TABELA 2A. Concentrações dos componentes do meio MS utilizadas segundo as porcentagens requeridas para os tratamentos. ESAL, Lavras/MG, 1984.

Componentes	TRATAMENTOS (%)						
	0	25	50	75	100	125	150
MACRONUTRIENTES (mM)							
NH ₄ NO ₃	0	5.150	10.30	15.45	20.60	25.75	30.90
KNO ₃	0	4.700	9.40	14.10	18.80	23.50	35.25*
CaCl ₂ .2H ₂ O	0	0.747	1.49	2.242	2.99	3.73	5.59*
MgSO ₄ .7H ₂ O	0	0.375	0.75	1.125	1.50	1.87	2.80*
KH ₂ PO ₄	0	0.312	0.62	0.937	1.25	1.56	2.34
MnSO ₄ .4H ₂ O	0	0.025	0.05	0.075	0.10	0.12	0.15
MICRONUTRIENTES (uM)							
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0	7.475	14.95	22.425	29.9	37.375	44.85
H ₃ BO ₃	0	25	50	75	100	125	150
KI	0	1.25	2.5	3.75	5.0	6.25	7.5
Na ₂ Mo ₂ .2H ₂ O	0	0.25	0.50	0.75	1.0	1.25	1.5
CuSO ₄ .5H ₂ O	0	0.025	0.050	0.075	0.10	0.125	0.150
CoCl ₂ .6H ₂ O	0	0.025	0.050	0.075	0.10	0.125	0.150
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	0	25	50	75	100	125	150
FeSO ₄ .7H ₂ O	0	25	50	75	100	125	150
AMINOÁCIDO (uM)							
Glicina	0	6.65	13.3	19.95	26.6	33.25	39.9
VITAMINAS (uM)							
Acido nicotínico	0	1.0	2.5	3.0	4.0	5.0	6.0
Piridoxina HCl	0	0.6	1.2	1.8	2.4	3.0	3.6
Tiamina HCl	0	0.075	0.15	0.225	0.3	0.375	0.45
MIOINOSITOL (uM)	0	137.5	275.0	412.5	550.0	687.5	825.0

TABELA 3A. Concentrações (mM) de nitrogênio total utilizado, em função dos tratamentos. ESAL, Lavras/MG, 1994.

NITROGÊNIO	TRATAMENTOS (%)						
	0	25	50	75	100	125	150
NH ₄ NO ₃	0	5,15	10,30	15,45	20,60	25,75	30,90
KNO ₃	0	4,70	9,40	14,10	18,80	23,50	28,20

APÊNDICE

SUMÁRIO

Tabela	Página
1	Análise de variância e regressão para número e tamanho de brotos, número de folhas, peso da matéria seca da parte aérea e das raízes em função de concentrações de meio MS e sacarose..... 105
2	Resumo das análises de variância e regressão para número de para níveis de sacarose e de meio MS..... 106
3	Análise de variância e regressão para número e tamanho de brotos, número de folhas, peso da matéria seca da parte aérea e das raízes em diferentes níveis de sacarose e nitrogênio no meio de cultura..... 107
4	Resumo das análises de variância e regressão para peso da matéria seca da parte aérea, número de raízes para diferentes níveis de sacarose e nitrogênio no meio de cultura..... 109
5	Análise de variância e regressão para peso da matéria seca da parte aérea e número de raízes em função de diferentes níveis de ágar e pH..... 110
6	Análise de variância e regressão para número de folhas em diferentes níveis de ágar e pH..... 111
7	Análise de variância e regressão para número e tamanho de brotos, número de folhas, peso da matéria seca da parte aérea e das raízes e peso da matéria fresca dos calos em função de diferentes concentrações de BAP e ANA no meio de cultura..... 112
8	Resumo das análises de variância e regressão para número de raízes em diferentes concentrações de BAP e ANA no meio de cultura..... 113
9	Análise de variância e regressão para número e tamanho de brotos, número de folhas, peso da matéria seca da parte aérea e das raízes, peso da matéria fresca dos calos em níveis diferentes de cinetina e ANA no meio de cultura..... 114
10	Resumo das análises de variância e regressão para número de raízes em diferentes níveis de cinetina e ANA no meio de cultura..... 115

