

MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DE CRISÂNTEMO cv. WHITE POLARIS

"*IN VITRO*" MULTIPLICATION OF CHRYSANTHEMUM "WHITE POLARIS"

CHAGAS, Edvan A.¹; FRÁGUAS, Chrystiane B.¹; SILVA, Enoque F. da¹; PASQUAL, Moacir²; MENDONÇA, Vander³

- NOTA TÉCNICA -

RESUMO

Objetivou-se multiplicar *in vitro* crisântemo através da adição de reguladores de crescimento. Segmentos nodais foram cultivados em meio MS 75%, 3% de sacarose, 0,7% de ágar e pH 5,8, adicionando-se BAP em diferentes concentrações (0; 0,35; 0,7; 1,4; 2,8 e 5,6 mg L⁻¹) combinadas com ANA (0; 0,014; 0,14 e 1,4 mg L⁻¹). A cultivar estudada não apresentou respostas satisfatórias ao estímulo dos reguladores de crescimento quanto à produção de brotos. A concentração de 1,4 mg L⁻¹ de BAP na ausência de ANA foi a que apresentou maior taxa de multiplicação (2,45 brotos/explante).

Palavras-chave: *Dendranthema grandiflora*, micropropagação, reguladores de crescimento.

A demanda das plantas ornamentais e flores de corte dos países do primeiro mundo alcança U\$S\$ 21 bilhões por ano. O Brasil responde por 0,25% da taxa de exportação para este mercado, principalmente em material de propagação (bulbos, mudas e sementes) (FAO, 2001).

A quantidade de crisântemos comercializados no Brasil apresenta crescimento contínuo, sendo a primeira flor de corte em volume de produção. O crisântemo é propagado convencionalmente através de estacas (MAY & TRIGIANO, 1991), 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 obtenção de plantas matrizes sadias com o objetivo de melhorar a produção torna-se fundamental à redução dos custos de produção e aumento de produtividade (QUERALT et al., 1991).

A cultura de tecidos de plantas é um método biotecnológico já consagrado pelos resultados alcançados em várias culturas, as quais foram beneficiadas pela produção de plantas uniformes e sadias, pela velocidade superior de crescimento em relação aos métodos convencionais de propagação, pela maior produção em menor tempo e espaço físico e, ainda pela obtenção de plantas livres de vírus e outros patógenos através da cultura de meristemas (CRÓCOMO, 1986).

A utilização de segmentos nodais como explante para a micropropagação é uma das maneiras de viabilizar a produção *in vitro* (OLIVEIRA, 1994). PIERIK (1987) e BHOJWANI (1990) sugerem a utilização de segmentos com apenas uma gema para a propagação de crisântemo. PRASAD & CHATURVEDI

(1988) obtiveram brotações de crisântemo apenas em ápices e segmentos nodais.

As auxinas e citocininas são substâncias reguladoras essenciais para o desenvolvimento dos explantes e estão intimamente relacionadas com a divisão celular e o crescimento do meristema. Uma relação elevada de citocinina/auxina é requerida para a indução direta de brotações nos explantes (TAIZ & ZEIGER, 1991). A combinação de tipo e concentração de reguladores de crescimento é fundamental para o desenvolvimento *in vitro* (MALAURE et al., 1991). EVANS et al. (1981) fazem referência ao uso das auxinas AIA ou ANA nas concentrações de 0,01 a 5 mg L⁻¹ em cultura de tecidos de várias espécies cultivadas produzindo brotações.

A biossíntese de auxinas ocorre em ápices jovens (HU & WANG, 1983) e induzem o alongamento celular em raízes e brotos, a formação de raízes adventícias e em altas concentrações podem causar a desorganização do crescimento (JACOBSEN, 1983; PIERIK, 1987).

A indução de brotações *in vitro* ocorre pelo desequilíbrio hormonal induzido por uma concentração adequada e balanceada de reguladores de crescimento adicionada ao meio. A resposta a este processo depende de fatores inerentes à planta. Segundo BLAKESLEY & CONSTANTINE (1992), o crisântemo tem pequena absorção de BAP *in vitro*. OLIVEIRA (1994), trabalhando com a cultivar Orange Reagen, observou que a produção de brotos foi superior a três por explante somente quando se utilizou acima de 1,4 mg L⁻¹ de BAP na ausência de ANA.

Levando-se em consideração a grande demanda de crisântemo em nível mundial e nacional, bem como o alto custo de produção das mudas aliado aos problemas fitossanitários, a multiplicação *in vitro* é uma técnica viável no que diz respeito à obtenção de plantas matrizes sadias e que serão utilizadas posteriormente na propagação convencional.

Objetivou-se induzir a multiplicação de brotos de crisântemo *in vitro* através da adição de reguladores de crescimento BAP (6-Benzilaminopurina) e ANA (ácido naftalenoacético) ao meio de cultura.

Segmentos nodais de crisântemo com duas gemas, da cultivar White Polaris, já estabelecidos *in vitro*, foram inoculados em meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) 75%, sacarose 3% e ágar 0,7%, pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem (OLIVEIRA, 1994). Os tratamentos consistiram da interação de BAP (0; 0,35; 0,70; 1,4; 2,8; 5,6 mg L⁻¹) e ANA

¹ Eng^o. Agr^o. Msc. em Fitotecnia/UFLA. C.P. 37 - 37200-000 - Lavras/MG. E-mail: edyvanchagas@bol.com.br

² Eng^o. Agr^o., Dr., Prof. Dep. de Agricultura - UFLA. C.P. 37 - 37200-000 - Lavras/MG. e-mail: mpasqual@ufla.br.

³ Eng. Agr^o. Doutorando em Fitotecnia/UFLA. UFLA. C.P. 37 - 37200-000 - Lavras/MG.

(0; 0,014; 0,14; 1,4 mg L⁻¹). O experimento foi conduzido em sala de crescimento, com temperatura 27±1 °C, fotoperíodo de 16 horas de luz e 32 µm m⁻² s⁻¹ de intensidade luminosa. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 6 x 4, com quatro repetições e três tubos por parcela. Após 30 dias da instalação do experimento foram efetuadas as avaliações, quantificando-se o número de brotos, massa seca da parte aérea e massa fresca de calos.

Maior número de brotos (2,45) foi obtido com a utilização de 1,4 mg L⁻¹ de BAP associado a 0,014 mg L⁻¹ de ANA. Na mesma concentração de BAP e utilizando-se 0 e 0,14 mg L⁻¹ de ANA obteve-se 2,4 e 2,34 brotos/explante, respectivamente (Figura 1).

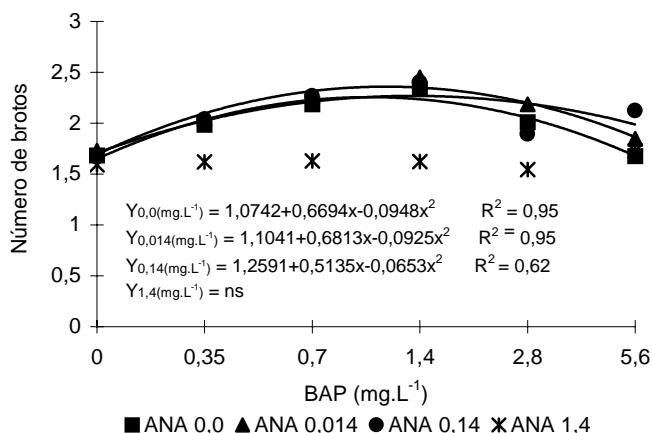


Figura 1 - Número de brotos em segmentos nodais de crisântemo obtidos em diferentes concentrações de BAP combinadas com ANA. UFLA, Lavras-MG, 2001.

Resultados similares foram obtidos por AHMED (1986) no desenvolvimento de brotos de crisântemo, porém, utilizando 0,04 a 0,1 mg L⁻¹ de BAP e 0,02 a 0,5 mg L⁻¹ de AIA (ácido indolacético). BHATTACHARYA et al. (1990) obtiveram média de 3,8 brotos por explante, utilizando 0,2 mg L⁻¹ de BAP. PRASAD & CHATURVEDI (1988), utilizando 1,48 mg L⁻¹ de BAP e 0,1 mg L⁻¹ de ANA obteve em média 5,2 brotos/explante. MALAURE et al. (1991), estudando diversas variedades de crisântemo, observaram que estas produziram bom número de brotos nas concentrações entre 0,5 e 10,4 mg L⁻¹ de BAP combinadas com 0,5 a 4 mg L⁻¹ de ANA. Os resultados deste trabalho concordam com os de OLIVEIRA (1994), que recomenda a utilização de 1,4 ou 2,8 mg L⁻¹ de BAP na ausência de ANA para manter a produção média de brotos em dois por explante. O autor ainda verificou que aumentando-se o nível de ANA e BAP no meio de cultura, houve tendência de diminuir o número de brotos formados. KUSHAL et al. (1994) trabalhando com a cv. Riot, obtiveram 18 brotações após 12 semanas em meio de cultura com 2 mg L⁻¹ de BAP. No entanto, estes mesmos autores observaram um aumento no número de brotos com o aumento dos níveis de BAP o que, não concorda com os resultados encontrados neste trabalho.