- 11 Resumo das análises de variância e regressão de número de folhas em diferentes concentrações de ácido giberélico (GA3) no meio de cultura..... 116

TABELA 1. Análise de variância e regressão para número e tamanho de brotos, número de folhas, peso da matéria seca da parte aérea e das raízes em função de concentrações de meio MS e sacarose. ESAL, Lavras/MG, 1994.

Causas da Variação	GL	Quadrados médios e significância				
		N.Brotos	Tan.Brotos	N.Folhas	PMSpa	PMS raiz
Sacarose: MS 0 %	(5)					
linear	1	0.0002937	0.0020301	0.0962391	0.0000000	0.0000006
quadrática	1	0.0002588	0.0000201	0.0365345	0.0000000	0.0000000
cúbica	1	0.0001171	0.0000067	0.0097870	0.0000000	0.0000000
desvios regressão	2	0.0001432	0.0012730	0.0294737	0.0000000	0.0000000
Sacarose: MS 25%	(5)					
linear	1	0.0000006	0.0328864 **	0.0131332	0.0000030 †	0.0000010 **
quadrática	1	0.0003838	0.2103205 **	0.9175441 **	0.0000032 †	0.0000001
cúbica	1	0.0034744 †	0.1473080 **	0.1966969 **	0.0000007	0.0000001
desvios regressão	2	0.0009671	0.0414791 **	0.0825090 **	0.0000000	0.0000000
Sacarose: MS 50%	(5)					
linear	1	0.0039905 †	0.0007150	0.0353429	0.0000139 **	0.0000052 **
quadrática	1	0.0024511	0.1043478 **	0.4517306 **	0.0000009	0.0000005
cúbica	1	0.0001304	0.0877857 **	0.1057457 **	0.0000000	0.0000001
desvios regressão	2	0.0001365	0.0162924 **	0.0314040	0.0000001	0.0000000
Sacarose: MS 75%	(5)					
linear	1	0.0106662 **	0.0340292 **	0.0650999 †	0.0000248 **	0.0000012 **
quadrática	1	0.0015028	0.2069351 **	0.9863525 **	0.0000021 †	0.0000002
cúbica	1	0.0012692	0.0034139	0.0118158	0.0000005	0.0000002
desvios regressão	2	0.0005124	0.0268457 **	0.0264663	0.0000003	0.0000001
Sacarose: MS 100%	(5)					
linear	1	0.0034882 †	0.0289943 **	0.1514544 **	0.0000130 **	0.0000008 †
quadrática	1	0.0001902	0.0856739 **	0.5380341 **	0.0000019	0.0000000
cúbica	1	0.0000126	0.0484237 **	0.3451243 **	0.0000000	0.0000000
desvios regressão	2	0.0004748	0.0092523 †	0.1104462 **	0.0000001	0.0000000
Sacarose: MS 125%	(5)					
linear	1	0.0000000	0.0636970 **	0.1068710 **	0.0000001	0.0000000
quadrática	1	0.0000000	0.0566315 **	0.5077830 **	0.0000042 **	0.0000001
cúbica	1	0.0000000	0.0292126 **	0.1918654 **	0.0000010	0.0000000
desvios regressão	2	0.0000000	0.0152364 **	0.0368816 †	0.0000000	0.0000000

"Continua..."

"TABELA 1, Cont."