Constata-se que, mesmo na ausência de citocinina e auxina, houve produção de brotações. Resultado contrário foi observado por PRASAD & CHATURVEDI (1988) quando não observaram o estímulo de brotações para a cultivar Bural Sahni na ausência de BAP, mesmo na presença de ANA, indicando a necessidade dos reguladores de crescimento para esta cultivar. OLIVEIRA (1994), constatou que para a cultivar Orange Reagen também houve formação de novos brotos na ausência de reguladores de crescimento.

Maior massa seca da parte aérea foi observada na ausência de BAP (Figura 2). Apesar dos melhores resultados para número de brotos terem sido obtidos com baixas concentrações de BAP, estes brotos apresentaram-se menores em relação aos obtidos em concentrações mais elevadas. Já, OLIVEIRA (1994) constatou que o peso de matéria seca da parte aérea decresceu linearmente à medida que se elevou o nível de ANA no meio, em qualquer concentração de BAP.

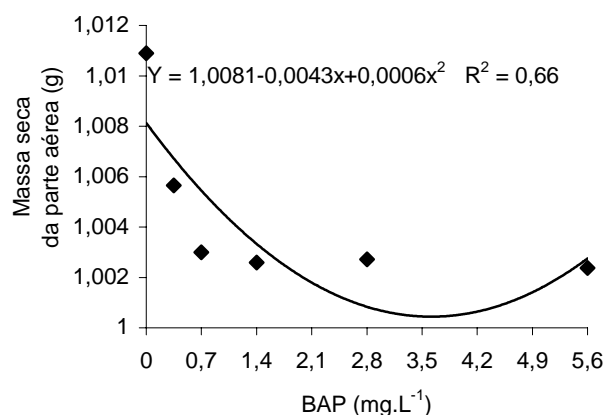


Figura 2 - Massa seca da parte aérea de segmentos nodais de crisântemo submetida a diferentes concentrações de BAP. UFLA, Lavras-MG, 2001.

O aumento das concentrações de BAP reduziu linearmente a massa fresca de calos (Figura 3). Resultados semelhantes foram relatados por IHSANUL et al. (1998), quando houve indução de calos em crisântemo cultivados em meio MS suplementado com 0,5 a 1,2 mg L⁻¹ de BAP. PRASAD & CHATURVEDI (1988) também obtiveram formação de calos nos explantes quando cultivados em meio contendo 0,5 mg L⁻¹ de BAP e 0,22 mg L⁻¹ de ANA. Entretanto, LU et al. (1990), cultivando estacas da cultivar Royal Purple, não observaram formação de calos ao testarem diversas concentrações de BAP e ANA.

Por outro lado, a concentração de ANA induziu aumento linear da massa fresca dos calos (Figura 4). PRASAD & CHATURVEDI (1988) observaram a formação de calos na presença de 0,22 mg L⁻¹ de ANA. Tais resultados confirmam observações feitas por vários pesquisadores que obtiveram a mesma tendência (HASEGAWA, 1979; PIERIK, 1987; OLIVEIRA, 1994), no entanto, com a inibição de raízes (LANE, 1979).

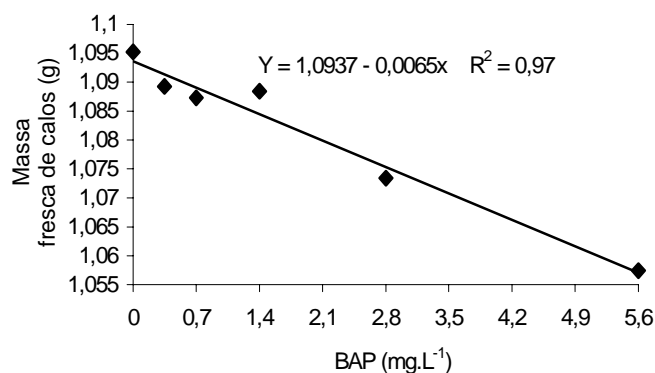


Figura 3 - Massa fresca de calos de segmentos nodais de crisântemo submetidos a diferentes concentrações de BAP. UFLA, Lavras-MG, 2001.

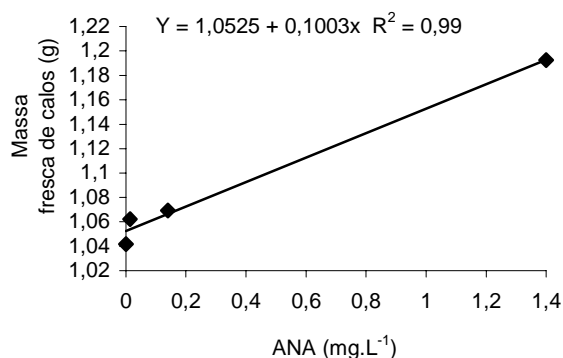


Figura 4 - Massa fresca calos de segmentos nodais de crisântemo submetidos a diferentes concentrações de ANA. UFLA, Lavras-MG, 2001.

Considerando os resultados observados no presente trabalho, pode-se concluir que a utilização do meio MS 75%, na ausência de ANA e com 1,4 mg L⁻¹ BAP aumenta a propagação do crisântemo cv. White Polaris.

ABSTRACT

In vitro multiplication of chrysanthemum with the addition of growth regulators was evaluated. Nodal segments were cultivated in MS medium 75%, sucrose 3%, agar 0.7% and pH 5.8, with different BAP concentrations (0; 0.35; 0.7; 1.4; 2.8 and 5.6 mg L⁻¹) combined with ANA (0; 0.014; 0.14 and 1.4 mg L⁻¹). The cultivar did not present satisfactory answers to shoots production. BAP at 1.4 mg L⁻¹ with no ANA gave the highest multiplication rate (2.45 shoots/explant).

Key words : *Dendranthema grandiflora*, micropropagation, growth regulators.

REFERÊNCIAS

- AHMED, H. A. *In vitro* regeneration and propagation of meristem apices of *Chrysanthemum*. **Kerteszet Egyetem Közleményei**, v.50, n.18, p.199-214, 1986.
- BHATTACHARYA, P.; DEY, S.; DAG, N. et al. 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 culture of a range of species. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.28, p.183-186, 1992.
- CRÓCOMO, O.J. Plant biotechnology in the agriculture and development in Brazil. In: SIMPÓSIO ANNUAL DA ACADEMIA DE CIÊNCIA DE SÃO PAULO, 11., **Anais**, São Paulo. 1986. p.53-71.
- 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 applications in agriculture**. Academic Press, New York: 1981. p.45-113.
- FAO Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponível em <<http://www.fao.org>> Acesso em: 24 abr. 2001.
- 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 culture. In: EVANS, D.A.; SHARP, W.R.; AMMIRATO, P.V.; et al. ed. **Handbook of Plant Cell Culture**. New York, Macmillan, 1983. Vol. I: Techniques for propagation and breeding. p.177-227.
- IHSANUL, H.; JEHANGIR, K.; MUKHTAR, A. et al. *In vitro* culture of Chrysanthemum. **Sarhad Journal of Agriculture**, v. 14, n.3, p.211-213, 1998.
- JACOBSEN, H.J. Biochemical mechanisms of plant hormone activity. In: EVANS, D.A.; SHARP, W.R.; AMMIRATO, P.V. et al. **Handbook of Plant Cell Culture** – Technique for propagation and breeding. New York: Macmillan Publishing Company, 1983. v.1, p.672-695.
- KUSHAL, S.; ARORA, J.S.; SINGH, K. *In vitro* multiplication of *Chrysanthemum morifolium* Ramat cv. Riot. **Journal of Ornamental Horticulture**, v.2, n.1-2, p.63-68, 1994.
- LANE, W.D. *In vitro* propagation of *Spirea 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.
- MALAURE, R.S.; BARCLAY, G.; POWER, J.B. et al. 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.8-13, 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.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultivars. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, p.473-479, 1962.

OLIVEIRA, P.D. **Propagação “in vitro” de crisântemo (*Dendranthema grandiflora* Tzelev) cv. Orange Reagen.** Lavras, 1994. 116p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia), Universidade Federal de Lavras.
PIERIK, R.L.M. ***In Vitro* Culture of Higher Plants.** Dordrecht: Martinus Nyhoff Publisher, 1987. 344p.
PRASAD, R. N.; CHATURVEDI, C. Effect of season of Collection of explants on micropropagation of *Crhysanthemum*

morifolium. **Biologia Plantarum**, The Hague, v.30, n.1, p.20-24, 1988.
QUERALT, M.C; BERUTO, M.; VANDERSCHAEGHE, A. et al. Ornamentals. In: DEBERGH, M.C.; ZIMMERMAN, R.H. (ed.). **Micropropagation - Tecnology and Aplication.** Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1991. p.215-230.
TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant Physiology.** Redwood City, CA: Benjamin/Cummings, Publishing Company, 1991. 559p.