Sacarose: MS 150Z		(5)					
linear	1	0.000000	0.1124223 **	0.2062510 **	0.0000085	0.0000002	
quadrática	1	0.000000	0.0439397 **	0.5521783 **	0.0000002	0.0000001	
cúbica	1	0.000000	0.0165540 †	0.2339625 **	0.0000001	0.0000000	
desvios regressão	2	0.000000	0.0023066	0.0689602 **	0.0000213 **	0.0000022 **	
<hr/>							
Resíduo	126	0.0006734	0.0028060	0.0107721	0.0000005	0.0000001	
<hr/>							

TABELA 2. Resumo das análises de variância e regressão para número de raízes para níveis de sacarose e de meio MS. ESAL, Lavras/MG, 1994.

Causas da Variação	GL	Quadrados médios e significância	
		N. Raízes	
<hr/>			
Sacarose	(5)		
linear	1	2.8826232 **	
quadrática	1	2.1289375 **	
cúbica	1	0.8785709 **	
desvios regressão	2	0.4366685 **	
Resíduo		0.0182678	
<hr/>			
MS	(6)		
linear	1	0.0604281	
quadrática	1	0.4366141 **	
cúbica	1	0.1528261 **	
desvios regressão	3	0.0567988 *	
Resíduo		0.0182678	
<hr/>			

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade
 * Significativo ao nível de 5% de probabilidade

TABELA 3. Análise de variância e regressão para número e tamanho de brotos, número de folhas, peso da matéria seca da parte aérea e das raízes em diferentes níveis de sacarose e nitrogênio no meio de cultura. ESAL, Lavras/MG, 1994.

Causas da Variação	GL	Quadrados médios e significância			
		N.Brotos	Tam.Brotos	N.Folhas	PMSraiz
Sacarose:Nitrogênio 0 %	(5)				
linear	1	0.1862128 **	0.0133713	11.4939272 **	0.0000000
quadrática	1	0.0401689 **	0.0012600	1.9860838 **	0.0000000
cúbica	1	0.0034894	0.0000007	0.0948713	0.0000000
desvios regressão	2	0.0007948	0.0001141	0.0020172	0.0000000
Sacarose:Nitrogênio 25%	(5)				
linear	1	0.0040735	0.0060027	0.1156869	0.0000000
quadrática	1	0.0154565	0.3844044 **	1.3876701 **	0.0000000
cúbica	1	0.0686034 **	0.0309435	1.1894709 **	0.0000001
desvios regressão	2	0.0090464	0.0740154 **	0.6824496 **	0.0000001
Sacarose:Nitrogênio 50%	(5)				
linear	1	0.0048247	0.0018526	1.6641220 **	0.0000001
quadrática	1	0.0572371 **	0.4727810 **	1.5859016 **	0.0000010 **
cúbica	1	0.0056317	0.2442926 **	1.4209189 **	0.0000003
desvios regressão	2	0.0126854 †	0.0393553 †	0.2275658	0.0000000
Sacarose:Nitrogênio 75%	(5)				
linear	1	0.0758927 **	0.0833457 **	0.2534311	0.0000001
quadrática	1	0.0138415	0.3254263 **	1.5606665 **	0.0000003
cúbica	1	0.0219454 †	0.1204237 **	1.6365726 **	0.0000002
desvios regressão	2	0.0442809 **	0.0055669	0.1060750	0.0000000
Sacarose:Nitrogênio 100%	(5)				
linear	1	0.0288967 **	0.0275826	0.4478018 †	0.0000002
quadrática	1	0.0571681 **	0.4597260 **	1.5561074 **	0.0000024 **
cúbica	1	0.0018301	0.1191134 **	2.6170056 **	0.0000017 **
desvios regressão	2	0.0129552 †	0.0418952 †	0.4081091 **	0.0000001

"Continua..."

"TABELA 3, Cont."

Sacarose:Nitrogênio 125% (5)					
linear	1	0.0049838	0.0252178	0.5260520 **	0.0000004
quadrática	1	0.1685015 **	0.5988509 **	1.5674124 **	0.0000003
cúbica	1	0.0056490	0.1343140 **	2.0185255 **	0.0000001
desvios regressão	2	0.0057273	0.0336337 *	1.8900906 **	0.0000000
Sacarose:Nitrogênio 150% (5)					
linear	1	0.0114788	0.0092989	1.1433297 **	0.0000000
quadrática	1	0.0611728 **	0.5800969 **	1.7156448 **	0.0000000
cúbica	1	0.0054872	0.1092974 **	2.3551636 **	0.0000000
desvios regressão	2	0.0170085 *	0.0088819	0.3070688 *	0.0000000
<hr/>					
Resíduo	126	0.0040867	0.0091707	0.0773393	0.000002
<hr/>					

TABELA 4. Resumo das análises de variância e regressão de peso da matéria seca da parte aérea, número de raízes para diferentes níveis de sacarose e nitrogênio no meio de cultura. ESAL, Lavras/MG, 1994.

Causas da Variação	GL	Quadrados médios e significância	
		PMSpa	N.Raízes
Sacarose (5)			
linear	1	0.0052261**	0.0558800
quadrática	1	0.0227648**	1.3023837**
cúbica	1	0.0021547 *	0.1121905 *
desvios regressão	2	0.0005973	0.0165169
Resíduo	126	0.0005170	0.0270563
Nitrogênio (6)			
linear	1	0.0028604 *	0.0042740
quadrática	1	0.0045130**	0.3432280**
cúbica	1	0.0013391	0.0000050
desvios regressão	3	0.0003133	0.0273862
Resíduo	126	0.0005170	0.0270563

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade

TABELA 5. Análise de variância e regressão para peso da matéria seca da parte aérea e número de raízes em função de diferentes níveis de ágar e pH. ESAL, Lavras/MG, 1994.

Causas da Variação	GL	Quadrados médios e significância	
		PMSpa	N.Raízes
pH: Agar 0 %	(5)		
linear	1	0.0000024	0.0694247
quadrática	1	0.0000030	0.0000351
cúbica	1	0.0000001	0.0862285
desvios regressão	2	0.0000001	0.0203828
pH: Agar 0.35%	(5)		
linear	1	0.0001379**	0.0763992
quadrática	1	0.0000428**	0.0007551
cúbica	1	0.0000118 *	0.0028917
desvios	2	0.0000065	0.0531165
pH: Agar 0.7%	(5)		
linear	1	0.0000018	0.0058402
quadrática	1	0.0000004	0.0012640
cúbica	1	0.0000000	0.0137366
desvios regressão	2	0.0000001	0.0289139
pH: Agar 1.05% (5)			
linear	1	0.0000009	0.0009694
quadrática	1	0.0000003	0.1519408*
cúbica	1	0.0000002	0.0413363
desvios regressão	2	0.0000007**	0.0306198
Resíduo	84	0.0000025	0.0230609

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade

** significativo ao nível de 1% de probabilidade

TABELA 6. Análise de variância e regressão para número de folhas em diferentes níveis de ágar e pH. ESAL, Lavras/MG, 1994.

Causas da Variação	GL	Quadrados médios e significância
		N. Folhas
Agar	(3)	
linear	1	0.0000375
quadrática	1	0.0481896*
cúbica	1	0.0681112*
Resíduo	84	0.0113343
pH	(6)	
linear	1	0.0014568
quadrática	1	0.0258689
cúbica	1	0.0140007
desvios de regressão	3	0.0065811
Resíduo	84	0.0158358

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade

TABELA 7. Análise de variância e regressão para número e tamanho de brotos, número de folhas, peso da matéria seca da parte aérea e das raízes e peso da matéria fresca dos calos em função de diferentes concentrações de BAP e ANA no meio de cultura. ESAL, Lavras/MG, 1984.

Causas da Variação GL		Quadrados médios e significância					
		N.Brotos	Tam.Brotos	N.Folhas	PMSpa	PMSraizes	PMFcalos
ANA:BAP 0 uM	(3)						
linear	1	0.0000442	0.0217358*	0.0656923	0.0000004	0.0000008**	0.0021616
quadrática	1	0.0000810	0.0060185	0.0049602	0.0000000	0.0000004*	0.0000188
cúbica	1	0.0001773	0.0246776**	0.0229645	0.0000000	0.0000000	0.0000000
ANA:BAP 1.5 uM	(3)						
linear	1	0.4712167**	0.0056872	0.0027455	0.0003263**	0.0000000	0.0002004
quadrática	1	0.0159848	0.0031156	0.0906429	0.0000126	0.0000000	0.0041230
cúbica	1	0.0077373	0.0000156	0.0246522	0.0000079	0.0000000	0.0035053
ANA:BAP 3.1 uM	(3)						
linear	1	0.6827677**	0.0230579*	0.0002496	0.0001723**	0.0000000	0.0019371
quadrática	1	0.0400934	0.0008540	0.1020162	0.0000005	0.0000000	0.0019932
cúbica	1	0.0096986	0.0002736	0.0029341	0.0000010	0.0000000	0.0012973
ANA:BAP 6.21 uM	(3)						
linear	1	0.7971161**	0.0619562**	0.5773557**	0.0004317**	0.0000000	0.0054166
quadrática	1	0.0000324	0.0000202	0.0000630	0.0000049	0.0000000	0.0032284
cúbica	1	0.1664178*	0.0030062	0.3165237*	0.0000232	0.0000000	0.0038912
ANA:BAP 12.43 uM	(3)						
linear	1	0.7090142**	0.0471465**	0.7373978**	0.0003056**	0.0000000	0.0172026**
quadrática	1	0.0001554	0.0013156	0.1988258	0.0000040	0.0000000	0.0000005
cúbica	1	0.2371292**	0.0008567	0.1558939	0.0000059	0.0000000	0.0000334
ANA:BAP 23.97 uM	(3)						
linear	1	0.5148541**	0.0155604*	0.0199186	0.0003215**	0.0000000	0.0323107**
quadrática	1	0.0419538	0.0088950	0.2550465*	0.0000005	0.0000000	0.0003859
cúbica	1	1.1620650**	0.0191099*	-0.1507437	0.0000002	0.0000000	0.0070359*

"Continua..."

"TABELA 7, Cont..."

ANA:BAP 49.73 uM (3)							
linear	1	1.350703011	0.0054912	0.0128738	0.000133311	0.0000000	0.0012876
quadrática	1	0.0027034	0.0003467	0.0054161	0.0000000	0.0000000	0.01487241
cúbica	1	0.435678611	0.0001861	0.0727148	0.0000263	0.0000000	0.0001479
<hr/>							
Resíduo	84	0.0263559	0.0035353	0.0573175	0.0000098	0.0000001	0.0017295

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade

** significativo ao nível de 1% de probabilidade

TABELA 8. Resumo das análises de variância e regressão para número de raízes em diferentes concentrações de BAP e ANA no meio de cultura. ESAL, Lavras/MG, 1994.

Causas da Variação	GL	Quadrados médios e significância	
		N. Raízes	
<hr/>			
BAP	(6)		
linear	1	1.5530380	**
quadrática	1	1.6407461	**
cúbica	1	1.6317629	**
desvios regressão	3	0.4383344	**
Resíduo		0.0101613	
<hr/>			
ANA	(3)		
linear	1	0.0250530	
quadrática	1	0.0010449	
cúbica	1	0.0009035	
Resíduo		0.0101613	

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade

TABELA 9. Análise de variância e regressão para número e tamanho de brotos, número de folhas, peso da matéria seca da parte aérea e das raízes, peso da matéria fresca dos calos em níveis diferentes de cinetina e ANA no meio de cultura. ESAL, Lavras/MG, 1994.

Causas da Variação GL		Quadrados médios e significância					
		N.Brotos	Tam.Brotos	N.Folhas	PMSpa	PMSraizes	PMFcalos
ANA:CIN 0 uM	(3)						
linear	1	0.0000001	0.0043953	0.0016723	0.0000000	0.0000012††	0.0030720 †
quadrática	1	0.0000002	0.0062688	0.0004599	0.0000051	0.0000003	0.0007327
cúbica	1	0.0000005	0.0000996	0.0002275	0.0000004	0.0000000	0.0023437 †
ANA:CIN 1.62 uM	(3)						
linear	1	0.0451310††	2.3298381††	0.9283257††	0.0003179††	0.0000013††	0.0002337
quadrática	1	0.0183972††	0.0152681	0.0565531	0.0000298	0.0000000	0.0092524††
cúbica	1	0.0037824	0.1126786	0.0236758	0.0000071	0.0000001	0.0027165 †
ANA:CIN 3.25 uM	(3)						
linear	1	0.0628042††	2.7380313††	1.1049360††	0.0003276††	0.0000000	0.0054926 †
quadrática	1	0.0199136††	0.0009327	0.0121258	0.0000223	0.0000000	0.0012524
cúbica	1	0.0071211	0.1142750	0.1062039	0.0000005	0.0000002	0.0033099 †
ANA:CIN 6.50 uM	(3)						
linear	1	0.0771451††	1.2795927††	0.4863928††	0.0003082††	0.0000000	0.0033062 †
quadrática	1	0.0013084	0.0349475	0.0138993	0.0000398 †	0.0000001	0.0098713††
cúbica	1	0.0010103	0.0211595	0.0005905	0.0000119	0.0000001	0.0010396
ANA:CIN 13.01 uM	(3)						
linear	1	0.0564395††	2.8119285††	0.9987368††	0.0004358††	0.0000000	0.0051676††
quadrática	1	0.0011097	0.0326032	0.0949175	0.0000679††	0.0000000	0.0148822††
cúbica	1	0.0015738	0.0262174	0.1927415 †	0.0000010	0.0000000	0.0000479
ANA:CIN 25.09 uM	(3)						
linear	1	0.1360040††	1.4912251††	0.3674362††	0.0005830††	0.0000000	0.0001951
quadrática	1	0.0022643	0.0000364	0.0000024	0.0000056	0.0000000	0.0208751††
cúbica	1	0.0067206	0.0450444	0.0008368	0.0000843††	0.0000000	0.0002701

"Continua..."

"TABELA 8, Cont..."

ANA: CIN 52.04 µM (3)							
linear	1	0.027300011	2.584137211	1.535191511	0.000325711	0.0000000	0.0009720
quadrática	1	0.0000156	0.0196234	0.0268801	0.0000012	0.0000000	0.009225711
cúbica	1	0.0044009	0.0048604	0.0016582	0.0000292	0.0000000	0.0008867
Resíduo	84	0.0025169	0.0429399	0.0296763	0.0000096	0.0000001	0.0005442

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade

TABELA 10. Resumo das análises de variância e regressão para número de raízes em diferentes níveis de cinetina e ANA no meio de cultura. ESAL, Lavras/MG, 1994.

Causas da Variação	GL	Quadrados médios e significância	
		N. Raízes	
CIN (6)			
linear	1	6.1071910	**
quadrática	1	2.4054692	**
cúbica	1	0.1707702	**
desvios regressão	3	0.3325880	**
Resíduo		0.0225435	
ANA (3)			
linear	1	0.3991879	**
quadrática	1	0.0615481	
cúbica	1	0.1249670	*
Resíduo		0.0225435	

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade

TABELA 11. Resumo das análises de variância e regressão de número de folhas em diferentes concentrações de ácido giberélico (GA3) no meio de cultura. ESAL, Lavras/MG, 1984.

Causas da Variação	GL	Quadrados médios e significância	
		N.Folhas	
GA3	(6)		
linear	1	0.1111000	*
quadrática	1	0.3075003	**
cúbica	1	0.0448303	
desvios regressão	3	0.0898198	**
Resíduo		0.0157438	

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade