

**INFLUÊNCIA DE FITORREGULADORES E DE FONTES DE NITROGÊNIO NA MORFOGÊNESE "in vitro" DE *Chrysanthemum morifolium* (Ramat) Tzvelev CV. AMARELO SÃO PAULO.**

DANIELA DE ARGOLLO MARQUES  
Engenheira Agrônoma

Orientador: Prof. Dr. OTTO JESU CROCOMO

Dissertação apresentada à Escola de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em **Ciência**. Área de concentração: Fisiologia e Bioquímica de Plantas.

PIRACICABA  
Estado de São Paulo - Brasil  
Abril de 1996

**INFLUÊNCIA DE FITORREGULADORES E DE FONTES DE NITROGÊNIO NA MORFOGÊNESE *in vitro* DE *Chrysanthemum morifolium* CV. AMARELO SÃO PAULO.**

Daniela de Argollo Marques

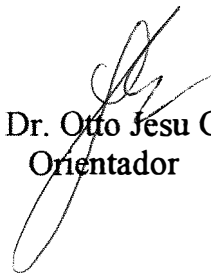
Aprovada em: 10/04/1996.

Comissão julgadora:

Prof. Dr. Otto Jesu Crocomo.....ESALQ/USP  
Prof. Dr. Luiz Antônio Gallo.....ESALQ/USP  
Profª. Dra. Simone Liliane Kirszenzaft Shepherd.....UNICAMP\*

\*Instituto de Biologia - Dep. Fisiologia Vegetal

Prof. Dr. Otto Jesu Crocomo  
Orientador



*Aos meus pais Victor André e Maria Isabel  
e irmãos André e Thiago;*

*Ao Rui e a nossa filha Gabriela*

DEDICO.

*À minha querida vó Ignês (in memoriam)*

OFEREÇO.

*À Deus*

AGRADEÇO E LOUVO SEMPRE.

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Otto Jesu Crocomo pela orientação, compreensão e amizade.

À Prof. Dra. Simone Liliane Kirszenzaft Shepherd da Universidade Estadual de Campinas, pela colaboração na orientação, estímulo e apoio decisivo para a realização deste trabalho.

Ao Departamento de Fisiologia Vegetal da UNICAMP, pelo uso de seus laboratórios onde parte dos experimentos foram realizados, bem como aos técnicos, funcionários e colegas deste departamento, em especial à Dulce Regina Joaquim pela colaboração constante.

Aos técnicos, funcionários e colegas do CEBTEC, em especial ao Engenheiro Agrônomo João Chadad, pela colaboração na parte experimental; à Maria Solizete Granziol Silva, Enio Tiago Oliveira e Romeu A. Rocha.

Ao Prof. Dr. Quirino A. C Carmello e ao Prof. Dr. Roque Dechen do Departamento de Química da ESALQ/USP.

Aos funcionários da biblioteca central da ESALQ/USP.

Ao Edinaldo Guimarães, do Departamento de Água e Solo da Faculdade de Engenharia Agrícola da UNICAMP, pela colaboração nos cálculos de estatística.

Ao Centro de Comunicações da UNICAMP, em especial à Noelandy Castro Jimenez, pelas fotografias e slides.

À Coordenadoria de Assistência Técnica Integral (CATI) e ao Instituto Internacional de Integração de sistemas (IIIsis), pela impressão deste trabalho.

À CAPES, pela bolsa concedida.

A meus tios Tereza e Sérgio pela hospedagem e carinho durante minha estadia em Piracicaba.

E a todos aqueles que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho.

## ÍNDICE

|  | Página |
|--|--------|
| LISTA DE ABREVIATURAS.....   | v      |
| LISTA DE FIGURAS.....  | vi     |
| LISTA DE TABELAS.....  | viii   |
| Resumo.....  | x      |
| Summary.....   | xii    |
| 1.INTRODUÇÃO.....  | 01     |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA.....  | 04     |
| 2.1. Considerações gerais.....   | 04     |
| 2.1.1. Aspectos agronômicos.....   | 04     |
| 2.2. Cultura de tecidos.....   | 07     |
| 2.3. Planta matriz e explantes.....  | 10     |
| 2.4. Meios de cultura.....   | 12     |
| 2.5. Nitrogênio.....   | 13     |
| 2.6. Fontes de carbono.....  | 17     |
| 2.7. Fitorreguladores de crescimento.....  | 18     |
| 2.8. Dominância apical.....  | 21     |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS.....   | 25     |
| 3.1. Plantas matrizes.....   | 25     |
| 3.2. Preparo das matrizes.....   | 25     |
| 3.3. Obtenção dos explantes e assepsia.....  | 27     |
| 3.4. Experimentos.....   | 30     |
| 3.4.1. Experimento I: Meio MS com diferentes concentrações de BAP e<br>e AIA (mg/L).....             | 30     |
| 3.4.2. Experimento II: Meio MS com diferentes concentrações de BAP e<br>Nitrato de prata (mg/L)..... | 32     |
| 3.4.3. Experimento III: Fontes de nitrogênio.....  | 33     |
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....   | 36     |
| 4.1. Experimentos preliminares: sacarose e natureza do<br>agente gelificante.....                    | 36     |
| 4.2. Experimento I: Interação BAP x AIA.....   | 37     |
| 4.3. Experimento II: Interação BAP x Nitrato de prata.....   | 42     |
| 4.4. Experimento III: Fontes de nitrogênio.....  | 47     |
| 4.4.1. Massa de matéria fresca (g) e massa de matéria seca (g).....                                  | 47     |
| 4.4.1.1. Análise aos 35 dias.....  | 47     |
| 4.4.1.2. Análise aos 70 dias.....  | 49     |

|   |    |
|---|----|
| 4.4.2. Altura do eixo caulinar principal (cm).....            | 51 |
| 4.4.2.1. Análise aos 35 dias.....                             | 51 |
| 4.4.2.2. Análise aos 70 dias.....                             | 51 |
| 4.4.3. Número de folhas.....                                  | 53 |
| 4.4.3.1. Análise aos 35 dias.....                             | 53 |
| 4.4.3.2. Análise aos 70 dias.....                             | 53 |
| 4.4.4. Enraizamento: comprimento (cm) e número de raízes..... | 55 |
| 4.4.4.1. Análise aos 35 dias.....                             | 55 |
| 4.4.4.2. Análise aos 70 dias.....                             | 55 |
| 4.4.5. Determinação do nitrogênio total.....                  | 62 |
| 4.4.6. Considerações finais.....                              | 67 |
| 5. CONCLUSÕES.....  | 73 |
| 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....                            | 75 |

## ABREVIATURAS

|              |  |
|--------------|--|
| 2,4 D.....   | -ácido 2,4 diclorofenoxiacético                      |
| 2iP.....     | -N <sup>6</sup> - (2 isopentenil) adenosine          |
| ABA.....     | -ácido abscísico                                     |
| AIA.....     | -ácido indol acético                                 |
| ADP.....     | -adenosina difosfato                                 |
| ATP.....     | -adenosina trifosfato                                |
| atm.....     | -atmosferas  |
| BAP.....     | -N <sup>6</sup> - benzyladenina                      |
| C.....       | -carbono   |
| GDH.....     | -glutamato desidrogenase                             |
| Gln.....     | -glutamina   |
| GOGAT.....   | -glutamato sintase                                   |
| GS.....      | -glutamato sintetase                                 |
| mM.....      | -milimolar   |
| MMF.....     | -massa de matéria fresca                             |
| MS.....      | -meio de MURASHIGE & SKOOG (1962)                    |
| MMS.....     | -massa de matéria seca                               |
| N.....       | -nitrogênio  |
| NAD.....     | -nicotinamida adenina dinucleotídeo                  |
| NADH.....    | -nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida         |
| NAD(P).....  | -nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato          |
| NAD(P)H..... | -nicotiaminda adenina dinucleotídeo fosfato reduzida |
| UV.....      | -ultra violeta                                       |
| URE.....     | -uréia   |
| URE1.....    | -uréia - 100 mg/L                                    |
| URE2.....    | -uréia - 200 mg/L                                    |

## LISTA DE FIGURAS

|   | Página |
|---|--------|
| Figura 1 - Tipos de inflorescência de crisântemo: (A) simples; (B) anêmonas; (C) pompom; (D) decorativas; (E e F) de flores grandes.....  | 05     |
| Figura 2 - Aspecto da flor (A) e da planta (B) de <i>Chrysanthemum morifolium</i> cv. Amarelo São Paulo.....  | 26     |
| Figura 3 - Esquema de obtenção e inoculação do explante meristemático original.....   | 28     |
| Figura 4 - Micropropagação do explante meristemático original via brotações laterais em condições de laboratório.....   | 31     |
| Figura 5 - Explantes: segmentos nodais excisados de plantas obtidas "in vitro".....   | 31     |
| Figura 6 - Inoculação dos explantes em meios contendo várias fontes de nitrogênio: E1: $\text{NH}_4^+ + \text{NO}_3^-$ ; E2: $\text{NH}_4^+$ ; E3: $\text{NO}_3^-$ ; E4: uréia (100 mg/l) + $\text{NO}_3^-$ ; E5: uréia (200 mg/l) + $\text{NO}_3^-$ ; E6: uréia; E7: glutamina; E8: uréia + glutamina..... | 35     |
| Figura 7 - Esquema dos fenótipos das plantas de crisântemos micropropagadas em meios com diferentes concentrações de BAP e AIA (mg/L).....  | 39     |
| Figura 8 - Aspecto das plantas de crisântemo micropropagação em meio MS com total ausência de fitorreguladores.....   | 40     |
| Figura 9 - Comportamento das plantas mantidas em meios com várias fontes de nitrogênio em relação à massa de matéria fresca (g), aos 35 e aos 70 dias.....  | 48     |
| Figura 10 - Comportamento das plantas mantidas em meios com várias fontes de nitrogênio em relação à massa de matéria seca (g), aos 35 e aos 70 dias.....   | 50     |
| Figura 11 - Comportamento das plantas mantidas em meios com várias fontes de nitrogênio em relação à altura do eixo caulinar principal (cm), aos 35 e aos 70 dias.....  | 52     |



|   |    |
|---|----|
| Figura 12 - Comportamento das plantas mantidas em meios com várias fontes de nitrogênio em relação ao número de folhas, aos 35 e aos 70 dias.....   | 54 |
| Figura 13 - Comportamento das plantas mantidas em meios com várias fontes de nitrogênio em relação ao comprimento de raízes (cm), aos 35 e aos 70 dias...56   |    |
| Figura 14 - Comportamento das plantas mantidas em meios com várias fontes de nitrogênio em relação ao número de raízes, aos 35 e aos 70 dias.....   | 57 |
| Figura 15 - Esquema da degradação da uréia fornecendo carbono (CO <sub>2</sub> ) e nitrogênio (NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ) para o metabolismo das plantas.....   | 59 |
| Figura 16 - Esquema ilustrando a transição no ápice das plantas, de dreno para fonte, limitando o crescimento da parte aérea e promovendo um maior enraizamento, em certo estágio de desenvolvimento..... | 61 |
| Figura 17 - Esquema da Glicólise e Ciclo de Krebs.....  | 65 |
| Figura 18 - Plantas de crisântemo cultivadas em meio de cultura onde o íon amônio foi utilizado como única fonte de nitrogênio.....   | 68 |
| Figura 19 - Esquema evidenciando a acidificação do meio de cultura pela liberação de H <sup>+</sup> e a acentuada formação de aminoácidos em meios com elevadas concentrações do íon amônio.....          | 70 |

## LISTA DE TABELAS

|  | Página |
|--|--------|
| Tabela 1 - Composição do meio de cultura básico de MURASHIGE E SKOOG (1962).....   | 29     |
| Tabela 2 - Fontes de nitrogênio utilizadas nos oito tratamentos e balanceamento realizado de forma a manter constante o teor de nitrogênio total contido no meio MS (60,0 mM)..... | 35     |
| Tabela 3 - Efeito da interação BAP x AgNO <sub>3</sub> em relação ao parâmetro altura do eixo caulinar principal (cm).....   | 45     |
| Tabela 4 - Efeito da interação BAP x AgNO <sub>3</sub> em relação ao parâmetro número de folhas.....   | 45     |
| Tabela 5 - Efeito da interação BAP x AgNO <sub>3</sub> em relação ao parâmetro número de raízes.....   | 46     |
| Tabela 6 - Efeito da interação BAP x Ag NO <sub>3</sub> em relação ao parâmetro massa de matéria fresca (g).....   | 46     |
| Tabela 7 - Efeito da interação BAP x AgNO <sub>3</sub> em relação ao parâmetro massa de matéria seca (g).....  | 46     |
| Tabela 8 - Valores médios de massa de matéria fresca (g) obtidos nos tratamentos com diferentes fontes de nitrogênio, aos 35 e aos 70 dias.....                                    | 48     |
| Tabela 9 - Valores médios de massa de matéria seca (g) obtidos nos tratamentos com diferentes fontes de nitrogênio, aos 35 e aos 70 dias.....                                      | 50     |
| Tabela 10 - Valores médios de altura do eixo caulinar principal (cm) obtidos nos tratamentos com diferentes fontes de nitrogênio, aos 35 e aos 70 dias.....                        | 52     |

|  |    |
|--|----|
| Tabela 11 - Valores médios de número de folhas obtidos nos tratamentos com diferentes fontes de nitrogênio, aos 35 e aos 70 dias.....      | 54 |
| Tabela 12 - Valores médios de comprimento de raízes obtidos nos tratamentos com diferentes fontes de nitrogênio, aos 35 e aos 70 dias..... | 56 |
| Tabela 13 - Valores médios de número de raízes obtidos nos tratamentos com diferentes fontes de nitrogênio, aos 35 e aos 70 dias.....      | 57 |
| Tabela 14 - Valores médios de teor de nitrogênio total obtidos nos tratamentos com diferentes fontes de nitrogênio, aos 70 dias.....       | 63 |

**INFLUÊNCIA DE FITORREGULADORES E DE FONTES DE NITROGÊNIO NA MORFOGÊNESE "in vitro" DE *Chrysanthemum morifolium* (Ramat) Tzvelev CV AMARELO SÃO PAULO.**

**Autora: DANIELA DE ARGOLLO MARQUES**

**Orientador: PROF.DR.OTTO JESU CROCOMO**

**Resumo:**

O objetivo desse trabalho foi estudar o efeito de várias fontes de nitrogênio e de fitorreguladores na multiplicação e desenvolvimento de *Chrysanthemum morifolium* cv. Amarelo São Paulo, os quais vinham sendo mantidos por cerca de 2 anos em meio MS básico acrescido de 0,2 mg/L de BAP.

No experimento com várias fontes de nitrogênio foram realizados oito tratamentos, sendo que em todos eles manteve-se constante a quantidade de nitrogênio total contida no meio MS (NT = 60,00 mM), variando-se somente as fontes nitrogenadas. Não foram adicionados fitorreguladores em nenhum tratamento. O tratamento E1 consistiu-se do meio MS completo. Nos demais tratamentos, para obter-se NT (na mesma concentração de 60,00mM), as seguintes fontes nitrogenadas foram utilizadas: E2 =  $\text{NH}_4^+$ ; E3 =  $\text{NO}_3^-$ ; E4 = uréia - 100 mg/L +  $\text{NO}_3^-$ ; E5 = uréia - 200 mg/L +  $\text{NO}_3^-$ ; E6 = uréia; E7 = uréia + glutamina e E8 = glutamina. Os resultados evidenciam que a utilização de uréia substituindo a fonte amoniacal de nitrogênio no meio MS determinou maior desenvolvimento da parte aérea das plantas nos primeiros 35 dias após a instalação do experimento, favorecendo o enraizamento aos 70 dias.

Também foram estudados os efeitos da interação entre os fitorreguladores BAP e AIA, nas seguintes concentrações: BAP: (0,0); (2,0); (4,0); (6,0); (8,0); (10,0) mg/l e IAA: (0,0); (0,1); (1,0); (10,0) mg/l. Os resultados revelaram que as plantas contidas em meio MS completo e em ausência total de fitorreguladores,

fitorreguladores, obtiveram um excelente desenvolvimento tanto da parte aérea como de raízes, podendo-se concluir que para esse cultivar não há necessidade da adição de fitorreguladores exógenos.

O efeito do etileno sobre o desenvolvimento dos explantes também foi analisado através da interação entre nitrato de prata (substância que tem ação competitiva ao etileno) e BAP. Observou-se que a presença de nitrato de prata, utilizada isoladamente ou interagindo com BAP, resultou em baixos valores das médias obtidas para todos os parâmetros analisados: altura do eixo principal, número de folhas, número de raízes, MMF e MMS. Isso sugere que a ausência de etileno influenciou negativamente o desenvolvimento das plantas cultivadas "in vitro".

**INFLUENCE OF PHYTOREGULATORS AND NITROGEN SOURCES  
ON THE "in vitro" MORPHOGENESIS OF *Chrysanthemum morifolium*  
(Ramat) Tzvelev CV AMARELO SÃO PAULO**

**Author: DANIELA DE ARGOLLO MARQUES**

**Advisor: PROF. DR. OTTO JESU CROCOMO**

**Summary:**

The effect of different sources of inorganic and organic nitrogen and phytohormones on the "in vitro" development of *Chrysanthemum morifolium* cv. Amarelo São Paulo was the objective of the present work, using 2-year old plants maintained in MS basic medium plus 0,2 mg/L BAP starting plant material.

When different sources of nitrogen were tested, the amount of total nitrogen (TN) was always constant (60 mM), the treatment E1 being the reference (complete MS). The following nitrogen sources were utilized: E2:  $\text{NH}_4^+$ ; E3:  $\text{NO}_3^-$ ; E4: urea (100 mg/L) +  $\text{NO}_3^-$ ; E5: urea (200 mg/L) +  $\text{NO}_3^-$ ; E6: urea; E7: urea + glutamine; E8: glutamine. The results showed that when urea replaced ammonium, a better shoot development was obtained in the first 35 days after the starting of the experiments, resulting in better rooting of the plants after 70 days.

Interactions among BAP and IAA were tested, using the following concentrations of the phytohormones: BAP (0,0); (2,0); (4,0); (6,0); (8,0) and (10,0) mg/L; IAA (0,0); (0,1); (1,0) and (10,0) mg/L. Shoot and roots of the chrysanthemum plants maintained in complete MS and absence of any of the phytohormones showed an excellent development indicating that no phytohormones can be added to the growth medium in order to help their growing.

The effect of ethylene gas on the development of nodal explants has been observed through in interaction of BAP and silver nitrate (an ethylene

competitor). It has been observed that silver nitrate alone or interacting with BAP, caused a decrease in the average figures of all analysed parameters: height of the main plant axis, number of leaves and roots and fresh and dry weights, indicating that the absence of ethylene gas had a negative effect on the "in vitro" development of the chrysanthemum plants.

## 1 - INTRODUÇÃO

As primeiras espécies de crisântemo originaram-se na China há cerca de 2000 anos, tendo sido desenvolvidas e usadas principalmente pelos japoneses que elevaram a planta e sua flor à dignidade de emblema nacional. Foram introduzidas na Europa por volta de 1688, e nos Estados Unidos, em 1820. Em meados do século passado, a cultura desta espécie alastrou-se por toda parte, chegando ao Brasil há aproximadamente 50 anos.

Segundo o sistema de classificação de CRONQUIST (1981), o crisântemo pertence a divisão *Magnoliophyta*, classe *Magnoliopsida*, subclasse *Asteridae*, ordem *Asterales*, família *Asteraceae*. Esta família foi anteriormente classificada por ENGLER (1964) como *Compositae*. (ROCHELLE et al., 1990).

O gênero *Chrysanthemum* engloba plantas de grande valor ornamental, cultivadas em todo o mundo, as quais apresentam inúmeros híbridos bastante apreciados pela sua inflorescência rica em diversidade de cores, formas e durabilidade.

Sob condições controladas, os crisântemos florescem em todas as estações do ano, podendo ser conduzidos em estufas ou telados. São comercializados em diferentes formas: cachos cortados em maços; cachos plantados em vasos e individuais cortados e vendidos em dúzias.



O Japão é o principal país produtor de crisântemos do mundo. Produz cerca de 2 bilhões de hastes por ano, o que, em termos de faturamento, corresponde a duas vezes a exportação brasileira de café e citrus, apresentando, portanto, grande importância sócio-econômica. Holanda e Colômbia são os maiores exportadores de crisântemos e são, respectivamente, o segundo e o terceiro maior produtor desta flor.

A produção brasileira de crisântemos concentra-se na região Sudeste, sendo o Estado de São Paulo o maior produtor, principalmente nos municípios de Santo Antônio da Posse, Jacareí, Cotia, Ibiúna e Atibaia.

Em São Paulo, segundo dados do CEAGESP o crisântemo de corte ocupa a primeira posição nas vendas de flores. Em 1990, obteve-se faturamento de US\$ 1,8 milhões, enquanto que no VEILING HOLAMBRA-SP, chegou-se a US\$ 2,3 milhões (INFORME GEP/DESR, 1991).

A quantidade de crisântemos comercializados no Brasil apresenta crescimento contínuo, justificando a preocupação dos produtores em expandir e melhorar a produção e a qualidade desta cultura. Neste sentido, a micropropagação "*in vitro*" e demais técnicas de cultura de tecidos, órgãos e células vegetais, têm contribuído intensamente para o aumento tanto da produção quanto da qualidade dessa espécie ornamental.

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 mais uniformes e mais saudáveis, 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 (CROCOMO, 1986).

Para se obter o crescimento de plantas "*in vitro*" é necessário a adição ao meio de cultura de compostos inorgânicos e de compostos orgânicos, além da suplementação com vitaminas, fontes de carbono e reguladores de crescimento.

A composição e concentração de fitorreguladores e nutrientes do meio de cultura são fatores essencialmente importantes para a micropropagação vegetal, sendo que fontes de nitrogênio exercem grande influência tanto no crescimento quanto na diferenciação de células e tecidos cultivados "*in vitro*".

## **2. REVISÃO DE LITERATURA:**

### **2.1. Considerações gerais**

#### **2.1.1. Aspectos agronômicos**

As condições climáticas adequadas à cultura de crisântemos são de alta precipitação pluviométrica, alta luminosidade e temperaturas entre 13 e 18°C. Os solos sujeitos a encharcamento devem ser evitados por causa da grande suscetibilidade desta espécie a inúmeras doenças fúngicas, bacterianas e viróticas.

Segundo KOFRANEK (1980), o que é conhecido popularmente como "flor de crisântemo", na verdade é uma inflorescência do tipo capítulo, a qual é classificada em simples, anêmonas, pompom, decorativas e de flores grandes (Figura 1).

O gênero *Chrysanthemum* engloba numerosas espécies, todas herbáceas e de ciclo anual, a maioria exigindo dias curtos para o desenvolvimento de inflorescências, transformando gemas vegetativas em floríferas. Segundo FIDES (1990), o ciclo vegetativo da planta inicia com o plantio das mudas e pode ser caracterizado pelo crescimento vegetativo do meristema apical. O requerimento de luz neste ciclo é de, no mínimo, 16 horas por dia. A suplementação com luz artificial, pode ser a solução para as regiões e épocas do ano em que o comprimento do dia não chega a este valor mínimo necessário.

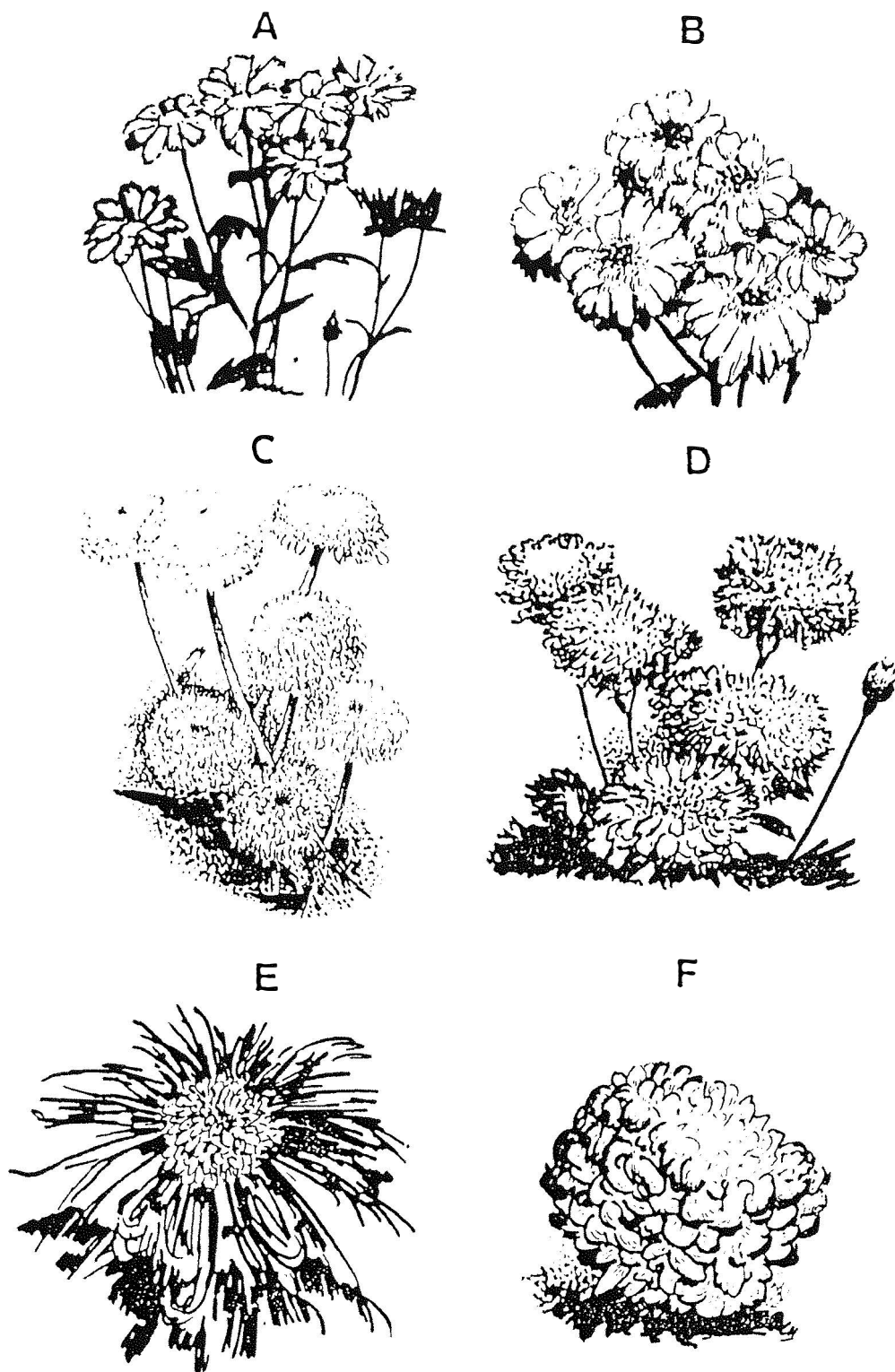


Figura 1: Tipos de inflorescências de crisântemo: (A) simples; (B) anêmonas; (C) pom-pom; (D) decorativas e (E e F) de flores grandes.

(Conforme KOFRANEK, 1980).

Sob período de, no máximo, 11 horas de luz por dia, a planta passa do ciclo vegetativo para o ciclo generativo, no qual ocorre a indução e desenvolvimento do botão floral.

Quanto à propagação esta pode ser feita por sementes ou por enraizamento de estacas. O crisântemo segrega facilmente quando propagado por sementes, sendo propagado comercialmente por estaquia de folha, segundo KOFRANEK (1980). Há, também, a propagação através da cultura de tecidos "*in vitro*" que possui inúmeras vantagens em relação aos métodos convencionais de propagação "*in vivo*" (LIBANIO & WITMER, 1987).

O principal problema que afeta a produção de crisântemos está relacionado à fitossanidade desta planta.

Crisântemos são afetados por fungos, bactérias e, principalmente, por vírus que acarretam sérios danos à sua comercialização. A maioria destas doenças são controladas pela propagação de plantas indexadas e pela técnica de cultura de tecidos meristemáticos (HORSTE & NELSON, 1975).

As principais viroses que afetam os Crisântemos são: *Chrysanthemum stunt viroid* (ChSV); *Chrysanthemum aspermy virus* (ChAV); *Chrysanthemum mosaic virus Q e B* (ChMVQ e ChMVB).

O efeito do ChSV na redução do florescimento e na produção de vários cultivares de crisântemos é mais severo que o das demais viroses. O ChSV causa redução drástica nos diâmetros das flores e nos comprimentos das hastes (HOLLINGS, 1955).

Os sintomas causados por ChSV e pelas demais viroses não são visíveis até a fase do florescimento, constituindo-se numa séria ameaça para a produção de crisântemos, reduzindo drasticamente a sua qualidade e produtividade.

Até o presente, a cultura de ápices caulinares e/ou meristemas "*in vitro*" é uma maneira mais segura e eficiente de se obter mudas isentas de vírus

(BETTI, 1991) e portanto a única maneira de solucionar este problema é a aquisição de mudas sadias e indexadas.

## 2.2. Cultura de tecidos

A técnica de cultura de tecidos de plantas têm sido de grande utilidade na resolução de diversos problemas de várias culturas agronômicas. É uma importante estratégia para o melhoramento, clonagem e micropropagação de plantas em larga escala e para a obtenção de plantas livres de vírus, bactérias e fungos.

Segundo McCOWN & SELLMER (1987), em cultura de tecidos vegetais, os fatores a serem considerados podem ser agrupados em cinco amplas categorias : 1- genótipo, fonte e histórico; 2- composição do meio de cultura; 3- ambiente (luz, temperatura, gases, frascos); 4- tempo (período de subcultivos); 5- interações entre os fatores 1,2,3 e 4.

Para resolver muitos problemas relacionados com a cultura de crisântemo, as técnicas "*in vitro*" da manipulação de tecidos vegetais apresenta-se como uma excelente e inovadora alternativa.

Dependendo dos objetivos, a técnica de cultura de tecidos de plantas pode utilizar-se de explantes meristemáticos e/ou não meristemáticos. Entre os meristemáticos, incluem-se: gemas axilares, regiões apicais e meristema propriamente dito. Os explantes não meristemáticos são: pecíolos, limbo foliar e pedúnculos. A diferença entre os dois tipos de explantes reside no fato de que os meristemáticos consistem de células cujo desenvolvimento está comprometido com o modelo da planta da qual ele foi isolado, enquanto que os explantes não meristemáticos têm desenvolvimento alternativo.

A propagação "*in vitro*" através da organogênese direta à partir de explantes meristemáticos pode ser aplicada para certas espécies com dificuldade de

propagação assexuada (estaquia, alporquia, enxertia, etc). É também bastante importante na propagação de variantes genéticas únicos, obtidos naturalmente ou em laboratório, já que a planta propagada desta maneira será idêntica à planta-mãe. Segundo SAGAWA & KUNISAKI (1990), algumas das grandes vantagens da técnica da multiplicação clonal "*in vitro*" são: a rapidez de multiplicação; controle efetivo de doenças; facilidade no manuseio e transporte; independência da sazonalidade; espaço físico reduzido para o cultivo; utilização de pequenas porções da planta para produção em larga escala comercial.

LIBANIO & WITMER (1987), estudando as diferenças entre plantas de crisântemo propagadas "*in vitro*" e "*in vivo*", constataram que o material propagado "*in vitro*" é mais precoce e homogêneo, apresentando expressiva superioridade na produção e qualidade das flores.

Outra grande vantagem da utilização da cultura de explantes meristemáticos "*in vitro*" está relacionada ao melhoramento fitossanitário e limpeza clonal de alguns patógenos endógenos às plantas, tais como fungos, bactérias e, principalmente, micoplasmas e vírus. Segundo HOSTE & NELSON (1975) o principal problema que afeta a cultura de crisântemos está relacionado à fitossanidade desta planta. A maioria das doenças causadas por fungos, bactérias e vírus são eficazmente controladas pela cultura de tecidos meristemáticos.

O meristema, além de ser um tecido indiferenciado e, por isso, ter alta capacidade de regeneração direta "*in vitro*", é muito usado em limpeza clonal por ser um tecido insento de microrganismos devido à ligação vascular incipiente com outros tecidos (CROCOMO, 1986).

O tamanho do tecido meristemático utilizado como explante para fins de limpeza clonal varia muito, mas, no geral, encontra-se na faixa de 0,1 a 0,5 mm englobando a cúpula meristemática mais um ou dois primórdios foliares (SUTTER & LANGHANS, 1979; BETTI, 1990). Ápices de menores dimensões provavelmente terão menor chance de estarem contaminados por microrganismos,

porém sua capacidade de sobrevivência será inferior em comparação com ápices maiores (STONE, 1963). Em cravos tem-se utilizado, com sucesso, ápices meristemáticos com um ou mais pares de primórdios foliares, indicando o envolvimento destes no desenvolvimento morfogenético do explante (DAVIES et al., 1977; GUKASYAN et al., 1977; PHILLIPS & MATTHEUS, 1960).

Os explantes meristemáticos e não meristemáticos requerem um meio de cultura rico em sais minerais, vitaminas e reguladores de crescimento (principalmente auxinas, citocininas e giberilinas).

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. A interação entre ambas é muito importante e parece determinar a iniciação de novas folhas. JACOBS (1961) e SHABDE & MURASHIGE (1977) relataram que a síntese de auxina ocorre no segundo par de primórdio foliar, enquanto que a síntese de citocinina ocorre no terceiro. Por isso, muitos trabalhos com meristemas têm envolvido não somente a cúpula meristemática mas, também, primórdios foliares.

HOLLINGS (1965); HORST & NELSON (1975) e RAJU & OLSON (1985) encontraram que o melhor meio de cultura para a inoculação de explantes meristemáticos de crisântemo é o meio básico de MURASHIGE E SKOOG (1962), com adição dos reguladores de crescimento BAP (0,2 mg/L); GA<sub>3</sub> (0,1 mg/L) e AIA (0,1 mg/L).

Segundo Dodds & Roberts, citados por MOREL (1975), meristemas inoculados "*in vitro*" de crisântemos, dalias e cravos necessitam da presença de ácido giberélico exógeno (0,1mg/L) no meio de cultura, para uma subsequente micropropagação.

CROCOMO (1986) sugere o uso de ápices caulinares e/ou meristemas em programas de micropropagação para superar o problema da contaminação patogênica dos propágulos.



Indiscutivelmente, a micropropagação é um método biotecnológico de essencial importância para a agricultura moderna. As principais plantas biofabricadas compreendem as ornamentais e as frutíferas.

Entretanto, para o desenvolvimento de um protocolo para micropropagação de determinada espécie vegetal, torna-se necessário adequar um meio de cultura específico controlando-se as condições ambientais e microambientais, além de contornar problemas inerentes a cada cultura. Deve-se levar em consideração que o genótipo e a atividade fisiológica da planta matriz e a manipulação da mesma antes de se isolar o explante, bem como as características do explante utilizado e o procedimento de subcultura adotado também são fatores determinantes para o sucesso de um sistema de micropropagação (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1990).

### **2.3. Planta matriz e explantes**

Segundo GRATTAPAGLIA & MACHADO (1990), o estado fisiológico, nutricional e fitossanitário da planta matriz cujos explantes são retirados têm grande influência no posterior comportamento das culturas. Segundo os mesmos autores os explantes devem ser retirados das brotações novas de plantas bem nutridas e saudáveis.

KOFRANEK (1980) sugere que plantas matrizes de crisântemo devem ser mantidas sob dias longos (maior que 14.5 horas de luz), através da iluminação suplementar com lâmpadas incandescentes ou fluorescentes. Nestas condições as plantas matrizes permanecerão sob estado vegetativo para retirada dos explantes. Há evidências de que o fotoperíodo no qual a planta-mãe se desenvolve exerce influência no enraizamento de estacas, obtendo-se melhor resultado em

fotoperíodos que favoreçam o acúmulo de carboidratos (HARTMANN & KESTER, 1983).

A manutenção das plantas matrizes em casas de vegetação facilita não somente o controle e manipulação do fotoperíodo, intensidade luminosa e temperatura, mas também o controle do estado nutricional e fitossanitário das plantas (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1990).

Para micropropagação é vantajoso a utilização de explantes que contenham grande proporção de tecidos meristemáticos (principalmente gemas apicais e axilares de caules e/ou raízes). Segundo HASEGAWA (1979), gemas apicais de roseiras apresentaram maior capacidade de crescimento do que gemas axilares que estavam sobre o efeito da dominância apical. Já YU & MEREDITH (1986), observaram o contrário em diversas variedades de videira. Porém, devido ao número restrito de gemas apicais disponíveis ou à sua maior susceptibilidade à desinfecção, é comum o uso de gemas axilares. A localização desse tipo de explante na planta matriz ou mesmo na planta "*in vitro*", também é muito importante. MURASHIGE (1974) observou que a capacidade de produção de partes aéreas em segmentos nodais de fumo decresce com o aumento da distância em relação ao ápice.

Murashige & Nakano, citados por FLOH & HANDRO (1991) e LAVEE & GALSTON (1968), verificaram que em medula caulinar de fumo ocorre um aumento de ploidia no sentido ápice-base e que as respostas de crescimento e organogênese são dependentes da região de onde o explante é retirado sendo que o potencial de crescimento decresce no sentido do ápice para a base. Além disso, o gradiente morfogenético está associado a gradientes de ploidia, atividade de peroxidase, conteúdo de proteínas e ácidos nucléicos. Respostas iniciais variam com explantes de ploidias diferentes provavelmente devido a diferentes níveis endógenos de hormônios e a sensibilidades distintas dos tecidos aos reguladores de crescimento aplicados exogenamente (FLOH & HANDRO, 1985).

Para a maioria dos sistemas de micropropagação é utilizado o método de multiplicação através da proliferação de gemas axilares. As gemas axilares que se formam naturalmente nas inserções das folhas são estimuladas a crescer, dando origem a novas partes aéreas, que, por sua vez, repetem o mesmo processo (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1990). Segundo CUQUEL (1992), a presença de folhas nas estacas de crisântemo exerce influência estimuladora na formação de raízes devido não somente à produção de carboidratos pela atividade fotossintética das folhas, mas principalmente devido à produção de auxinas pelas mesmas.

#### **2.4. Meios de cultura**

Diversos sais suprem a necessidade de macro e micronutrientes nos meios de cultura, determinando um crescimento saudável e vigoroso (GEORGE & SHERRINGTON, 1984).

A maioria das espécies mostra diferenças qualitativas no crescimento, quando mantidas em distintas formulações de meios de cultura. O meio de cultura mais utilizado é o de MURASHIGE & SKOOG (1962) (meio MS) com alterações específicas para cada cultura.

A composição de macronutrientes é muito importante e influencia a formação de órgãos de várias espécies. Nitrogênio e potássio são muito importantes para a formação de brotos em *Chrysanthemum morifolium* (ROEST & BOKELMANN, 1975).

Além dos macro e micronutrientes, os meios de cultura devem conter também reguladores de crescimento, vitaminas, aminoácidos, uma fonte de carbono e energia e outras substâncias opcionais de acordo com o objetivo do trabalho em questão.

## 2.5. Nitrogênio

O nitrogênio entra na maioria dos meios de cultura em altas proporções, por isso mesmo sua quantidade bem como as fontes utilizadas são de primordial importância, exercendo forte influência no crescimento das culturas (VELIK, 1973).

As plantas podem utilizar tanto fontes nitrogenadas sob a forma de cátion (amônio) como sob a forma de ânion (nitrato e nitrito). Sob condições assépticas, o nitrogênio reduzido é utilizado pelas culturas quando fornecido como amônio ou como nitrogênio combinado em certos componentes orgânicos que contêm grupos amina (NH<sub>2</sub>) ou amida (CONH<sub>2</sub>), como, por exemplo, aminoácidos e uréia (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1990).

A vantagem dos tecidos vegetais receberem pelo menos parte do nitrogênio sob uma forma prontamente reduzida é que haveria uma diminuição no gasto de energia que ocorre na conversão enzimática de nitrato à amônio (GEORGE et alii, 1987). Porém, quando o nitrogênio é fornecido somente na forma de sais de amônio, as células "*in vitro*" apresentam sintomas de toxidez (HELLER, 1965; YATAZAWA & FURUHASHI, 1968; GAMBORG & SHULUK, 1970).

Segundo RAAB & TERRY (1994), em virtude do grande requerimento de energia fotoquímica para a redução bioquímica do nitrato, era de se esperar que as plantas crescem melhor em meios com amônia do que em meios com nitrato como única fonte de nitrogênio, no entanto, ocorre o inverso. Estes mesmos autores, apontaram como causa deste paradoxo, o efluxo de íons H<sup>+</sup> que ocorre devido à absorção do íon amônio, provocando acidificação do meio e impedindo a absorção de muitos nutrientes. SHEAT et al (1959); MARTIN et al (1977) e DOUGALL (1980), também sugeriram que insucessos na cultura de células vegetais em meio contendo amônio como única fonte de nitrogênio são devidos a

absorção de muitos nutrientes. SHEAT et al (1959); MARTIN et al (1977) e DOUGALL (1980), também sugeriram que insucessos na cultura de células vegetais em meio contendo amônio como única fonte de nitrogênio são devidos a um excessivo decréscimo no valor pH. Segundo HASHIMOTO et al (1992), a presença de amônio "*in vitro*" poderia acidificar o meio favorecendo a síntese de carbamatos e também a atividade da anidrase carbônica. Estes autores conseguiram diminuir o efeito tóxico do amônio apenas diluindo a concentração de nitrato de amônio no meio MS.

Segundo GASPAR et al (1985) e GEORGE et al (1987), um efeito prejudicial de altas concentrações de íons amônio em meios de cultura é o fenômeno da vitrificação da parte aérea de algumas espécies, podendo inclusive conduzir à morte da cultura. QUOIRIN & LEPOIVRE (1977) reduziram para 1/4 a concentração de nitrato de amônio do meio MS e utilizaram nitrato de cálcio como fonte exclusiva de cálcio e adicional de nitrogênio em experimento com três espécies de *Prunus*. Eles observaram um aumento na taxa de multiplicação e a eliminação do problema de vitrificação das culturas. Da mesma forma, ZIV et al (1987) aumentaram a proporção de plantas não vitrificadas de crisântemos, reduzindo os níveis ou eliminando completamente o nitrato de amônio do meio MS.

Para combater o efeito tóxico do íon amônio, as células rapidamente o convertem em ácido L-glutâmico pela aminação do ácido alfa-cetoglutárico. A atividade da enzima responsável, desidrogenase do glutamato, é induzida por altas concentrações de amônio. Portanto, a presença de amônio no meio induz a um aumento na síntese de aminoácidos e proteínas às expensas do metabolismo de carboidratos (GEORGE et al, 1987).

A toxidez do amônio para as células diminui ou desaparece quando este é usado como única fonte de nitrogênio, porém na forma de um ácido orgânico,

ser benéficos para a organogênese da parte aérea (FLICK et al, 1983). A embriogênese também é, reconhecidamente, dependente da presença de nitrogênio reduzido no meio de cultura (AMMIRATO & STEWARD, 1971; AMMIRATO, 1983; GEORGE et al, 1987).

Já o nitrato, como única fonte de nitrogênio, sustenta boa taxa de crescimento em algumas culturas, tais como: fumo (MATSUMOTO et al, 1971); roseira (NASH & DAVIES, 1972) e trigo (GAMBORG et al, 1968; GAMBORG & SHYLUK, 1970 e BAYLEY et al, 1972). Entretanto, há espécies que não crescem bem com nitrato no meio, como, por exemplo, arroz (YATAZAWA & FURUHASHI, 1968).

KERBAUY (1993), observou efeitos favoráveis do nitrato sobre o crescimento longitudinal das raízes e também sob a formação de raízes laterais em *Oncidium varicosum*. DREW et alii (1973), sugeriram que o suprimento localizado de nitrato à certas regiões definidas de raízes de aveia induziria nestas, a síntese ou o translocamento de hormônios de outras partes, os quais, então, direcionariam o transporte de assimilados para esta zona promovendo o maior crescimento.

Segundo Braun & Wood citados por GRATTAPAGLIA & MACHADO (1990) e YATAZAWA & FURUHASHI (1968), o ideal seria uma combinação das duas formas de nitrogênio, amônio (forma reduzida) e nitrato (forma oxidada). Esta combinação tem estimulado o crescimento de várias espécies de plantas "in vitro" e a razão entre as concentrações destas duas formas é que parece ser o fator determinante causador deste estímulo, sendo que o amônio deveria ser, no máximo, um terço do nitrogênio total.

Outras formas de nitrogênio reduzido prontamente assimiláveis e energeticamente não dispendiosas, têm estimulado o crescimento de células e tecidos vegetais em cultura. Estas formas de nitrogênio orgânico incluem os aminoácidos, a úreia, as poliaminas e os ureídeos (KIRBY et al, 1987).

A adição de aminoácidos ao meio de cultura pode tanto ser benéfica quanto prejudicial ao crescimento dos tecidos cultivados "*in vitro*" (GAMBORG et al, 1968).

Embora a maioria das culturas não requeiram suplementação com aminoácidos para crescerem adequadamente "*in vitro*", em certos casos o crescimento e a morfogênese podem ser incrementados em sua presença.

De acordo com GONÇALVES (1975), para a maioria dos tecidos cultivados, aminoácidos isolados ou misturados são inefetivos como única fonte de nitrogênio ou são nitidamente inferiores em relação ao nitrato. Entretanto, Demetriades, citado por GONÇALVES (1975), encontrou para várias culturas de calos que ácido aspártico e glutâmico ou arginina poderiam substituir os requerimentos pelo nitrato. TONIN et al. (1981), observaram que diferentes combinações de aminoácidos proporcionaram acentuada proliferação de calos e estimularam a rizogênese de folhas de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) cultivadas "*in vitro*".

A amida glutamina tem sido utilizada com muito sucesso na complementação das fontes de nitrogênio, bem como única fonte desse elemento, estimulando o crescimento de tecidos diversos "*in vitro*", como por exemplo em *Picea* (RISSER & WHITE, 1964). Também para a cultura de embriões e meristemas, a glutamina pode ser a melhor fonte de nitrogênio (CREPY et al, 1982). Glutamina + cisteína influenciaram positivamente o alongamento de gemas de clones de *Eucalyptus grandis* "*in vitro*" (GROTHEGE, 1992)

POLACCO (1976; 1977) trabalhando com cultura de células de soja em suspensão verificou um bom crescimento quando úreia foi fornecida ao meio juntamente com a adição de níquel. BEHREND & MATELES (1976) e GROTHEGE (1992), também chegaram a conclusão que na cultura de células pode-se utilizar uréia como uma boa fonte de nitrogênio.

A assimilação de nitrogênio proveniente da uréia é realizada através de duas vias metabólicas. A primeira, envolve a hidrólise da uréia em amônio e dióxido de carbono por meio da ação da urease. Numa segunda via, a uréia é convertida à alofanato através da ação da carboxilase de uréia. O alofanato é, então, convertido à amônio e dióxido de carbono, através da ação da hidrolase do alofanato (KIRBY et al, 1987). Segundo estes autores, culturas que foram estabelecidas em meio contendo uréia como única fonte de nitrogênio cresceram mais lentamente que células mantidas em meio de cultura contendo nitrato e amônio.

## 2.6. Fontes de carbono

Outro importante componente dos meios de cultura são os carboidratos. Estes fornecem energia metabólica e esqueleto carbônico para a biossíntese de polissacarídeos estruturais como celulose, aminoácidos, proteínas e todos os componentes orgânicos necessários para o crescimento de células, tecidos e plântulas cultivadas "*in vitro*". A sacarose é o carboidrato mais utilizado nos meios de cultura (CALDAS et al., 1990).

FRIDBORG et al (1971) mostrou que culturas de *Allium cepa* cresceram bem num meio contendo 4% de sacarose, enquanto que glicose não foi efetiva como fonte de carbono.

A concentração de sacarose também é fator importante para se obter ótimo crescimento e multiplicação de células. Concentrações de 2 a 4% (p/v) são as mais comuns. Na maioria das culturas e explantes é utilizado a concentração de 3% de sacarose. Às vezes, concentrações maiores podem incrementar o crescimento de algumas culturas "*in vitro*" (CALDAS et al., 1990).

ROEST & BOKELMANN (1975), trabalhando com dois cultivares de *Chrysanthemum morifolium* (Ramat), verificaram que a presença de sacarose no



meio de cultura é exigida para o início e desenvolvimento de brotos adventícios e formação de grande número de explantes, independentemente da combinação de hormônios utilizada. Observaram também que maiores números de brotos foram produzidos numa concentração de 3 a 5% de sacarose.

Geralmente, para o enraizamento é necessário a redução da concentração de sacarose. Em *Chrysanthemum morifolium* meio MS com apenas 1% de sacarose foi utilizado com sucesso para a indução de raízes com o acréscimo de somente 0,1% de AIA. Neste meio, segundo SANGWAN & DETREZ (1987), houve um excelente enraizamento e desenvolvimento de brotos (4-5 cm).

## **2.7. Fitorreguladores de crescimento**

Segundo LINSMAIER-BEDNAR & SKOOG (1967), certos tecidos são totalmente dependentes da presença de reguladores de crescimento exógenos no meio, já outros, sintetizam as quantidades que necessitam (tecidos autotróficos).

Dentre os reguladores de crescimento, as auxinas e citocininas são as classes mais utilizadas na cultura de tecidos "*in vitro*", sendo que a disponibilidade e interação entre elas regulam a formação de raízes, parte aérea e calo (SKOOG & MILLER, 1957). Estes dois reguladores são chaves no desenvolvimento dos explantes e estão intimamente ligados à divisão celular bem como ao crescimento do meristema e a interação entre ambas parece determinar a iniciação de novas folhas (CUZZUOL, 1993).

São muito conhecidos, de longa data, os efeitos estimulatórios das auxinas na indução de calos e raízes (SKOOG & MILLER, 1957). Dentre as auxinas, o AIA, instável e facilmente degradado pela luz ou atividade microbiana, é considerada uma auxina fraca em relação ao 2,4 D que é mais utilizado na indução de calos (CALDAS et al., 1990). O AIA e ABA são mais utilizados para a formação

de raízes *"in vitro"* e também podem ser utilizados na fase de multiplicação juntamente com as citocininas, onde atuaria anulando o efeito inibitório que as citocininas têm sobre o alongamento das culturas e também mantendo um caule único com dominância apical num sistema onde novos segmentos nodais sejam desejados como forma de multiplicação. Porém, neste caso a concentração de auxina tem que ser muito inferior ao da citocinina, para que não haja um favorecimento na formação de calos e raízes em detrimento da multiplicação (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1990).

AHMED & ANDREA (1987), trabalhando com *Chrysanthemum morifolium*, verificaram que a dosagem de 0,1 mg/L de AIA já era suficiente para provocar a formação de calos nas bases dos explantes devido à sensibilidade destes a esta auxina. Notaram também que a melhor formação de raízes foi obtida quando se utilizou meio MS sem a adição de nenhum regulador de crescimento.

Nessa mesma espécie, EARLE & LANGHANS (1974) constataram que, mesmo utilizando níveis muito baixos de auxinas combinadas com diversas dosagens de cinetina, havia a formação de calos basais verdes nos brotos em crescimento. Notaram ainda que, utilizando baixos níveis de cinetina, havia a formação de brotos únicos em crescimento contínuo. Entre os níveis de cinetina (2,0, 5,0 ou 10,0 mg/L), provocavam a formação de cinco ou mais brotos em crescimento lento e, também, de grandes calos basais. Deve-se entretanto, ter em mente que a passagem pela fase de calo provoca, muitas vezes, variabilidades genéticas indesejáveis, principalmente na forma de poliploidização e aneuploidização (AMMIRATO, 1983).

É sabido que as citocininas são indispensáveis para quebra da dominância apical e indução de proliferação de gemas axilares. Porém, enquanto seu uso na dosagem correta estimula maior produção e crescimento de partes aéreas, o seu excesso é tóxico e compromete o desenvolvimento das culturas. Os sintomas de toxidez de citocinina no meio de cultura são: entufamento e falta de crescimento

genéticas indesejáveis, principalmente na forma de poliploidização e aneuploidização (AMMIRATO, 1983).

É sabido que as citocininas são indispensáveis para quebra da dominância apical e indução de proliferação de gemas axilares. Porém, enquanto seu uso na dosagem correta estimula maior produção e crescimento de partes aéreas, o seu excesso é tóxico e compromete o desenvolvimento das culturas. Os sintomas de toxidez de citocinina no meio de cultura são: entufamento e falta de crescimento das culturas, redução nos tamanhos das folhas, encurtamento dos entrenós, engrossamento excessivo dos caules, vitrificação, formação de calos basais (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1990).

LESHEM et al (1988), verificaram o efeito tóxico de citocininas nas culturas de crisântemo e de melão, as quais apresentaram um excessivo hábito entufado e grande vitrificação de suas folhas.

Para se ajustar uma dosagem adequada de citocinina na multiplicação da parte aérea de muitas culturas é necessário estar ciente de que o efeito deste grupo de fitorreguladores não se restringe a uma subcultura havendo um efeito residual que pode ser extremamente tóxico e prejudicial ao alongamento e à fase posterior de enraizamento destas culturas "*in vitro*" (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1990).

Além das concentrações de citocininas nas diferentes subculturas, o tipo utilizado também influencia sobremaneira no sucesso da multiplicação "*in vitro*".

Segundo ZAERR & MAPES (1985), o BAP é a citocinina mais potente para promover multiplicação de partes aéreas e indução de gemas adventícias e é, também, economicamente melhor por ser mais barata que as demais. O 2iP e cinetina são citocininas mais fracas que precisam ser utilizadas em concentrações de até dez vezes superiores.

Na maioria dos trabalhos de micropropagação com a cultura de crisântemo, o BAP foi a citocinina mais utilizada, em concentrações muito baixas (AHMED & ANDREA, 1987; EARLE & LANGHANS, 1974; ROEST & BOKELMANN, 1975).

## **2.8. Dominância apical**

Muito antes da descoberta da regulação hormonal do crescimento vegetal, a dominância apical, isto é, a habilidade que a gema apical tem de inibir o desenvolvimento das gemas laterais, já era bem conhecida (FERRAZ, 1987), podendo-se, facilmente, demonstrar este fenômeno pela remoção da gema apical da planta e observação de um posterior desenvolvimento das gemas laterais mais próximas.

Desde 1934 com os trabalhos de Skoog & Thimann citados por FERRAZ (1987), auxinas têm sido correlacionadas com o fenômeno da dominância apical em plantas. Esses autores sugeriram que a inibição seria provocada por uma dose supra ótima deste hormônio.

Em trabalhos mais recentes, outros fitorreguladores também têm sido mencionados como participantes deste fenômeno. Morgan & Isbell citados por FERRAZ (1987) concluíram que havia um papel positivo das auxinas e negativo das citocininas na dominância apical, sendo que o ácido giberélico têm um papel crucial em "informar" o balanço em uma ou outra direção.

Segundo GRATTAPAGLIA & MACHADO (1990), as citocininas constituem o grupo de fitorreguladores indispensável para a quebra da dominância apical e indução de proliferação de gemas axilares.

PILATE et alii (1989) observaram que brotos de ápices ativos continham mais AIA e zeatina (citocinina) do que brotos laterais inativos. Nestes brotos

inibidos foram encontrados altos níveis de 2iP. A presença desta forma de citocinina armazenada indicaria que um broto quiescente perde a habilidade para hidroxilar 2iP para a forma zeatina, ficando inibido. Estes autores concluíram que AIA (em concentrações baixas) e zeatina + zeatina ribose são essenciais para o crescimento dos brotos laterais. Foi concluído também que ABA parece não ter nenhum papel no fenômeno da dominância apical.

O tecido apical de uma planta é local de intensa síntese de auxina. Este fitorregulador é traslocado do ápice para o tecido imediatamente abaixo, onde promove alongamento celular (transporte polar da auxina). Acontece que não coincidentemente a maior produção de etileno ocorre no ápice ou imediatamente abaixo deste. Segundo FERRI (1979), já no ano de 1935, Crocker, Hitchcock, Wilcoxon e Zimmerman descobriram que a auxina regulava a produção de etileno e que muitos fenômenos anteriormente atribuídos ao efeito direto da auxina são, na verdade, devidos ao etileno induzido pela auxina, tais como: epinastia, inibição de crescimento do caule e de raízes, promoção de floração em bromélias. Em trabalhos mais recentes foi demonstrada a influência de níveis supra-ótimos de auxina sob a produção de etileno (BLAKE & REID, 1981; ABELES, 1973).

Segundo LIEBERMAN & KUNISHI (1979) uma das mais recentes e intrigantes descobertas a respeito da ação do etileno refere-se a interação com outros fitorreguladores ao nível de metabolismo, especialmente durante o desenvolvimento dos tecidos e na diferenciação celular. Esta descoberta revela que níveis extremamente baixos são requeridos para desenvolvimento e crescimento, enquanto que altos níveis podem ser inibitórios ou antagônicos.

BLAKE & REID (1981) trabalharam com ervilhas e demonstraram que a decapitação de plantas (retirada dos ápices) promovia brotamento dos brotos axilares. Observaram que nestas plantas decapitadas a concentração de etileno diminuía. Quando AIA era adicionado no topo do corte nas concentrações de 10 ug

diminuía. Quando AIA era adicionado no topo do corte nas concentrações de 10 ug e 20 ug/planta/dia, havia inibição do autocrescimento dos brotos laterais e, paralelamente, aumento da concentração de etileno. Observaram também que quando etileno foi adicionado (3, 15 e 1500 ul/l) houve redução do autocrescimento dos brotos laterais ao passo que quando foram adicionadas substâncias que "lavam" o etileno (perclorato mercúrico), inibem sua síntese (canalina), ou previnem sua ação (nitrato de prata), ocorreu um acentuado aumento no crescimento destes brotos em plantas decapitadas. Estes autores puderam concluir que a inibição do crescimento de brotos de ervilhas devido a síntese de etileno pela auxina é uma hipótese mais aceitável que a inibição pela auxina, por si só.

KAZEMI (1980), trabalhando com feijão, também concluiu que há uma inibição correlativa do crescimento dos brotos laterais pelo ápice devido a ação do etileno induzido pela auxina.

Segundo HUBERMAN & JAFFE (1981), em tecidos injuriados por perturbações mecânicas há um acentuado aumento na produção de etileno, principalmente nas primeiras duas a três horas e esta produção varia segundo o local do "ferimento" na planta.

A nutrição nitrogenada não foi uma importante variável na expressão da indução artificial da dominância apical e, provavelmente, não exerce nenhuma influência sobre este fenômeno (FEDDIS & HESS, 1970).

SOSSOUNTZOV et al. (1985) constataram que, após a retirada dos ápices de *Marsilea drummondii* A. Br., houve um rápido estímulo de ATPase e dos íons  $Mg^{+2}$  e  $K^{+}$  observado nas membranas plasmáticas dos brotos laterais destas plantas. Constataram que este estímulo é pré-requisito essencial para a ocorrência da atividade dos brotos laterais. Segundo estes autores a inibição do crescimento dos brotos laterais está correlacionada com a limitada eficiência do sistema de transporte da membrana plasmática para nutrição dos brotos, devido a ausência da

atividade de ATPase. Esta enzima tem valor pH ótimo 6,5 e alta especificidade para  $Mg^{+2}$  e sua ativação é cineticamente correlacionada com o fluxo de  $K^{+}$ .

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. Plantas matrizes**

Os experimentos foram conduzidos no Centro de Biotecnologia Agrícola (CEBTEC), Departamento de Química, ESALQ/USP, em Piracicaba/SP e no Departamento de Fisiologia Vegetal do Instituto de Biologia da UNICAMP, em Campinas/SP.

As mudas de *Chrysanthemum morifolium* cv. Amarelo São Paulo utilizadas neste trabalho foram adquiridas junto a produtores da região de Atibaia/SP. A Figura 2 ilustra o aspecto da flor deste cultivar.

#### **3.2. Preparo das matrizes**

As mudas provenientes de plantas matrizes foram tratadas com inseticida e fungicida antes do plantio, o qual foi feito em vasos contendo substrato tratado termicamente à 120° C sob 1 atm de pressão por 3 horas. Este substrato era uma mistura de vermiculita e terra argilosa (50/50 v/v).

As mudas foram mantidas em casa de vegetação, onde foram diariamente irrigadas e semanalmente pulverizadas com inseticida. Sob condições controladas o fotoperíodo utilizado foi maior que 14.5 horas diárias de luz, utilizando-se para tanto “flashes” de luz branca fornecidos por lâmpadas





Figura 2 - Aspecto de flor (A) e da planta (B) de *Chrysanthemum morifolium* cultivar Amarelo São Paulo.

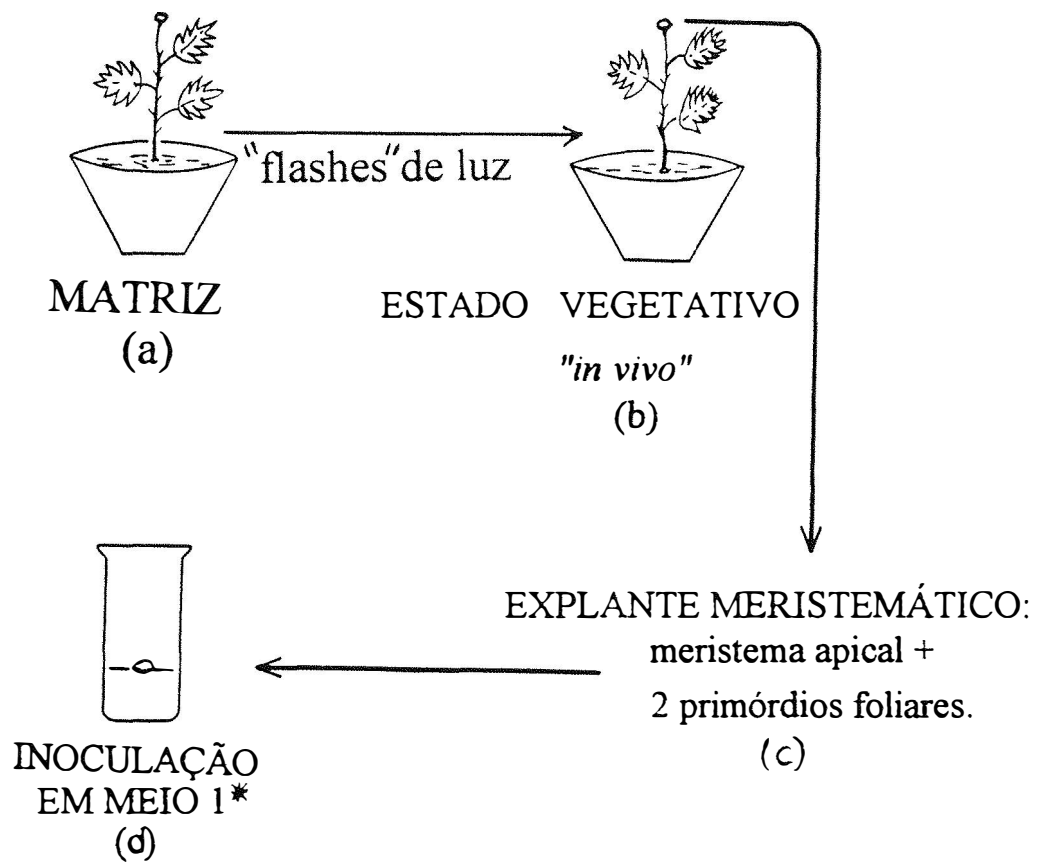
incandescentes durante 3 minutos a noite, com a finalidade de interromper o efeito das noites longas, garantindo assim a manutenção das mudas em estado vegetativo para a retirada dos explantes.

### **3.3. Obtenção dos explantes e assepsia**

A obtenção dos explantes é mostrada esquematicamente na sequência das Figuras 3, 4 e 5. Os explantes utilizados foram retirados dos ápices dos ramos das plantas envasadas (Figura 3b) e a assepsia dos mesmos englobou as seguintes etapas: 1<sup>a</sup>) lavagem em solução de água e detergente neutro TWEEN-20 (0,1%) e enxague em água corrente; 2<sup>a</sup>) sob condições assépticas, lavagem em solução comercial de hipoclorito de sódio (20%-v/v) mais TWEEN-20 (0,1%-v/v) durante 20 minutos sob agitação; 3<sup>a</sup>) lavagem em água deionizada esterilizada (quatro vezes).

Após a desinfestação dos ápices, estes foram abertos e isolados com auxílio de bisturi, pinças e estiletes, ao microscópio estereoscópico, utilizando-se aumento de 80 a 100 vezes. Foram excisados explantes de 0,1 a 0,2 mm constituídos pela cúpula meristemática mais um par de primórdios foliares (Figura 3c). O explante meristemático foi imediatamente inoculado em meio MS (Tabela 1) suplementado com 0,2 mg/L de BAP (Meio 1) contido em tubo de ensaio de 5 ml (Figura 3d).

A incubação deste material foi feita em sala de crescimento com intensidade luminosa de 2000 lux, fotoperíodo de 12/12 horas (luz/escuro) e temperatura de 25° C ± 1° C.



\* MEIO 1: Meio MS + 0,2 mg/L de BAP.

Figura 3 - Esquema de obtenção e inoculação do explante meristemático original.

Tabela 1 - Composição do meio de cultura básico de MURASHIGE &amp; SKOOG (1962)

| Componentes   | mg/L  | mM     |
|---|-------|--------|
| Macronutrientes:                                    |       |        |
| NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>                     | 1650  | 20,6   |
| KNO <sub>3</sub>                                    | 1900  | 18,8   |
| CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O                | 440   | 2,99   |
| MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O                | 370   | 1,50   |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                     | 170   | 1,25   |
| Micronutrientes:                                    |       |        |
| MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O                | 22,3  | 0,100  |
| ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O                | 8,6   | 0,0299 |
| H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>                      | 6,2   | 0,100  |
| KI  | 0,83  | 0,005  |
| Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O | 0,25  | 0,001  |
| CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O                | 0,025 | 0,0001 |
| CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O                | 0,025 | 0,0001 |
| Na <sub>2</sub> EDTA.2H <sub>2</sub> O              | 37,3  | 0,100  |
| FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O                | 27,8  | 0,100  |
| Glicina   | 2,0   | 0,0266 |
| Ácido Nicotínico                                    | 0,5   | 0,004  |
| Piridoxina.HCl                                      | 0,5   | 0,0024 |
| Tiamina.HCl   | 0,1   | 0,0003 |

Um único explante meristemático diferenciou-se em uma planta com aparência sadia, a qual deu origem às demais plantas via brotações laterais (Figura 4).

Explantes oriundos da parte central da região caulinar contendo uma gema e uma folha e medindo aproximadamente 1,0 cm de comprimento (Figura 4 e 5) foram excisados da planta regenerada em condições assépticas e transferidos para meios de multiplicação (Meio 2). As plantas assim obtidas foram novamente multiplicadas via brotações laterais. Este processo repetiu-se até a obtenção de um número suficiente de plantas para o início dos experimentos.

O delineamento adotado em todos os experimentos realizados neste trabalho foi o inteiramente casualizado.

### **3.4. Experimentos**

#### **3.4.1. Experimento I : Meio MS com diferentes concentrações de BAP e AIA**

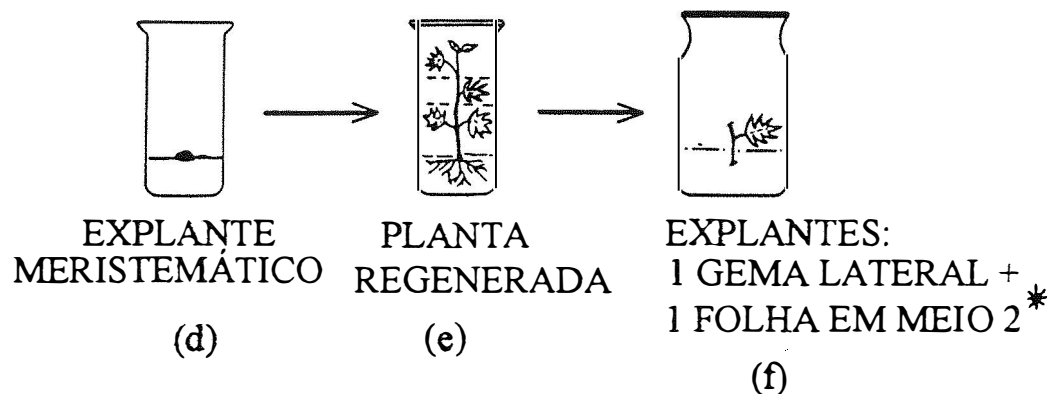
A interação citocinina/auxina (BAP/AIA) foi testada nas seguintes dosagens e concentrações:

BAP :(0,0); (2,0); (4,0); (6,0); (8,0); (10,0) mg/L

AIA :(0,0); (0,1); (1,0); (10,0) mg/L

Foram conduzidos 24 tratamentos, com 10 repetições cada um. A avaliação dos parâmetros foi realizada da seguinte maneira:

- Comprimento do eixo apical;
- Avaliação dos fenótipos dos explantes.



\* MEIO 2: MS completo sem a adição de fitorreguladores.

Figura 4 - Micropropagação do explante meristemático original via brotações laterais em condições de laboratório

(Continuação da Figura 3)

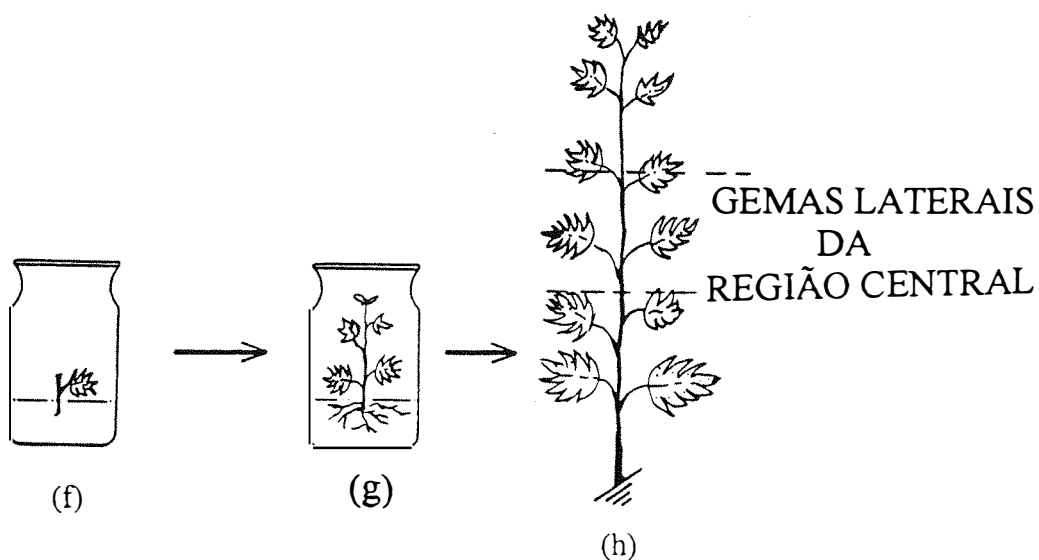


Figura 5 - Explantes: segmentos nodais excisados de plantas obtidas "in vitro"

(Continuação da Figura 4)

### 3.4.2. Experimento II : Meio MS com diferentes concentrações de BAP e Nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ )

Neste experimento utilizou-se o nitrato de prata, um competidor específico do etileno, com o objetivo de se verificar a influência da presença ou da ausência da ação deste hormônio, bem como sua interação com o fitorregulador BAP no desenvolvimento das gemas laterais.

Os explantes foram inoculados em meio de cultura MS básico em presença ou ausência de BAP (0,0 e 0,4 mg/L) e presença ou ausência de nitrato de prata (0,0 e 100 mg/L).

Foram conduzidos, portanto, 4 tratamentos:

T1: 0,0 mg/L de BAP e 0,0 mg/L de  $\text{AgNO}_3$

T2: 0,4 mg/L de BAP e 0,0 mg/L de  $\text{AgNO}_3$

T3: 0,0 mg/L de BAP e 100 mg/L de  $\text{AgNO}_3$

T4: 0,4 mg/L de BAP e 100 mg/L de  $\text{AgNO}_3$

Em cada tratamento foram realizadas 10 repetições e os parâmetros analisados foram:

-Comprimento do eixo apical (cm);

-Número de folhas;

-Número de raízes;

-Massa de matéria fresca (g);

-Massa de matéria seca (g).

A massa de matéria seca foi obtida à partir da parte aérea das plantas, as quais foram colocadas em estufa à 80° C por 2 dias.

Os dados do experimento foram analisados estatisticamente e submetidos ao teste de Tukey a 5% de significância.

### 3.4.3. Experimento III: Fontes de nitrogênio

Os explantes foram inoculados em meio de cultura básico MS completo sem adição de fitorreguladores. A fonte de carbono utilizada foi sacarose (30 g/L) e para a solidificação do meio foi usado ágar marca Cialgas (8 g/L).

Nos tratamentos onde a uréia foi utilizada como fonte única ou suplementar de nitrogênio, os meios de cultura foram preparados de maneira convencional, porém sem a adição da solução de uréia. Esta solução foi previamente esterilizada através de filtração em Millipore e então adicionada ao meio de cultura já autoclavado e esterilizado e ainda no estado líquido. Estas operações foram feitas no interior da câmara asséptica.

Foram realizados oito tratamentos (Figura 6), dos quais o tratamento I consistiu da inoculação dos explantes em meio MS básico. Nos demais tratamentos as fontes de nitrogênio foram variadas (Tabela 2), porém todos os demais nutrientes permaneceram exatamente iguais ao do meio MS.

Todos os tratamentos foram devidamente balanceados de forma a manter constante o teor de nitrogênio total contido no meio MS (60,0 mM), variando-se somente a fonte de nitrogênio e não a sua quantidade (Tabela 2).

O experimento consistiu de 20 repetições por tratamento num delineamento inteiramente casualizado. Aos 35 dias após a instalação do experimento foram coletadas 10 amostras aleatoriamente para análise comparativa dos seguintes parâmetros:

- Massas de matéria fresca e seca (g);
- Número de folhas;
- Altura do eixo caulinar principal (cm);
- Quantidade e comprimento de raízes (cm).



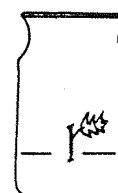
Outras 10 amostras foram analisadas aos 70 dias, levando-se em conta os mesmos parâmetros mais um parâmetro extra: determinação de nitrogênio total.

Para a determinação de nitrogênio total utilizou-se o material proveniente das massas de matéria seca somente das partes aéreas das plantas, as quais foram obtidas da mesma maneira que no experimento II. As análises foram feitas no Departamento de Química-ESALQ/USP.

Os dados do experimento foram analisados estatisticamente e submetidos ao teste de Tukey à 5% de significância.

Tabela 2 - Fontes de nitrogênio utilizadas nos oito tratamentos e balanceamento realizado de forma a manter constante o teor de nitrogênio total contido no meio MS (60 mM)

| SAIS (mg / l)                   | E1   | E2      | E3     | E4      | E5      | E6      | E7      | E8      |
|---------------------------------|------|---------|--------|---------|---------|---------|---------|---------|
| NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> | 1650 | 0       | 0      | 0       | 0       | 0       | 0       | 0       |
| KNO <sub>3</sub>                | 1900 | 0       | 1900   | 1900    | 1900    | 0       | 0       | 0       |
| NH <sub>4</sub> Cl              | 0    | 3211,61 | 0      | 0       | 0       | 0       | 0       | 0       |
| KCl                             | 0    | 1400,9  | 0      | 0       | 0       | 0       | 0       | 0       |
| NaNO <sub>3</sub>               | 0    | 0       | 3505,8 | 3222,58 | 2939,33 | 0       | 0       | 0       |
| URÉIA                           | 0    | 0       | 0      | 100     | 200     | 1803,04 | 0       | 901,5   |
| GLUTAMINA                       | 0    | 0       | 0      | 0       | 0       | 0       | 4386,02 | 2193,01 |

**E1****E2****E3****E4****E5****E6****E7****E8**

- E1: Fonte de nitrogênio inorgânica (amoniacal + nítrica)  
 E2: Fonte de nitrogênio inorgânica (amoniacal)  
 E3: Fonte de nitrogênio inorgânica (nítrica)  
 E4: Fonte de nitrogênio inorgânica + orgânica (nítrica + uréia-100 mg/L)  
 E5: Fonte de nitrogênio inorgânica + orgânica (nítrica + uréia-200 mg/L)  
 E6: Fonte de nitrogênio orgânica (uréia)  
 E7: Fonte de nitrogênio orgânica (glutamina)  
 E8: Fonte de nitrogênio orgânica (uréia + glutamina)

Figura 6 - Inoculação dos explantes em meios contendo várias fontes de nitrogênio:

E1: NH<sub>4</sub><sup>+</sup> + NO<sub>3</sub><sup>-</sup>; E2: NH<sub>4</sub><sup>+</sup>; E3: NO<sub>3</sub><sup>-</sup>; E4: uréia (100 mg/L) + NO<sub>3</sub><sup>-</sup>; E5: uréia (200 mg/L) + NO<sub>3</sub><sup>-</sup>; E6: uréia; E7: glutamina; E8: uréia + glutamina.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Experimentos preliminares: sacarose e natureza do agente gelificante

Para padronização de metodologia testou-se o efeito de duas concentrações de sacarose (30 e 40 g/L) sob o desenvolvimento dos explantes em meio MS sem a adição de fitorreguladores. Não foi observada diferença estatística significativa quanto à altura, número de folhas, número e comprimento de raízes entre as duas concentrações, portanto determinou-se a utilização de 30 g/L de sacarose em todos os experimentos realizados neste trabalho.

Foi também testada a utilização de "Gelrite" e de ágar (Cialgas) em meios MS com adição de BAP em várias concentrações. Observou-se que o fenômeno da vitrificação nos explantes de crisântemo ocorria com maior frequência em meios com "Gelrite" do que em meios com ágar, nas mesmas concentrações deste fitorregulador para ambos. PASQUALETTO et al. (1988) também notaram maior vitrificação *"in vitro"* em culturas de macieira no "Gelrite" do que no ágar.

Foram testadas as seguintes concentrações de ágar: 0,6%, 0,8% e 1,0%. Não foi observada diferença estatística quanto à altura e ao número de folhas e raízes. Porém determinou-se o uso de 0,8% de ágar em todos os experimentos realizados neste trabalho, o que proporcionou uma boa sustentação dos explantes.

#### 4.2. Experimento I: Interação BAP x AIA:

As plantas contidas em meio MS sem a adição de fitorreguladores foram as que apresentaram melhor desenvolvimento tanto da parte aérea quanto de raízes, com aspecto saudável, tendo atingido uma média de altura do eixo caulinar principal igual a 4,28 cm, bem como raízes compridas e de espessura média (Figura 7a e 8).

Quando utilizou-se BAP na concentração igual ou superior a 2 mg/L houve um excessivo entufamento e falta de alongamento das plantas, encurtamento dos internódios, presença de calos nas bases dos explantes e um aspecto vitrificado das folhas, evidenciando que estas concentrações de BAP foram altas demais, revelando-se tóxicas e prejudiciais ao desenvolvimento normal das plantas de crisântemo.

LESHEN et al (1988) também observaram um excessivo hábito entufado bem como o fenômeno da vitrificação em plantas de crisântemo e melão, correlacionando este fato com toxidez determinada pelas altas doses de BAP. QI-GUANG et al (1986), trabalhando com *Castanea mollessima*, constataram que o excesso de BAP além de reduzir muito a parte aérea promoveu a formação de calos nas bases dos explantes. A desvantagem da formação destes calos basais estaria relacionada à variabilidade genética indesejável que pode ocorrer, principalmente sob a forma de poliploidização e aneuploidização (AMMIRATO, 1983).

Em experimentos preliminares foi testado o efeito de várias citocininas: BAP, 2iP e cinetina, sobre o desenvolvimento dos explantes de plantas de crisântemo, nas seguintes concentrações: (0,0); (0,2); (0,4); (0,6); (0,8) e (1,0) mg/L. Verificou-se que a concentração de 1mg/L de BAP, 2iP ou de cinetina foi tóxica para as plantas de crisântemo apresentando todos os sintomas de toxidez relacionados anteriormente. A concentração de 0,4 mg/L de BAP foi considerada a

melhor obtendo-se um maior desenvolvimento das plantas as quais apresentaram altura média superior às observadas em presença das demais concentrações. Não houve, porém, diferença estatística significativa em relação as alturas das plantas obtidas na ausência de BAP.

Entre as citocininas testadas o BAP parece ter sido o mais eficaz, concordando com os dados da literatura, pois diversos autores como ZAERR & MAPES (1985); HU & WANG (1983) e HASEGAWA (1983), constataram a maior potência do BAP em relação as outras citocininas.

As plantas mantidas em meios com 0 mg/L de BAP e 0,1 mg/L de AIA tiveram em média uma altura inferior às plantas mantidas em meios MS básico sem a presença destes dois fitorreguladores, além de apresentarem formação de calos nas bases dos explantes e poucas raízes curtas, no máximo três (Figura 7g). Isto indica que a concentração de 0,1 mg/L de AIA parece já ter sido muito alta, pois houve a formação de calos o que, como já foi dito anteriormente, pode resultar em variabilidade genética, não havendo, portanto, fidelidade às características iniciais da planta matriz que está sendo micropropagada. Além disso, houve uma redução do número de raízes.

Nas plantas mantidas em meios com 0 mg/L de BAP e 1 mg/L de AIA foi observada a formação de calos basais de dimensões maiores do que aqueles obtidos nas plantas mantidas em meios com 0 mg/L de BAP e 0,1 mg/L de AIA e, também, uma forte inibição da formação de raízes (Figura 7n). Notou-se, ainda, um desenvolvimento da parte aérea, porém este foi inferior (altura média: 2,1 cm) em relação ao desenvolvimento daquelas mantidas em meios com 0 mg/L de BAP e 0,1 mg/L de AIA (altura média: 3,3 cm) e, principalmente, das mantidas em meios com total ausência de ambos fitorreguladores (altura média: 4,28 cm).

Já nas plantas mantidas em meios com 0 mg/L de BAP e 10 mg/L de AIA houve uma inibição completa do desenvolvimento da parte aérea bem como de

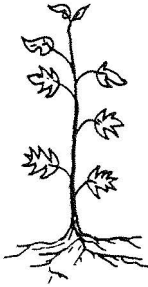























| BAP<br>mg/l<br>AIA<br>mg/l | 0  | 2  | 4  | 6  | 8  | 10   |
|----------------------------|--|--|--|--|--|--|
| 0                          | <br>(a)   | <br>(b)   | <br>(c)   | <br>(d)   | <br>(e)   | <br>(f)   |
| 0,1                        | <br>(g)   | <br>(h)   | <br>(i)   | <br>(j)   | <br>(l)   | <br>(m)   |
| 1                          | <br>(n)  | <br>(o) | <br>(p) | <br>(q) | <br>(r) | <br>(s) |
| 10                         | <br>(t) | <br>(u) | <br>(v) | <br>(w) | <br>(x) | <br>(y) |

Figura 7 - Esquema dos fenótipos das plantas de crisântemo micropropagadas em meios com diferentes concentrações de BAP e AIA (mg/L)



Figura 8 - Aspecto das plantas de crisântemo micropropagadas em meio MS com total ausência de fitorreguladores

raízes, ocorrendo somente a formação de grandes calos de coloração marrom e consistência dura (Figura 7t).

Sabe-se que as citocininas constituem um grupo de fitorreguladores indispensável para a quebra da dominância apical e indução de proliferação de gemas axilares (GRATAPAGLIA & MACHADO, 1990). Além disso, a relação citocinina/auxina desempenha papel fundamental na micropropagação de diversas culturas. Porém, com este experimento, pode-se concluir que os hormônios endógenos (auxinas e citocininas) contidos nos explantes utilizados (gema lateral + uma folha) foram suficientes para a micropropagação, desenvolvimento e consequente formação de plantas inteiras de crisântemo, não havendo necessidade da adição de fitorreguladores exógenos. Segundo HARTMANN & KESTER (1983) não somente as gemas produzem auxinas, mas as folhas também são poderosos produtores desse fitorregulador, portanto a sua presença em estacas de crisântemo exercem forte influência no seu enraizamento e desenvolvimento.

JACOBS (1961) e SHABDE & MURASHIGE (1977) relataram que a síntese de auxina endógena ocorre no segundo par dos primórdios foliares dos meristemas apicais e axilares, enquanto que a síntese de citocininas, se dá no terceiro.

Além da vantagem econômica da micropropagação sem a adição de fitorreguladores exógenos, deve-se também lembrar que a sua utilização intensa pode provocar alterações fisiológicas comprometedoras para um desenvolvimento normal de muitas espécies com possibilidade de variabilidade genética (AHMED & ANDREA, 1987).

A variedade de crisântemo estudada neste trabalho apresentou respostas pouco satisfatórias ao estímulo dos reguladores de crescimento, observando-se em média 2 brotos/explante. Estes brotos foram formados em presença de altas concentrações de BAP (acima de 2,0 mg/L), porém não foi observado posterior



crescimento dos mesmos. Além disto, havia o aparecimento de calos nas bases dos explantes, o que não é considerado benéfico. Assim sendo, a micropropagação por gemas laterais em meio sem adição de fitorreguladores é a mais recomendada para o cultivar Amarelo São Paulo.

OLIVEIRA e PASQUAL (1995) verificaram que a variedade de crisântemo "Orange Reagan" também não apresentou respostas satisfatórias ao estímulo dos fitorreguladores utilizados (BAP e cinetina) quanto à produção de brotos, tendo conseguido no máximo 2 brotos/explante. Eles testaram o efeito do GA<sub>3</sub> sob o alongamento destes brotos, porém sem sucesso.

#### **4.3. Experimento II: Interação BAP X Nitrato de prata**

Nitrato de prata foi adicionado ao meio de cultura com a finalidade de prevenir a ação do etileno liberado pelos explantes excisados da planta-mãe (BLAKE & REID, 1981). Segundo HUBERMAN & JAFFE (1981), tecidos injuriados por cortes ou perturbações mecânicas, liberam expressiva quantidade de etileno nas seis primeiras horas após o ferimento, principalmente nas primeiras duas ou três horas. Eles concluíram ainda que a liberação de etileno é variável de acordo com a localização do explante na planta-mãe.

Os explantes utilizados neste trabalho foram segmentos nodais de aproximadamente 1 cm de comprimento retirados da região central da haste da planta-mãe, contendo uma gema lateral e uma folha. No momento da excisão dos explantes ocorreu a quebra do efeito de dominância apical, além de provocar ferimentos nos tecidos das plantas, o que pode ter resultado em liberação de significativa quantidade do gás etileno. Este gás ficaria acumulado no recipiente, já que o papel alumínio, utilizado como tampa dos frascos em todos os experimentos

realizados neste trabalho, não permite uma eficiente troca gasosa com o meio externo (GRATAPAGLIA & MACHADO, 1990).

Em muitos trabalhos tem sido verificado o aumento do etileno em frascos selados e o tipo de vedação estaria envolvido na melhor aeração, permitindo a eliminação do etileno para o meio externo (CUZZUOL, 1993).

Muitos autores sugerem que o etileno, adicionado exogenamente no topo do corte de plantas decapitadas "*in vivo*" ou produzido endogenamente, promove uma redução do crescimento dos brotos axilares (BLAKE & REID, 1981). Por outro lado, pode-se observar, neste experimento, que a provável ausência de etileno nos meios de cultura determinada pela adição de um competidor, o nitrato de prata (100 mg/L), também foi prejudicial ao crescimento dos brotos promovendo sua diminuição.

Os resultados deste experimento mostram que, na ausência de BAP, não houve diferença estatística, quanto a utilização (100mg/L) ou não (0mg/L) de nitrato de prata, para os seguintes parâmetros: número de folhas e MMF (Tabelas 4 e 6, respectivamente). Nos demais parâmetros (altura do eixo caulinar principal, número de raízes, MMS), foi notada diferença estatística observando-se uma "superioridade" das plantas contidas em meios sem a adição de nitrato de prata em relação àquelas contidas em meios onde este foi acrescentado (Tabelas 3, 5 e 7, respectivamente).

Na presença de nitrato de prata (100 mg/L), as plantas não apresentaram sinais de toxidez, como por exemplo, necrose das folhas. Este fato sugere que a "inferioridade" observada nas plantas mantidas em meios acrescidos de nitrato de prata está relacionada com o efeito competitivo desta substância com o etileno e não com a concentração utilizada, sendo que a ausência desse gás pode ter influenciado negativamente no crescimento dos brotos laterais.

Segundo TAIZ & ZEIGER (1991), íons de prata aplicados como nitrato ou tiosulfato são potentes inibidores da ação do etileno. Estes autores mencionaram que o etileno não tem somente efeito inibitório, mas pode também agir como promotor da alongação do caule em muitas espécies, principalmente nas monocotiledôneas.

Níveis baixos de etileno são requeridos para o desenvolvimento e crescimento, porém altos níveis podem ser inibitórios ou antagônicos, sendo que esse hormônio não age isoladamente, mas em interação com outros (LIBERMAN & KUNISHI, 1979).

Nos tratamento com 0,4 mg/L de BAP + 0,0 mg/L de AgNO<sub>3</sub> (T2) foram obtidos valores maiores em relação a todos os parâmetros analisados do que no tratamento com 0,4 mg/L de BAP + 100 mg/L de AgNO<sub>3</sub> (T4), embora tenha sido observada diferença estatística significativa apenas em relação aos parâmetros altura do eixo caulinar principal e MMF. Este fato poderia indicar uma provável interação entre o etileno e o BAP, favorecendo o desenvolvimento dos brotos laterais.

Os resultados corroboraram aqueles obtidos em experimentos preliminares, permitindo concluir que plantas contidas em meios com BAP na concentração de 0,4 mg/L não diferiram estatisticamente quanto aos valores de MMF (Tabela 6), MMS (Tabela 7), altura do eixo caulinar principal (Tabela 3) e número de folhas (Tabela 4), de plantas mantidas em ausência de BAP (MS básico).

Observou-se diferença estatística quanto ao número de raízes, sendo que em meios onde não foi adicionado BAP (tratamentos T1 e T3) foram obtidas plantas com número de raízes significativamente superior àquelas obtidas em meios com 0,4 mg/L deste fitorregulador (tratamentos T2 e T4) (Tabela 5). Nestas últimas, ocorreu a formação de pequenos e médios calos basais, os quais muito provavelmente prejudicaram o desenvolvimento de raízes.

Tabela3 - Efeito da interação BAP x AgNO<sub>3</sub> em relação ao parâmetro altura do eixo caulinar principal (cm)

| <b>BAP</b><br><b>AgNO<sub>3</sub></b> | <b>0,0 mg/L</b> | <b>0,4 mg/L</b> |
|---------------------------------------|-----------------|-----------------|
| <b>0,0 mg/L</b>                       | T1: 1,80 a      | T2: 1,95 a      |
| <b>100,0 mg/L</b>                     | T3: 0,68 b      | T4: 0,74 b      |

Tabela 4 - Efeito da interação BAP x AgNO<sub>3</sub> em relação ao parâmetro número de folhas

| <b>BAP</b><br><b>AgNO<sub>3</sub></b> | <b>0,0 mg/L</b> | <b>0,4 mg/L</b> |
|---------------------------------------|-----------------|-----------------|
| <b>0,0 mg/L</b>                       | T1: 6,10 a      | T2: 6,75 a      |
| <b>100,0 mg/L</b>                     | T3: 5,00 ab     | T4: 5,33 ab     |

Tabela 5 - Efeito da interação BAP x AgNO<sub>3</sub> em relação ao parâmetro número de raízes

| AgNO <sub>3</sub> \ BAP | 0,0 mg/L   | 0,4 mg/L   |
|-------------------------|------------|------------|
|                         | 0,0 mg/L   | T1: 4,30 a |
| 100 mg/L                | T3: 2,80 b | T4: 0,00 c |

Tabela 6 - Efeito da interação BAP x Ag NO<sub>3</sub> em relação ao parâmetro massa de matéria fresca (g)

| AgNO <sub>3</sub> \ BAP | 0,0 mg/L    | 0,4 mg/L   |
|-------------------------|-------------|------------|
|                         | 0,0 mg/L    | T1: 0,25 b |
| 100,0 mg/L              | T3 : 0,37 b | T4: 0,28 b |

Tabela 7 - Efeito da interação BAP x AgNO<sub>3</sub> em relação ao parâmetro massa de matéria seca (g)

| AgNO <sub>3</sub> \ BAP | 0,0 mg/L    | 0,4 mg/L    |
|-------------------------|-------------|-------------|
|                         | 0,0 mg/L    | T1: 0,048 a |
| 100,0 mg/L              | T3: 0,027 b | T4: 0,032 a |

#### **4.4. Experimento III: Fontes de nitrogênio**

Observaram-se diferenças significativas em relação ao crescimento, desenvolvimento, enraizamento e aspecto geral das plantas de crisântemo cultivadas "in vitro" em meios de cultura contendo várias fontes de nitrogênio.

##### **4.4.1. Massa de matéria fresca (g) e Massa de matéria seca (g)**

###### **4.4.1.1. Análise aos 35 dias**

O meio MS (tratamento E1) revelou-se adequado para o desenvolvimento tanto da parte aérea como de raízes de plantas de crisântemo. Pode-se observar que os valores de MMF e MMS foram altos neste tratamento, tanto aos 35 como aos 70 dias, evidenciando o bom desenvolvimento das plantas (Figuras 9 e 10).

Observou-se que o tratamento E5 (uréia - 200mg/L + NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) apresentou maiores valores de MMF e de MMS, embora não tenha sido notada diferença estatística em relação aos demais tratamentos (Tabela 8 e 9). GROTHGE (1992) também observou um efeito positivo no desenvolvimento de *Eucalyptus grandis* quando adicionou uréia ao meio de cultura.

Os menores valores para MMF e MMS foram encontrados nos tratamentos onde o íon amônio (E2) e glutamina (E8) foram utilizados como fontes isoladas de nitrogênio. As plantas desses tratamentos apresentaram-se pouco desenvolvidas (Figuras 9 e 10). De modo geral, os valores de MMS acompanharam aqueles de MMF.

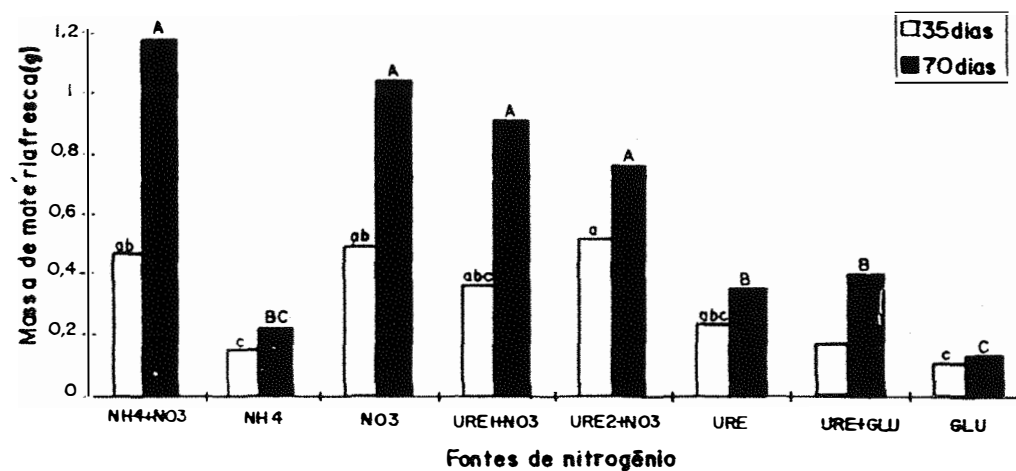


Figura 9 - Comportamento das plantas mantidas em meios com várias fontes de nitrogênio em relação à massa de matéria fresca (g), aos 35 e aos 70 dias

Tabela 8 - Valores médios de massa de matéria fresca (g) obtidos nos tratamentos com diferentes fontes de nitrogênio, aos 35 e aos 70 dias

| Tratamentos          | 35 dias   | Tratamentos          | 70 dias |
|----------------------|-----------|----------------------|---------|
| <b>E5:URE2 + NO3</b> | 0,518 a   | <b>E1:NH4 + NO3</b>  | 1,042 A |
| <b>E1:NH4 + NO3</b>  | 0,465 ab  | <b>E3:NO3</b>        | 1,029 A |
| <b>E3:NO3</b>        | 0,441 ab  | <b>E4:URE1 + NO3</b> | 0,919 A |
| <b>E4:URE1 + NO3</b> | 0,395 abc | <b>E5:URE2 + NO3</b> | 0,787 A |
| <b>E6:URE</b>        | 0,241 abc | <b>E7:URE + Gln</b>  | 0,396 B |
| <b>E7: URE + Gln</b> | 0,173 bc  | <b>E6:URE</b>        | 0,363 B |
| <b>E2:NH4</b>        | 0,124 c   | <b>E2:NH4</b>        | 0,225 B |
| <b>E8:Gln</b>        | 0,081 c   | <b>E8:Gln</b>        | 0,136 B |
| CV = 37,989 %        |           |                      |         |

#### 4.4.1.2. Análise aos 70 dias:

No meio MS (E1) foram observados os maiores valores para MMF, aos 70 dias, porém nos tratamentos onde uréia foi utilizada juntamente com nitrato (E4 e E5) bem como no tratamento com nitrato como única fonte de nitrogênio (E3), os valores para este parâmetros também foram altos (Tabela 8). Para MMS os tratamentos referidos acima (E1, E3, E4 e E5) não diferiram estatisticamente entre si e destacaram-se dos demais tratamentos ao nível de 5% de significância (Tabela 9).

Nos tratamentos E2 ( $\text{NH}_4^+$ ) e E8 (glutamina) continuaram sendo observados os menores valores tanto de MMF como de MMS.(Figuras 9 e 10). RIKER & GUTSHE (1948); GEORGE & SHERRINGTON (1984) também observaram uma inibição do crescimento e desenvolvimento com amônio como única fonte de nitrogênio.

Pode-se observar que houve um aumento da MMF e da MMS das plantas do tratamento E2 ( $\text{NH}_4^+$ ) analisadas aos 70 dias em relação àquelas analisadas aos 35 dias. Este aumento não foi significativo estatisticamente (Figuras 9 e 10) e não pode ser atribuído a um desenvolvimento das plantas e sim à presença de pequenos calos que foram observados na base da maioria dos explantes. Este fato concorda com a literatura, pois diversos autores sugerem que o amônio induz a formação de calos (KIRBY & McCOWN, 1987; GEORGE & SHERRINGTON, 1984; GROTHGE, 1992; CUZZUOL, 1993).



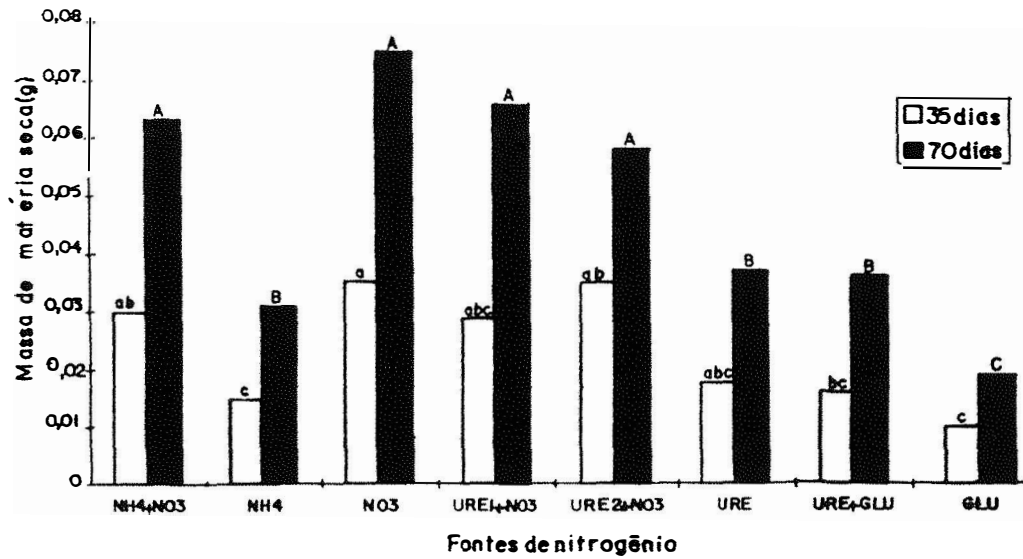


Figura 10 - Comportamento das plantas mantidas em meios com várias fontes de nitrogênio em relação à massa de matéria seca (g), aos 35 e aos 70 dias

Tabela 9 - Valores médios de massa de matéria seca (g) obtidos nos tratamentos com diferentes fontes de nitrogênio, aos 35 e aos 70 dias

| Tratamentos          | 35 dias   | Tratamentos          | 70 dias  |
|----------------------|-----------|----------------------|----------|
| <b>E5:URE2 + NO3</b> | 0,035 a   | <b>E4:URE1 + NO3</b> | 0,0673 A |
| <b>E3:NO3</b>        | 0,034 ab  | <b>E3:NO3</b>        | 0,0629 A |
| <b>E1:NH4 + NO3</b>  | 0,033 ab  | <b>E1:NH4 + NO3</b>  | 0,0628 A |
| <b>E4:URE1 + NO3</b> | 0,029 abc | <b>E5:URE2 + NO3</b> | 0,0612 A |
| <b>E6:URE</b>        | 0,018 abc | <b>E6:URE</b>        | 0,0370 B |
| <b>E7:URE + Gln</b>  | 0,016 bc  | <b>E7:URE + Gln</b>  | 0,0360 B |
| <b>E2:NH4</b>        | 0,013 c   | <b>E2:NH4</b>        | 0,0312 B |
| <b>E8:Gln</b>        | 0,010 c   | <b>E8:Gln</b>        | 0,0192 B |
| CV = 29,294 %        |           |                      |          |

#### **4.4.2. Altura do eixo caulinar principal (cm)**

##### **4.4.2.1. Análise aos 35 dias**

Os tratamentos onde uréia e nitrato estavam presentes (E4 e E5) destaram-se dos demais quanto à altura das plantas, seguidos pelos tratamentos E1 (MS) e E3 (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) (Tabela 10). Muito embora não tenha havido diferença estatística significativa em relação a estes quatro tratamentos, observa-se que no tratamento E5 foi obtida maior média de altura do eixo caulinar principal (4,0 cm) evidenciando um efeito positivo da uréia no crescimento das plantas de crisântemo nos primeiros 35 dias de cultivo "*in vitro*". O íon amônio (E2) e glutamina (E8) utilizados isoladamente apresentaram médias de altura do eixo principal bem inferiores aos demais tratamentos (Figura 11).

##### **4.4.2.2. Análise aos 70 dias**

Os tratamentos com uréia + nitrato (E4 e E5) não diferiram estatisticamente dos tratamentos E3 (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) e E1 (MS), sendo que esses quatro tratamentos foram os que determinaram as maiores altura das plantas, destacando-se dos demais ao nível de 5% de significância. Porém, observou-se que as plantas mantidas nos tratamentos E3 e E1 alcançaram as maiores médias quanto a esse parâmetro (Tabela 10).

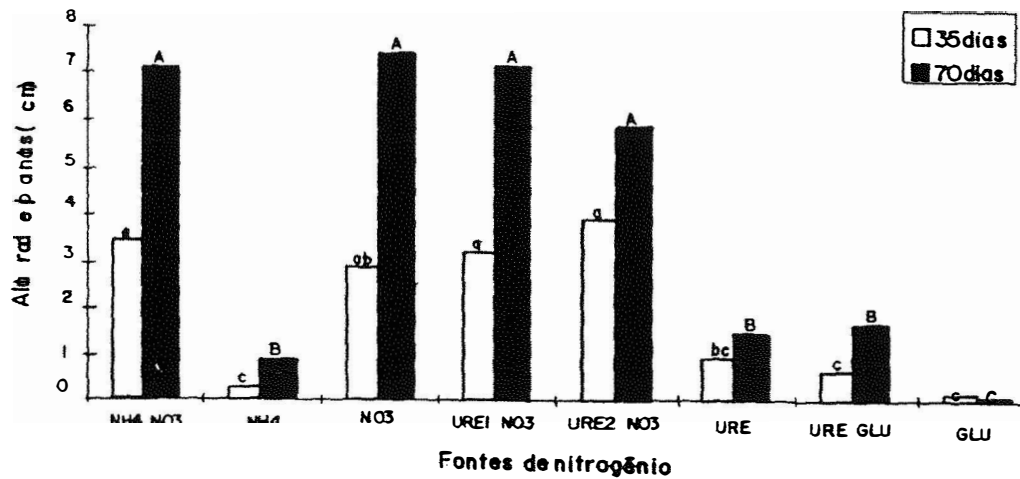


Figura 11 - Comportamento das plantas mantidas em meios com várias fontes de nitrogênio em relação à altura do eixo caulinar principal (cm), aos 35 e aos 70 dias

Tabela 10 - Valores médios de altura do eixo caulinar principal (cm) obtidos nos tratamentos com diferentes fontes de nitrogênio, aos 35 e aos 70 dias.

| Tratamentos   | 35 dias  | Tratamentos   | 70 dias |
|---------------|----------|---------------|---------|
| E5:URE2 + NO3 | 4.000 a  | E3:NO3        | 7.430 A |
| E1:NH4 + NO3  | 3.442 a  | E1:NH4 + NO3  | 7.200 A |
| E4:URE1 + NO3 | 3.240 a  | E4:URE1 + NO3 | 7.166 A |
| E3:NO3        | 2.842 ab | E5:URE2 + NO3 | 5.912 A |
| E6:URE        | 0.960 bc | E7: URE + Gln | 1,600 B |
| E7: URE + Gln | 0,640 c  | E6:URE        | 1,380 B |
| E2:NH4        | 0,382c   | E2:NH4        | 0,900 B |
| E8:Gln        | 0,170 c  | E8: Gln       | 1,428B  |
| CV = 36,188 % |          |               |         |

### **4.4.3. Número de folhas**

#### **4.4.3.1. Análise aos 35 dias**

Em relação a esse parâmetro também foi notada uma superioridade dos tratamentos com uréia + nitrato (E4 e E5) e nos tratamentos E1 (MS) e E3 ( $\text{NO}_3^-$ ) em relação aos demais tratamentos. As plantas do tratamento E3 obtiveram maior média (8,285) quanto a este parâmetro. Porém, não foi observada diferença estatística em relação aos tratamentos E1, E5 e E4. (Tabela 11). A importância disso reside no fato de que a micropropagação deste cultivar foi realizada por brotações de gemas laterais, portanto quanto maior o número de folhas, maior o número de explantes obtidos.

No tratamento com glutamina como única fonte de nitrogênio (E8) obteve-se a menor média (1,6), seguido pelo tratamento E2 ( $\text{NH}_4^+$ ), sendo que em ambos os tratamentos o desenvolvimento da parte aérea e produção de folhas foram muito baixos (Figura 12).

#### **4.4.3.2. Análise aos 70 dias**

Aos 70 dias, as plantas contidas em meio MS (E1) foram as que alcançaram maior número de folhas, seguido pelo tratamento com nitrato (E3). Os Tratamentos com uréia + nitrato não diferiram significativamente entre si e se colocaram no terceiro lugar na ordem decrescente para este parâmetro (Tabela 11).

Os Tratamentos E6 (uréia) e E7 (uréia + glutamina) não diferiram entre si (5% de significância) e tiveram uma produção de folhas mediana.

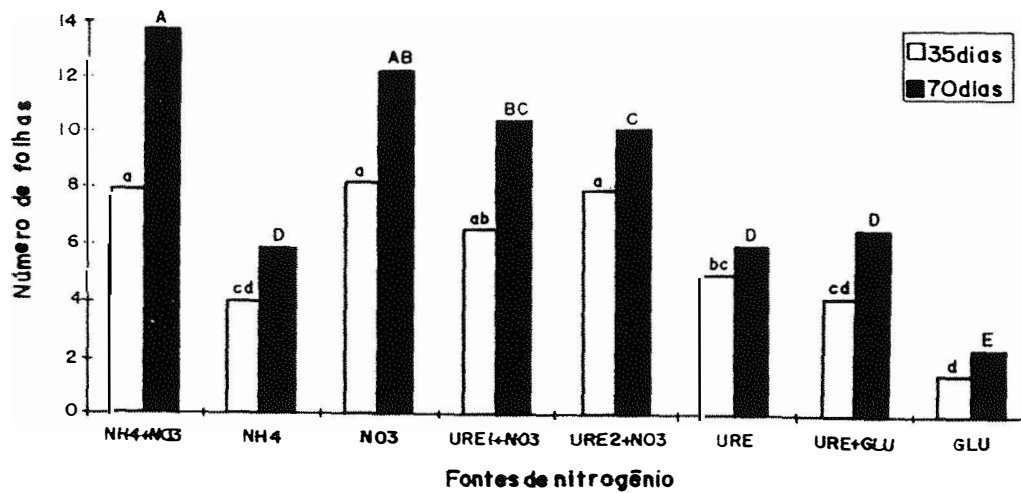


Figura 12 - Comportamento das plantas mantidas em meios com várias fontes de nitrogênio em relação ao número de folhas, aos 35 e aos 70 dias

Tabela 11 - Valores médios de número de folhas obtidos nos tratamentos com diferentes fontes de nitrogênio, aos 35 e aos 70 dias

| Tratamentos    | 35 dias  | Tratamentos    | 70 dias   |
|----------------|----------|----------------|-----------|
| E3: NO3        | 8,285 a  | E1: NH4 + NO3  | 13,750 A  |
| E1: NH4 + NO3  | 8,000 a  | E3: NO3        | 12,300 AB |
| E5: URE2 + NO3 | 8,000 a  | E4: URE1 + NO3 | 10,666 BC |
| E4: URE1 + NO3 | 7,000 ab | E5: URE2 + NO3 | 10,250 C  |
| E6: URE        | 5,000 bc | E7: URE + Gln  | 6,600 D   |
| E7: URE + Gln  | 4,200 cd | E6: URE        | 6,600 D   |
| E2: NH4        | 3,428 cd | E2: NH4        | 5,600 D   |
| E8: Gln        | 1,600 d  | E8: Gln        | 2,000 E   |
| CV = 19,377 %  |          |                |           |

#### **4.4.4. Enraizamento: Comprimento (cm) e número de raízes**

##### **4.4.4.1. Análise aos 35 dias**

Embora os tratamentos com nitrato + uréia (E4 e E5) tenham alcançado médias maiores tanto em relação ao comprimento quanto ao número de raízes (Tabelas 12 e 13, respectivamente) não foi observada diferença estatística em relação aos demais tratamentos, com exceção dos tratamentos com o íon amônio (E2) e glutamina (E8) como fontes isoladas de nitrogênio, os quais determinaram os menores valores para ambos os parâmetros, evidenciando um enraizamento muito baixo.

##### **4.4.4.2. Análise aos 70 dias**

Embora não tenha havido diferença estatística quanto ao comprimento das raízes em relação aos tratamentos com uréia + nitrato (E4 e E5) e os tratamentos E1 (MS) e E3 (apenas nitrato), nos tratamentos E4 e E5 foram observadas as maiores médias (21,15 cm) para esse parâmetro (Tabela 12; Figura 13).

Quanto ao número de raízes, observou-se uma superioridade dos tratamentos com uréia + nitrato, principalmente quando adicionou-se uréia a 200 mg/L, tratamento E5, o qual destacou-se dos demais ao nível de 5% de significância (Figura 14). O Tratamento E4 (uréia-100 mg/L + nitrato) não diferiu estatisticamente dos tratamentos E3 (apenas nitrato) e E6 (apenas uréia), sendo que esses últimos mostraram um enraizamento razoável.

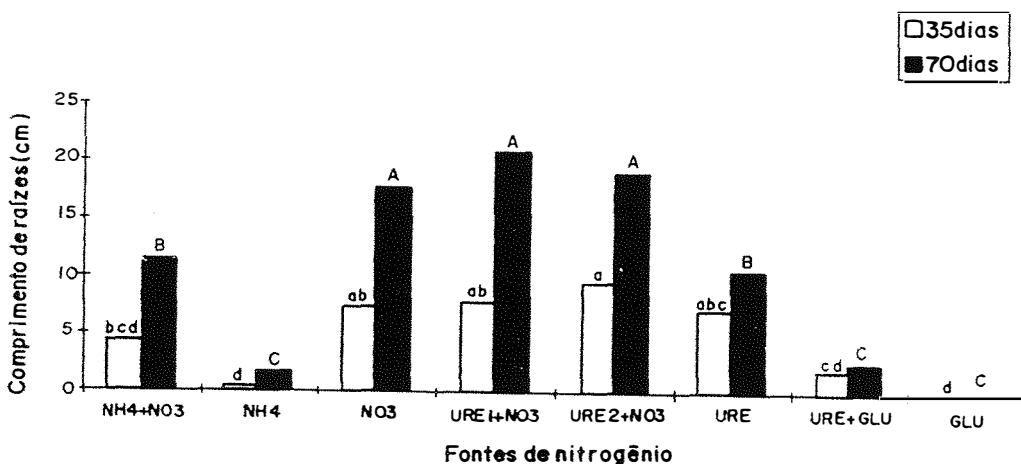


Figura 13 - Comportamento das plantas mantidas em meios com várias fontes de nitrogênio em relação ao comprimento de raízes (cm), aos 35 e aos 70 dias

Tabela 12 - Valores médios de comprimento de raízes obtidos nos tratamentos com diferentes fontes de nitrogênio, aos 35 e aos 70 dias

| Tratamento     | 35 dias   | Tratamentos    | 70 dias  |
|----------------|-----------|----------------|----------|
| E5: URE2 + NO3 | 9,785 a   | E4: URE1 + NO3 | 21,150 A |
| E4: URE1 + NO3 | 8,020 ab  | E5: URE2 + NO3 | 19,275 A |
| E3: NO3        | 7,571 ab  | E3: NO3        | 17,940 A |
| E6: URE        | 7,340 abc | E1: NH4 + NO3  | 11,512 B |
| E1: NH4 + NO3  | 4,557 bcd | E6: URE        | 10,800 B |
| E7: URE + Gln  | 2,180 cd  | E7: URE + Gln  | 2,820 C  |
| E2: NH4        | 0,314 d   | E2: NH4        | 1,800 C  |
| E8: Gln        | 0,000 d   | E8: Gln        | 0,050 C  |
| CV = 34,545 %  |           |                |          |

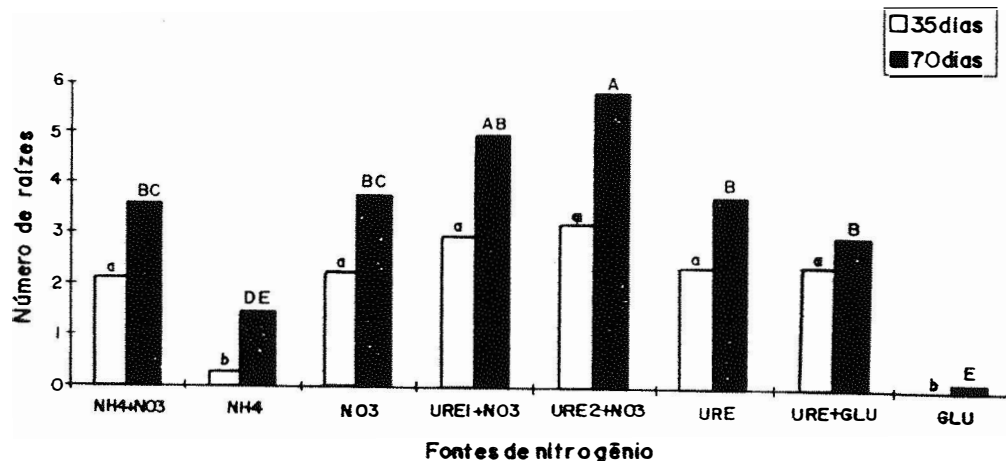


Figura 14 - Comportamento das plantas mantidas em meios com várias fontes de nitrogênio em relação ao número de raízes, aos 35 e aos 70 dias

Tabela 13 - Valores médios de número de raízes obtidos nos tratamentos com diferentes fontes de nitrogênio, aos 35 e aos 70 dias

| Tratamentos           | 35 dias | Tratamentos           | 70 dias  |
|-----------------------|---------|-----------------------|----------|
| <b>E5: URE2 + NO3</b> | 3,285 a | <b>E5: URE2 + NO3</b> | 5,856 A  |
| <b>E4: URE1 + NO3</b> | 3,000 a | <b>E4: URE1 + NO3</b> | 5,260 AB |
| <b>E6: URE</b>        | 2,400 a | <b>E3: NO3</b>        | 3,800 BC |
| <b>E7: URE + Gln</b>  | 2,400 a | <b>E6: URE</b>        | 3,800 BC |
| <b>E3: NO3</b>        | 2,285 a | <b>E1: NH4 + NO3</b>  | 3,625 BC |
| <b>E1: NH4 + NO3</b>  | 2,142 a | <b>E7: URE + Gln</b>  | 3,000 BC |
| <b>E2: NH4</b>        | 0,285 b | <b>E2: NH4</b>        | 1,500 CD |
| <b>E8: Gln</b>        | 0,000 b | <b>E8: Gln</b>        | 0,142 D  |
| CV = 38,72 %          |         |                       |          |



Tanto aos 35 como aos 70 dias, observa-se que em todos os tratamentos onde uréia estava presente, houve um bom desenvolvimento radicular, porém nos tratamentos onde adicionou-se uréia além do nitrato, (tratamentos E4 e E5) e principalmente no tratamento E5 (uréia - 200 mg/L), o enraizamento foi superior, com proliferação de raízes. Desse modo, estas plantas provavelmente estarão mais aptas a uma melhor adaptação durante a fase de aclimatação em casa de vegetação. GROTHGE (1992) também observou um maior enraizamento em plantas de *Eucalyptus grandis* nos tratamentos onde uréia estava presente.

O maior enraizamento conseguido na presença de uréia no meio de cultura, possivelmente deve estar ligado ao fato de que na sua degradação há liberação tanto de CO<sub>2</sub>, o qual deverá ser utilizado para a formação de esqueleto carbônico, quanto de NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, que deverá ser assimilado via GDH ou via GS/GOGAT, proporcionando a formação de glutamina e glutamato, os quais poderão ser armazenados, transportados ou ainda, por transaminação, dar origem a outros aminoácidos (Figura 15). Segundo WEAVER (1972); HARTMANN & KESTER (1983) e JARVIS (1986), alguns cofatores como carboidratos, compostos nitrogenados, vitaminas e compostos orgânicos são essenciais ao enraizamento e atuam em conjunto com as auxinas.

Analisando os resultados de todos os parâmetros conjuntamente, pode-se dizer que em presença de uréia + nitrato (tratamentos E4 e E5) ocorreu ótimo desenvolvimento e crescimento da parte aérea principalmente nos primeiros 35 dias. A uréia parece ter tido um papel importante para o "arranque" no desenvolvimento inicial das plantas. Após este período, porém, parece ter havido um favorecimento do enraizamento em detrimento da parte aérea, se bem que esta continuou tendo um bom desenvolvimento.

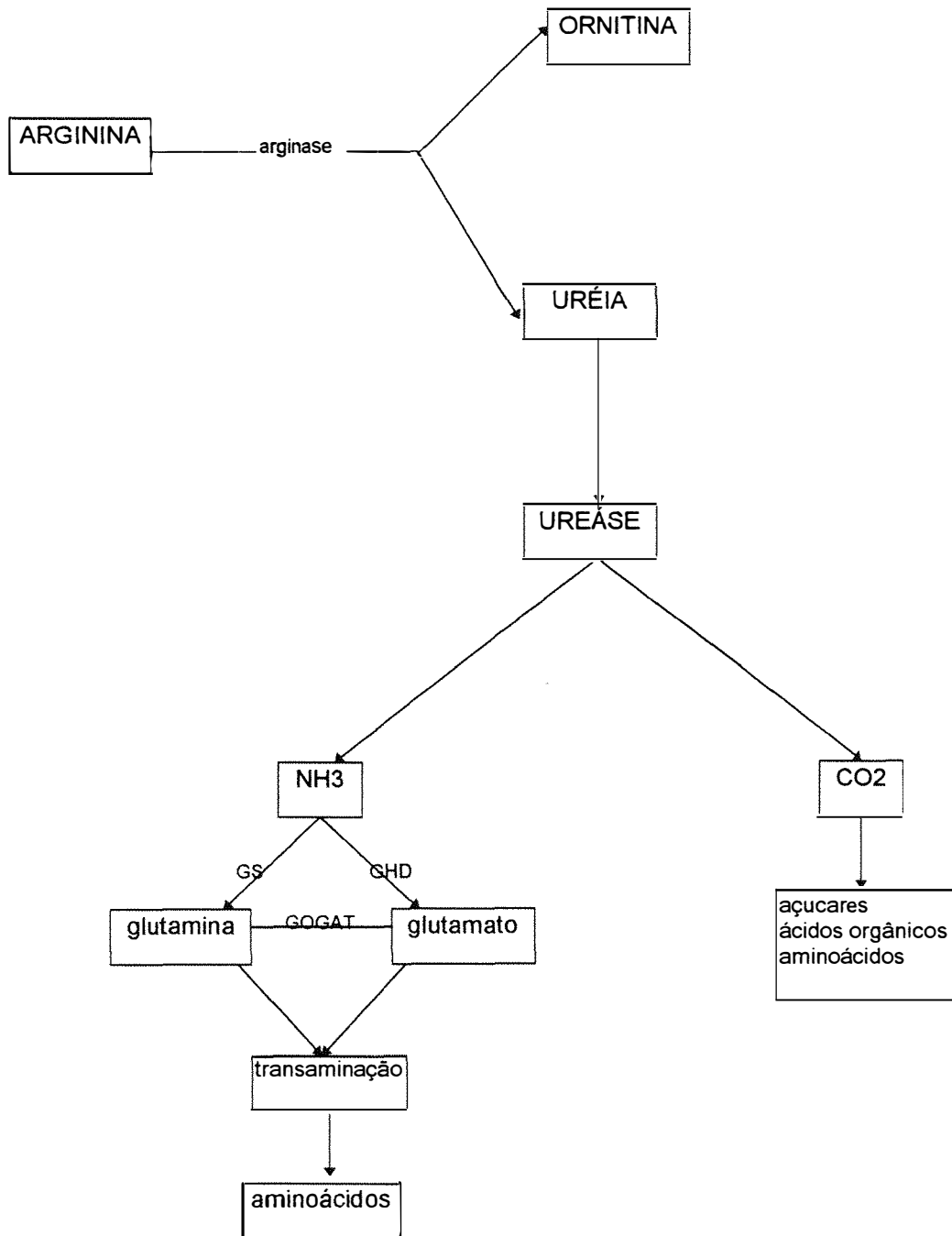


Figura 15: Esquema da degradação da uréia fornecendo carbono ( $\text{CO}_2$ ) e nitrogênio ( $\text{NH}_4^+$ ) para o metabolismo das plantas.

O desenvolvimento inicial da parte aérea (região apical), com folhas em intensas divisões celulares, é altamente dependente de carboidratos. Já numa fase posterior de expansão foliar há uma dependência mais acentuada de íons minerais, principalmente nitrogênio. Após a fase de expansão, segue-se a fase de armazenamento nos órgãos, porém a capacidade de reserva dos tecidos mostra-se limitante. Assim, durante o desenvolvimento da parte aérea e seus órgãos apicais, há uma transição inicial no ápice de dreno para fonte, limitando o seu crescimento e fazendo com que haja transporte de carboidratos e de íons minerais (nitrogênio) da parte aérea para as raízes, havendo crescimento dessas (CASTRO & MELOTTO, 1987). Além disso, em plantas cultivadas "*in vitro*", o crescimento da parte aérea é prejudicada pelas tampas dos frascos, limitando o uso de carboidratos e nitrogênio os quais são exportados para as raízes intensificando assim, o enraizamento (Figura 16). Talvez esse tenha sido o motivo do maior desenvolvimento da parte aérea somente aos 35 dias, nos tratamentos com nitrato (fonte de N) + uréia (fonte de N e CO<sub>2</sub>), sendo que aos 70 dias, observou-se um maior enraizamento, podendo-se sugerir que os carboidratos e os íons minerais (nitrogênio) da parte aérea foram transportados para as raízes.

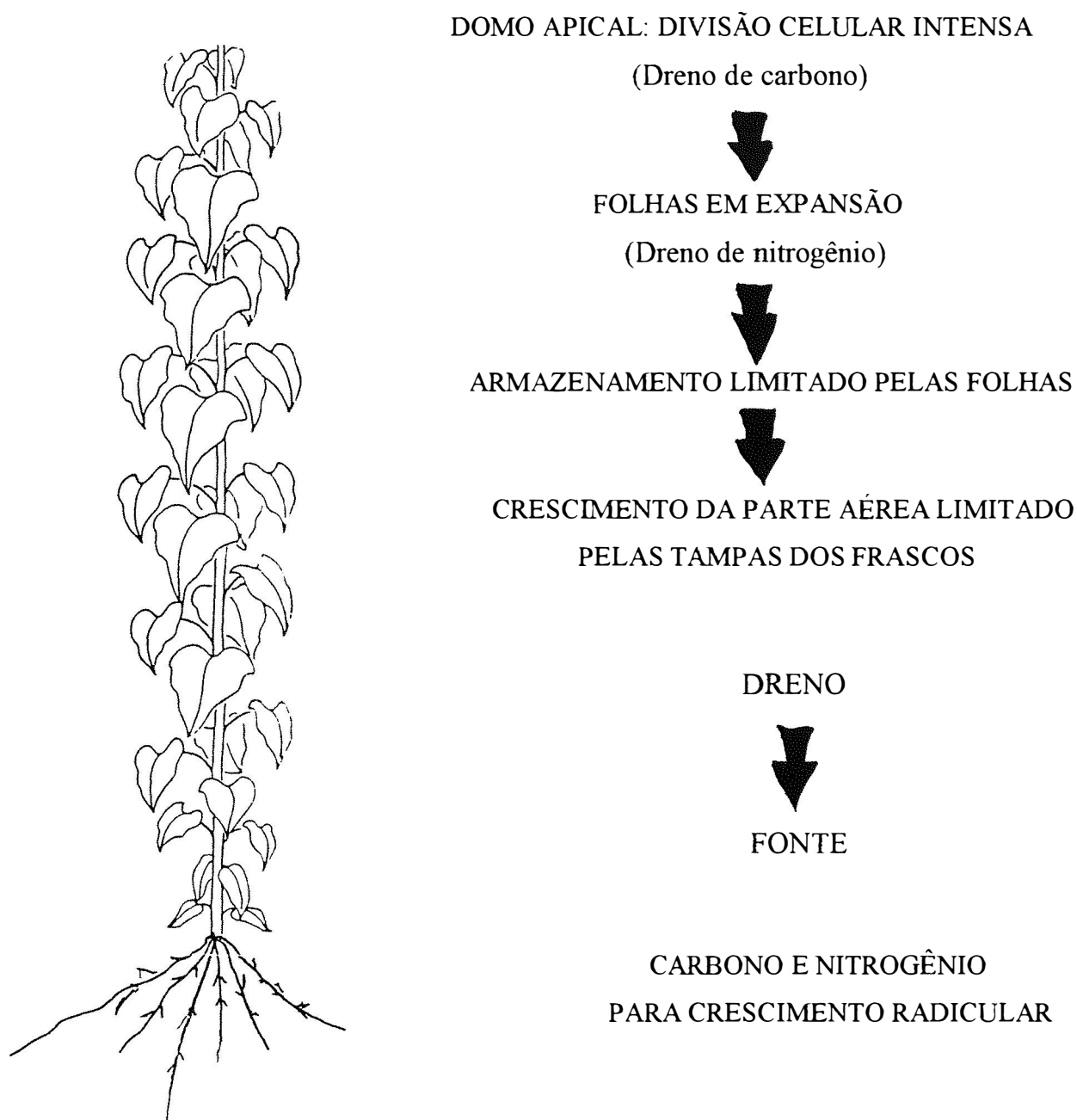


Figura 16 - Esquema ilustrando a transição no ápice das plantas, de dreno para fonte, limitando o crescimento da parte aérea e promovendo um maior enraizamento, em certo estágio de desenvolvimento.

#### 4.4.5. Determinação de nitrogênio total

Devido à pequena quantidade de material disponível (20 mg) para a determinação do nitrogênio total, e à metodologia de amostragem que foi possível empregar, ou seja, 3 a 5 explantes reunidos numa só amostra, torna-se difícil tirar conclusões definitivas. Entretanto, os dados mostram que os tratamentos com níveis mais baixos de nitrogênio foram os que continham uréia + nitrato (E4 e E5) e os que continham apenas nitrato (E3). A grosso modo, pode-se dizer que o tratamento com 100 mg/L de uréia + nitrato (E4) foi o menos eficaz em relação ao teor total de nitrogênio, como mostra a Tabela 14. GROTHGE (1992) também obteve menor teor de NT quando utilizou uréia na concentração de 300 mg/L.

Nos tratamentos E6 (apenas uréia) e E1 (MS) foram obtidos valores intermediários de NT, os quais também não diferiram estatisticamente entre si.

Os tratamentos nos quais foram obtidos maiores teores de NT foram aqueles onde o íon amônio (E2) e glutamina (E8) foram utilizados como fontes isoladas de N, e também no tratamento E7, o qual continha uréia + glutamina (Tabela 14).

É curiosa a observação de que os tratamentos nos quais foram obtidas plantas mais desenvolvidas, ou seja, tratamentos com uréia + nitrato (E4 e E5) e tratamento com apenas nitrato (E3), foram aqueles onde o teor de NT foi menor. Ao contrário, quando o meio continha uréia + glutamina (E7), apenas glutamina (E8) e apenas íon amônio (E2), as plantas obtidas foram nitidamente menos desenvolvidas, porém o teor de NT foi mais elevado.

Tabela 14 - Valores médios de teor de nitrogênio total obtidos nos tratamentos com diferentes fontes de nitrogênio, aos 70 dias

| Tratamentos          | % N total | Desvio padrão |
|----------------------|-----------|---------------|
| <b>E7: URE + Gln</b> | 7,430 a   | 0,239         |
| <b>E8: Gln</b>       | 6,134 b   | 0,292         |
| <b>E2:NH4</b>        | 5,680 b   | 1,097         |
| <b>E6:URE</b>        | 4,690 c   | 0,979         |
| <b>E1:NH4 + NO3</b>  | 3,935 cd  | 0,054         |
| <b>E5:URE2 + NO3</b> | 3,430 d   | 0,644         |
| <b>E3:NO3</b>        | 3,259 d   | 0,0918        |
| <b>E4:URE1 + NO3</b> | 2,692 de  | 0,5165        |

O alto teor de NT observado no tratamento E2 (apenas  $\text{NH}_4^+$ ) pode estar relacionado com o aumento de aminoácidos e proteínas solúveis nas folhas de plantas mantidas em meios com altos teores do íon amônio. LETOUZÉ & DAGUIN (1983) e CUZZUOL (1993) sugerem que altas concentrações de amônio promovem a conversão de açúcares em compostos nitrogenados como aminoácidos, impedindo a produção de lignina e celulose, os quais estão relacionados com o fenômeno da vitrificação. Além disso, CUZZUOL (1993) comenta que altas concentrações de amônio podem levar a um decréscimo na taxa C/N devido a menor atividade da via das pentoses, fonte de lignina e celulose, constituintes da parede celular (Figura 17). Com deficiência desses constituintes da parede celular há um "afrouxamento" da mesma facilitando, com isso, a entrada de água nas células, conduzindo ao fenômeno da vitrificação.

RAAB & TERRY (1994) observaram um aumento de 3 a 4 vezes na quantidade de proteínas solúveis nas folhas de *Beta vulgaris* L. em presença de amônio do que de nitrato. Os mesmos autores concluíram que este aumento no teor de proteínas estava relacionado com um aumento do volume dos cloroplastos. Segundo EVANS (1989), 75% do nitrogênio total das folhas está contido em proteínas do cloroplasto.

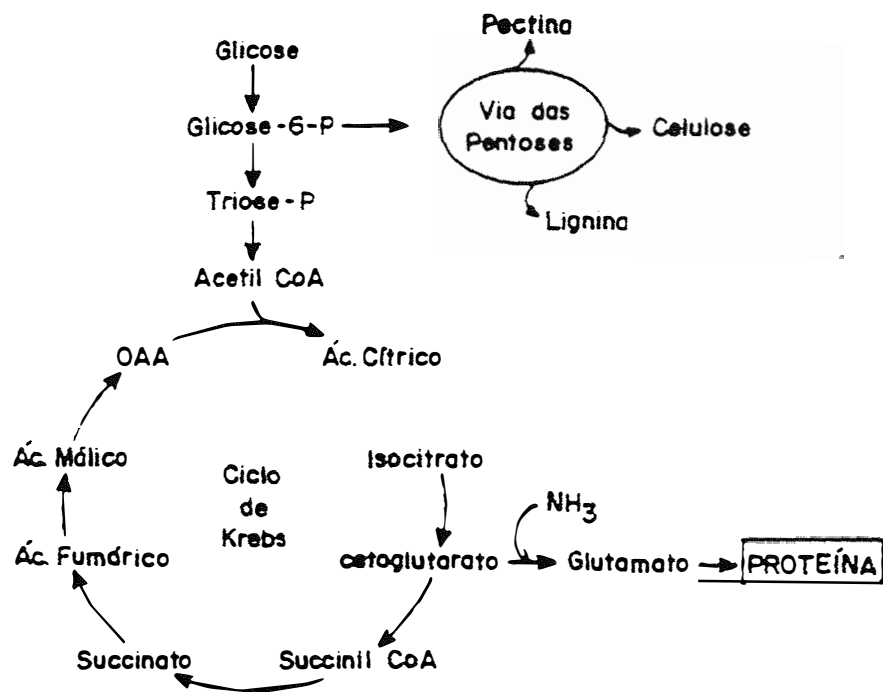


Figura 17 - Esquema da glicólise e ciclo de Krebs



Apesar da grande quantidade de NT e provavelmente de proteínas e aminoácidos nas plantas contidas em meios com amônio como única fonte de N (E2), observa-se que estas tiveram um péssimo desenvolvimento tanto da parte aérea quanto de raízes. Isso pode estar ligado ao fato de que a assimilação do íon amônio resulta em depleção de carboidratos pela ação da desidrogenase do glutamato que converte rapidamente alfa-cetoglutarato em glutamina, que é a forma não tóxica de armazenamento de nitrogênio (RAAB E TERRY, 1994) (Figura 15 e 17). Observa-se que a constante retirada de alfa-cetoglutarato irá ocasionar depleção dos ácidos málico, fumárico e oxaloacético. Isso obviamente irá influenciar no Ciclo de Krebs com consequências no crescimento e desenvolvimento normal das plantas. Outro fator relativo ao pouco desenvolvimento das plantas em E2 ( $\text{NH}_4^+$ ) relaciona-se com a acidificação do meio pela liberação de íons  $\text{H}^+$ , o que será discutido mais adiante.

Uma provável explicação para o baixo teor de NT em plantas mantidas em presença de uréia + nitrato (E4 e E5) ou apenas de nitrato (E3) seria que nessas condições haveria formação de aminoácidos e proteínas, porém não predominantemente, ocorrendo também a formação de carboidratos, lignina, celulose, ácidos orgânicos, os quais seriam fontes de esqueleto carbônico para o crescimento e desenvolvimento das plantas.

#### 4.4.6. Considerações finais

De uma maneira geral, os tratamentos E2 (apenas amônio) e E8 (apenas glutamina), foram os que apresentaram os menores valores em relação a todos os parâmetros analisados, demonstrando que glutamina e/ou amônio com única fonte de nitrogênio não resultaram em bom desenvolvimento das plantas de crisântemo.

Especificamente no tratamento com amônio como fonte isolada de N (E2), observou-se que as poucas folhas existentes eram de tamanho reduzido e, geralmente, possuíam um aspecto vitrificado, além de manchas amareladas (Figura 18). Observou-se também que estas características ficaram mais acentuadas aos 70 dias. O amônio como única fonte de nitrogênio revelou-se altamente tóxico para as plantas de crisântemo.

Segundo BRAND (1993), a presença de amônio em concentrações altas aumenta a atividade da desidrogenase do glutamato, enzima que converte rapidamente o íon amônio em ácido L-glutâmico pela aminação do ácido alfa-cetoglutárico, havendo também a liberação de íons  $H^+$  no meio (Figura 19). Portanto, a presença de amônio induz a um aumento na síntese de aminoácidos e proteínas às expensas do metabolismo dos carboidratos, diminuindo, por exemplo, a síntese de lignina relacionada com o fenômeno da vitrificação. ZIV (1991) e CUZZUOL (1993) também relacionaram elevados níveis de amônio com o fenômeno da vitrificação em cravo. Outro fator que certamente contribuiu para o pequeno desenvolvimento das plantas do tratamento E2 (apenas amônio) foi a acidificação do meio provocada pela liberação de íons  $H^+$ . Segundo Tolley-Henry & Raper citados por RAAB & TERRY (1994), valor pH abaixo de 5,0 faz com que cesse completamente a absorção de muitos nutrientes, inclusive de nitrogênio, provocando sintomas característicos de deficiência nutricional, como folhas amareladas. Além disso, o íon amônio altera o conteúdo de solutos orgânicos e

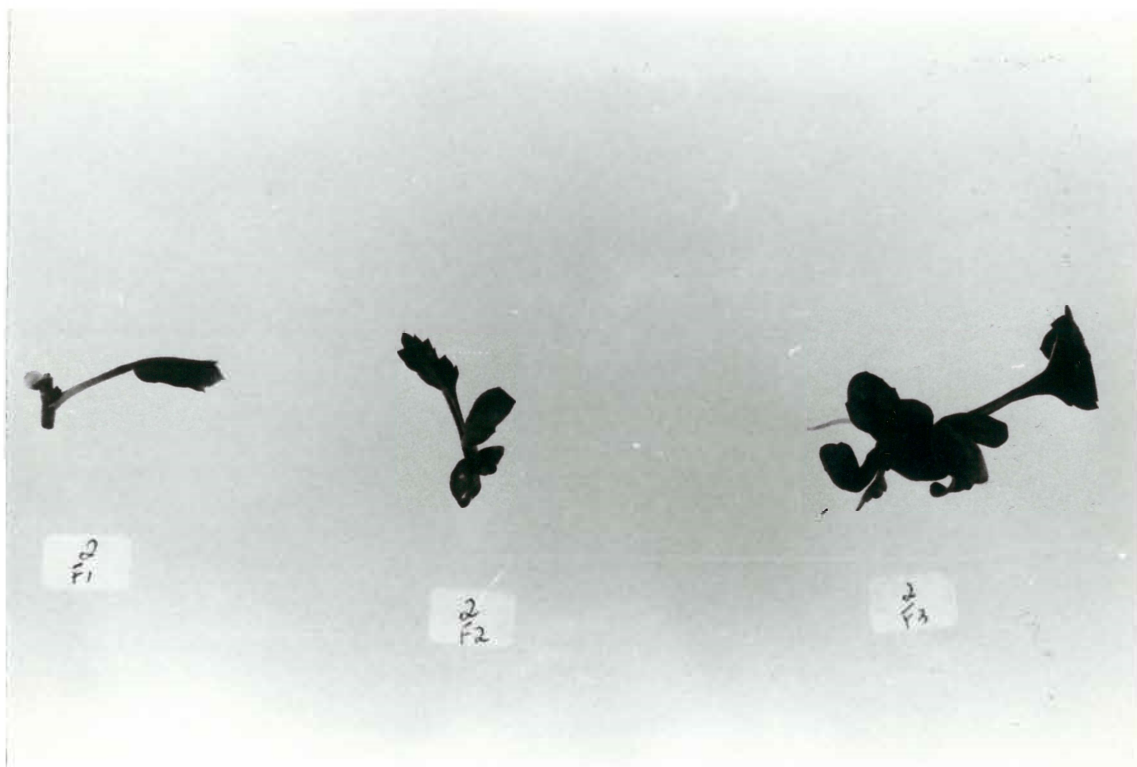
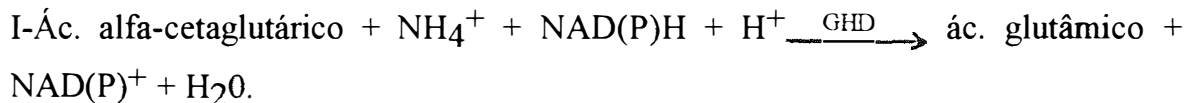
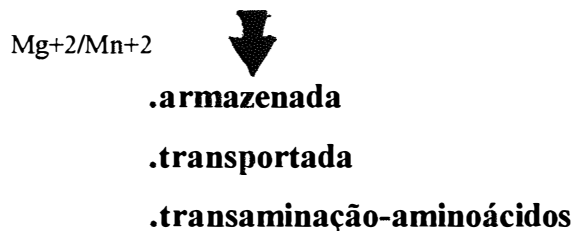
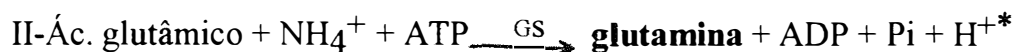


Figura 18 - Aspecto de plantas de crisântemo cultivadas em meio de cultura onde o íon amônio foi utilizado como única fonte de nitrogênio. As três plantas foram obtidas em frascos diferentes (F1, F2 e F3) do mesmo tratamento. Observar o baixo desenvolvimento e a total ausência de raízes em todas as três plantas.

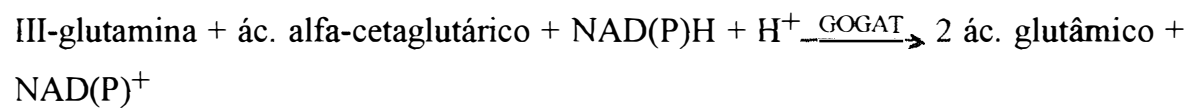
inorgânicos armazenados nas células, reduzindo assim, seu potencial osmótico e conseqüentemente promovendo a entrada de água nas células (CRAVEN et alii, 1972). Vários autores como JONES (1976) e WERNER & BOE (1980) relacionam o fenômeno de vitrificação ao excesso de água nas células e também à deficiência em clorofila. GEORGE & SHERRINGTON (1984) também constataram que altos níveis do íon amônio tendem a inibir a síntese de clorofila em cultura de calos.

Observou-se também, nos tratamentos com amônio (E2) e glutamina (E8) como única fonte de nitrogênio, o aparecimento de uma coloração avermelhada no colo dos explantes. Evidências quimiotaxonômicas correlacionam o surgimento de coloração avermelhada em plantas da família Asteráceas (*Compositae*) a pigmentos flavonóides, principalmente antocianinas (CRONQUIST, 1981).

Antocianinas são pigmentos flavonóides responsáveis pela maioria das colorações vermelha, rosa, púrpura e azulada encontradas nas plantas (TAIZ & ZEIGER, 1991). Acúmulo de flavonóides, incluindo antocianinas, é estimulado por vários fatores de estresses ambientais tais como: luz UV (BROETTO & CROCOMO, 1995); alta intensidade luminosa; traumatismos mecânicos, ataque de patógenos e deficiências nutricionais (McClure citado por DEIKMAN & HAMMER, 1995). Como as condições físicas foram mantidas constantes para todos os tratamentos e, aparentemente, não houve ataque de patógenos em nenhuma planta, é provável que o aparecimento do pigmento flavonóide nas plantas crescendo

**Equação I: Via GHD****Equações II e III: Via GS/GOGAT**

\* **acidificação: < absorção de nutrientes (N)**



AUMENTO NA BIOSÍNTESE DE AMINOÁCIDOS (ÁC. GLUTÂMICO E GLUTAMINA) ÀS EXPENSAS DO METABOLISMO DOS CARBOIDRATOS (ÁC. ALFA-CETOGLUTARATO). Ver também Figura 11.

Figura 19: Esquema evidenciando a acidificação do meio de cultura pela liberação de H<sup>+</sup> e a acentuada formação de aminoácidos em meios com elevadas concentrações do íon amônio

em presença de amônio (E2) e glutamina (E8) como fontes isoladas de N, esteja relacionado com deficiências nutricionais provocadas pela baixa absorção de nutrientes.

Uma observação experimental interessante foi em relação à coloração das folhas nos tratamentos onde uréia foi adicionada ao meio de cultura, as quais assumiram um verde intenso, classificado, pelo dicionário de cores de MAERZ & PAUL (1950), como "evergreen". Este fato pode estar relacionado com um aumento no teor de clorofila. Muitos autores como ENGVILD (1954), HARVEY (1967) e MINOCHA (1981) observaram um aumento no teor de clorofila quando adicionaram uréia ao meio de cultura.

Os coeficientes de variação relativamente altos obtidos neste experimento podem ser explicados pelo fato dos explantes utilizados (gemas axilares + uma folha) terem sido oriundos de diferentes localidades ao longo da planta. Foram extraídos, em média, quatro gemas axilares de cada planta, e, embora todas tenham sido retiradas da região central (Figura 7), suas localizações eram diferentes. VAN (1973a e 1973b) observou que gemas axilares de tabaco apresentavam diferenças fisiológicas resultando em diferentes respostas morfogenéticas *"in vitro"*. Murashige & Nakano, citados por FLOH & HANDRO (1991) e LAVEE & GALSTON (1968) também trabalharam com tabaco e verificaram que na medula caulinar ocorre um aumento de ploidia no sentido ápice-base; as respostas de crescimento e organogênese são dependentes da região de onde o explante é retirado, sendo que o potencial de crescimento decresce no sentido ápice para base. Os autores observaram que o gradiente morfogenético está associado a gradientes de ploidia, atividade de peroxidase, conteúdo de proteínas e ácidos nucleicos.

Embora se tenha procurado uniformizar os tamanhos dos explantes, o qual foi em torno de 1 cm, houve certa variação, inclusive também no tamanho das folhas que acompanharam as gemas axilares.

Outro fator que pode ter contribuído para o aumento dos valores do coeficiente de variação é a possível variabilidade genética que, segundo FLOH & HANDRO (1991), é de ocorrência muito comum quando um tecido é cultivado "*in vitro*". Segundo os mesmos autores esta instabilidade genética pode aumentar ainda mais com o aumento do número de subculturas.

Para que houvesse uma redução no coeficiente de variação, seria necessário que apenas uma gema axilar fosse retirada de cada planta, além de um aumento no número de repetições, o que, contudo, inviabilizaria totalmente a condução deste trabalho.

Também seria desejável que o número de subculturas fosse menor, porém, deste modo, não haveria condições de se obter um grande número de explantes para o início do experimento. Uma alternativa seria a de se ter iniciado todo o experimento com um grande número de plantas matrizes, o que evidentemente dependeria do fornecedor do cultivar utilizado, o que não foi o caso.

## 5.CONCLUSÕES:

Os resultados obtidos no presente trabalho sobre fatores que influenciam a morfogênese "*in vitro*" deste cultivar de crisântemo permitiram as seguintes conclusões:

A adição de fitorreguladores no meio básico de MURASHIGE & SKOOG (1962) não é necessária, pois em sua total ausência o cultivar Amarelo São Paulo apresentou bom desenvolvimento tanto da parte aérea como de raízes.

A adição de nitrato de prata, na concentração de 100 mg/L, não teve influência benéfica no desenvolvimento das gemas axilares.

A utilização de uréia (na concentração de 100 e, principalmente de 200 mg/L) substituindo a fonte amoniacal de nitrogênio determinou maior desenvolvimento da parte aérea nos primeiros 35 dias da instalação do experimento, favorecendo o enraizamento aos 70 dias.

Para o enraizamento "*in vitro*" de crisântemo a presença de uréia foi extremamente benéfica, principalmente quando utilizada em adição ao nitrato, mas também, em menor escala, quando utilizada isoladamente ou em conjunto com a



glutamina. Por sua vez, o nitrato, como única fonte de nitrogênio, sustentou um bom desenvolvimento da parte aérea das plantas, não tendo exibido diferença estatística em relação às plantas mantidas no MS, porém o enraizamento foi menor do que nos meios em que também havia a presença da uréia.

A glutamina e o íon amônio, como fontes isoladas de nitrogênio, não se mostraram eficientes, resultando em baixo desenvolvimento das plantas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABELES, F.B. **Ethylene in Plant Biology**. Academic Press, Londres, 1973.

AHMED, H. A. & ANDREA, M. Effect of heat treatment on acceleration Chrysanthemum multiplication by meristem-tip culture. **Acta Horticulture** **212**,1987. p. 99-106.

AMMIRATO, P. V. Embryogenesis.In: EVAN, D. A. ; SHARP, W. R. ; AMMIRATO, P. V. YAMADA, Y. ; eds. , **Handbook of Plant Cell Culture Vol I Techniques for Propagation and Breeding**.Macmillan Publishing Company, New York. 1983. cap. 2. p. 82-123.

AMMIRATO, P. V. & STEWARD, F. C. Some effects of environment on the development of embryos from cultured free cells. **Bot. Gaz.** , Chicago, **132**(20):149-158, 1971.

BAYLEY, J.M.; KING, J.; GAMBORG, O.L. The effect of the source of inorganic nitrogen on growth and enzymes of nitrogen assimilation in soybean and wheat cells in suspension cultures. **Planta** (Berl.), **105**, 15-24, 1972.

- BEHREND, J. & MATELES, R. I. Nitrogen metabolism in plant cell suspension cultures. II Role of organic acids during growth on ammonia. **Plant Physiology**. Lancaster, **58**:510-512, 1976.
- BETTI, J.A. Obtenção de material propagativo vegetal testado livre de vírus. In: CROCOMO, O.J.; SHARP, W.R.; MELO, M., ed. **Biotecnologia para a produção vegetal**. Piracicaba, FEALQ, 1991. p. 145-70.
- BLAKE, T. J. & REID, D. M. Ethylene, IAA and Apical dominance in *Peas*. **Suplement to: Plant Physiology**, **67** p.52, 1981.
- BRAND, M.H. Agar and ammonium nitrate influence hyperhydricity, tissue nitrate and total nitrogen content of serviceberry (*Amelanchier arborea*) shoots in vitro. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, **35**, 203-209, 1993.
- BRAUN, A. C. & WOOD, H. N. On the activation of certain essential biosynthetic systems in cells of *Vinca rosea* L. Proc. **Nat. Acad.Sci.** , **48**:1776-1782, 1962.
- BROETTO, F.; CROCOMO, O.J. Ação de luz UV e GA<sub>3</sub> sobre a atividade de enzimas do metabolismo secundário em células de cenoura in vitro. **Rev. Bras. Fisiol. Veg.**, **7**(1): 61-66, 1995.
- CALDAS, L. S. Meios Nutritivos. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. ed. **Técnicas e aplicação da cultura de tecidos de plantas**. Brasília, DF, EMBRAPA/CNPH, 1990. p. 37-66.

- CASTRO, P.R.C. & MELOTTO, E. Mecanismos envolvidos com o transporte de carbono. In: SEMINÁRIO DE BIOTECNOLOGIA AGRÍCOLA, 5., Piracicaba, 1987. **Anais**. Piracicaba, FEALQ. p. 159-188.
- CRAVEN, G.H.; MOTT, R.L. & STEWARD, F.C. Solute accumulation in plant cells. IV Effects of ammonium ions on growth and solute content. **Annals Botany**, Oxford, **36**: 897-914, 1972.
- CREPY, L. ; CHUPEAU, M. C. & CHUPEAU, Y. The isolation and culture of leaf protoplasts of *Cichorium intybus* and their regeneration into plants. **Z. Pflanzenphysiol.** , **107**:123-131, 1982.
- CROCOMO, O.J. Plant biotechnology in the agriculture and development in Brazil. In: SIMPÓSIO ANUAL DA ACADEMIA DE CIÊNCIA DE SÃO PAULO, 11. **Anais**, São Paulo, 1986. p. 53-71.
- CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. New York: Columbia University Press, 1981. 1262 p.
- CUQUEL, F.L.; GRANJA, N.P.; MINAMI, K. Avaliação do enraizamento de estacas de crisântemo (*Chrysanthemum morifolium* L.) cv. White Reagan 606 tratadas com ácido indolbutírico (IBA). **Scientia Agricola**, Piracicaba, **49**(1): 15-22, 1992.
- CUZZUOL, G.R.F., **Parâmetros bioquímicos e fisiológicos da vitrificação e do desenvolvimento do cravo (*Dianthus caryophyllus* L.) in vitro**. Piracicaba, 1993. (Dissertação de mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

- DAVIES, M.J.; BAKER, R.; HANAN, J.J. Clonal multiplication of carnation by micropropagation. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, St. Joseph, **102**(4): 48-53, 1977.
- DEIKMAN, J.; HAMMER, P.E. Induction of Anthocyanin Accumulation by Cytokinins in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Physiology**, **108**; 47-57, 1995.
- DOODS, J. H. & ROBERTS, L. W. Micropropagation with shoot apex cultures. In: DODDS, J.H. ed. **Experiments and Plant Tissue Culture**. Cambridge. Cambridge University Press, 1985. pp 115-121.
- DOUGALL, D. K. Nutrition and Metabolism. In: STABA, E. J. , ed. **Plant Tissue Culture as a Source of Biochemicals**. CRC Press, INC, Florida, 1980. p. 21-58.
- DREW, M.C.; SAKER, L.R.; ASIILEY, T.W. Nutrient supply and the growth of the seminal root system in barley. **J. Exp. Bot.** **24**: 1189-1202, 1973.
- EARLE, E. D. & LANGHANS, R. W. Propagation of Chrysanthemum in vitro. I Multiple plantlets from Shoot Tips and the Establishment of Tissue Cultures. **J. Amer. Hort. Sci.** **99**(2):128-132, 1974
- EEUWENS, C. J. Mineral Requirements for growth and callus initiation of tissue explants excised from mature coconut palms (*Cocos nucifera*) and cultivated "in vitro". **Physiol Plant.** , Copenhagen, **36**:23-28, 1976.
- ENGVILD, K.C. Growth and chlorophyll formation of dark-grown pine embryos on different media. **Physiologia Plantarum**, Copennhagen, **17**: 866-874, 1964.

EVANS, JR. Photosynthesis and nitrogen relationships in leaves of C<sub>3</sub> plants. **Oecologia 78**: 9-19, 1989.

FEDDIS, G. & HESS, C.M. The relationship between nitrogen nutrition and applied IAA an artificial apical dominance in sunflowers. **Supplement to: Plant Physiology**. vol. **63**. p. 47 (261). May, 1979.

FERRAZ, E.C. Reguladores de Crescimento. In: **Apontamentos de Fisiologia Vegetal - 2º parte**. Centro Acadêmico "Luiz de Queiroz". Departamento Editorial. Piracicaba, 1987. cap. X. p. 188-200.

FERRI, M.G. **Fisiologia Vegetal 2**, São Paulo: EPU: Ed. da Universidade de São Paulo, 1979. 392 p.

FIDES. Fides mum manual for all year round *Chrysanthemum*. Fides BV ed., De Lier, 1990. 102 p.

FLICK, C. E. ; EVANS, D. A. ; SHARP, W. R. Organogenesis. In: EVANS, D. A. ; SHARP, W. R. ; AMMIRATO, P.V. ; YAMADA, Y., eds. **Handbook of Plant Cell Culture**. Vol. I Techiques for propagation and Breeding. Publishing Company, New York, 1983. cap. 1, p. 13-81.

FRIDBORG, G. Growth and organogenesis in tissue culture of *Allium cepa* var. Proliferum. **Physiol. Plant**, **25**: 436-440, 1971.

FLOH, E.L.S. & HANDRO, W. Variation of histological patterns in tobacco callus during successive subcultures. **Can. J. Bot.** **63**: 1794-800, 1985.

- FLOH, E. I. S. & HANDRO, W. Haplóides: Obtenção e aplicações. In: CROCOMO, O.J.; SHARP, W.R.; MELO, M. , eds. **Biotecnologia para produção vegetal**. Piracicaba, ESALQ/USP, 1991. p. 463-469.
- GAMBORG, O. L. ; MILLER, R. A. ; OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean roots cells. **Experimental Cell Research**, New York, **50**: 151-158, 1968.
- GAMBORG, O.L. & SHYLUK, J. P. The Culture of plant cells with ammonium salts as the sole nitrogen source. **Plant Physiology**, Lancaster, **45**: 598-600, 1970.
- GASPAR, T. H. ; PENEL, C. ; CASTILLO, F. J. ; GREPPIN, H. A two-step control of basic and acids peroxidases and its significance for growth and development. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, **64**: 418-423, 1985.
- GEORGE, E. F. ; PUTTOCK, D. J. M. ; GEORGE, H. J. **Plant Culture Media**. Vol. I. Formulations and Uses. British Library. 1987. 660 p..
- GEORGE, E. F. & SHERRINGTON, P. D. **Plant Propagation by Tissue Culture; Handbook and directory of commercial laboratories**. British Library, Great Britain, 1984. 709 p.
- GONÇALVES, A. N. **The Growth and Development Physiology of Eucalyptus in Cell and Tissue Culture Systems**. Ohio State University, 1975. Master of Science. 210 p.

GRATTAPAGLIA, D. & MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. ed. **Técnicas e Aplicações da Cultura de Tecidos de Plantas**. Brasília, DF, EMBRAPA/CNPH, 1990. p. 99-169.

GROTHGE, M.T. **Efeito de várias fontes de nitrogênio na multiplicação "in vitro" de clones de *Eucaliptus grandis* HILL ex MAIDEN**. Piracicaba, 1992 (Dissertação de Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

GUKASYAN, I.A.; BUTENKO, R.G.; PETOYAN, S.A.; SEVOST'YANOVA, T.A. Morphogenesis of isolated apices of remontant carnation on an artificial medium. **Soviet Plant Physiology**, New York, **24**: 130-5, 1977.

HARTMANN, H.T. & KESTER, D. E. *Plant propagation; principles and practices*. 4 ed. New Jersey, Prentice - Hall, 1983. 727 p.

HARVEY, A.E. Tissue culture of *Pinus monticola* on a chemically defined medium. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, **45**: 1783-1787, 1967.

HASEGAWA, P.M. In vitro propagation of rose. **HortSci.**, **14**:610-612, 1979.

HASEGAWA, P. M. Factors affecting shoot and root initiation from cultured Rose shoot tips. **J. Amer. Soc. Hort. Sci.**, **105**:216-220, 1980.

HELLER, R. Some aspects of the inorganic nutrition of plant tissue cultures. In: WHITE, P. R.; GROVE, A. R. eds. *Proceedings of an International Conference on Plant Tissue Culture*. Berkeley, McCutchan Publ. Corp. , 1965. p. 1-17.



- HOLLINGS, M. Investigation of chrysanthemum viroses. I. Asperny Flower distortion. **Ann. Appl. Virol.** **43**: 86-102.
- HOLLINGS, M. Disease control through virus-free stock. **Ann. Rev. Phytopath.** **3**: 367-396, 1965.
- HORST, R. K. & NELSON, P. E. Diseases of Crysanthemum. **Cornell Information Bull**, **85**: 36 p., 1975. N. Y.
- HU, C. Y. & WANG, P.J. Meristem, shoot tip and bud culture. In: EVANS, D. A. ; SHARP, W. R. ; AMMIRATO, P. V. ; YAMADA, Y., ed. **Handbook of plant cell culture**. New York, Macmillan, 1983. Vol. I: Techniques for propagation and breeding. p.177-227.
- HUBERMAN, M. & JAFFE, M.J. Ethylene, ACC, SAM e ACC sintetase Kinetics in different parts of the bean following mechanical pertubation. Supplement to: **Plant Physiology**. vol. 67, p.51 (283), 1981.
- INFORME GEP/DESR. 4(12). 30. Dezembro, 1991.
- JACOBS, W. P. Auxin as a limiting factor in the differentiation for plant tissue. **Recent Advances in Botany**. Toronto. **8**:786-90, 1961.
- JARVIS, B.C. Endogenous control of adventitious rotting in non-woody cuttings. In: JACKSON, M.B. **New root formation in plants and cuttings**. Dordrecht, Martinus, Nijhoff, 1986. cap.6, p. 191-222. (Development in Plant and Soil Sciences).

- JONES, O.P. Effect of phoridzin and phloroglucinol on apple shoots. **Nature**, London, **262**: 392-393, 1976.
- KAZEMI, S. Control of lateral bud growth in bean (*Phaseolus vulgaris*) plants by endogenous ethylene. **Supplement to: Plant Physiology**. vol.65. p.42 (225), June, 1980.
- KERBAUY, G. B. Indução in vitro de protocormóides em raízes de *Oncidium varicosum*. Efeitos de fontes nitrogenadas, auxinas e citocininas. **Revista Brasil. Bot.** **16**(1): 1-8, 1993.
- KIRBY, E. G. ; LEUSTEK, T. & LEE, M. S. Nitrogen Nutrition. In: BONGA, J. M. & DURZAN, D.J. eds. **Cell and Tissue Culture in Forestry**. Dordrecht/Boston/Lancaster. Martinus Nijhoff Publishers, 1987. Vol I, p. 67-88.
- KOFRANEK, A. M. Cut *Chrysanthemum*. In: LARSON, R.A. eds. **Introductory floriculture**. New York, Acad. Press, 1980. p. 5-45.
- LAVEE, S. & GALSTON, A.W. Hormonal control of peroxidase activity in cultured *Pelargonium Pith*. **Amer. J. Bot.** **55**(8): 890-393, 1968.
- LESHEM, B.; WERKER, E.; SHALEV, D.P. The effect of cytokinins on vitrification in melon and carnation. **Annals of Botany**, London, **62**: 271-6, 1988.
- LETOUZÉ, R. & DAGUIN, F. Manifestation spontanée et aléatoire d'une croissance anormale en culture in vitro. **Recherche de marqueurs métaboliques. Revue Canadienne Biologie Experimentale**, Montreal, **42**: 23-28, 1983.

LIBÂNIO, R. A. & WITMER, A. H. M. Comparação entre plantas de Crisântemo propagadas "in vitro" e "in vivo". In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS**, 6, Campinas, 1987, p. 77.

LIEBERMAN, M.E. & KUNISHI, A.T. Thoughts on the Role of Ethylene **In Plant Growth Substances**. In: *In Plant Growth Substances*. Org.D.J. Carr. Springer-Verlag, Berlim. p.549-560, 1972.

LINSMAIER-BEDNAR, E. M. & SKOOG, F. Thiamine requeriment in relation to cytokinin in "normal" and "mutant" strains of tobacco callus. **Planta**, 72: 146-154, 1967.

LUNDERGAN, C. & JANICK, J. Low temperature storage of "in vitro" apple shoots. **Hort. Sci.**, 14:514, 1979.

MAERZ, A. & PAUL, M.R. **Dictionary of Colour**. New York: McGraw-Hill, 1950.

MARTIN, S. M. ; ROSE, D. ; HUI, V. Growth of Plant cell suspension cultures with ammonium as the sole source of nitrogen. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, 55: 2838-2843, 1977.

MATSUMOTO, T. ; OKUNISHI, K. ; NISHIDA, K. ; NOGUCHI, M.; TAMAKI, E. Studies of the culture conditions of higher plant cell in suspension culture. II . Effect of the nutritional factors on growth. **Agr. Biol. Chem.**, 35: 543-551, 1971.

McCOWN, B. H. & SELLMER, J. C. General Media and Vessels Suitable for Wood Plant Culture. In: BONGA, J. M. & DURZAN, D. J. eds. **Cell and Tissue Culture in Forestry**. Dordrecht/Boston/Lancaster, Martinus Nijhoff Publishers, 1987. Vol. I p. 4-16.

MINOCHA, S.C. Role of the source of nitrogen in the growth of shoot tips and callus cultures of woody plants in vitro. In: IUFRO Sect S2015. Workshop in vitro. Cultivation Forest Tree Species, Fontainebleau, 1981. p. 227-235.

MOREL, G. Meristems Culture Techniques for the long term storage of cultivated plants. In: FRANKEL, O.H.; HOWKES, J.G. **Crop Genetic Resources for today and tomorrow**, ed., pp. 327-32, 1975.

MURASHIGE, T. Plant propagation by Tissue Culture. **Annals Review of Plant Physiology**, Copenhagen, **25**: 135-66, 1974.

MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiol. Plant**, **15**: 473-497, 1962.

NASH, D. T. & DAVIES, M. E. Some aspects of growth and metabolism of Paul's Scarlet Rose cell suspensions. **J. Exp. Bot.** , **23**: 75-91, 1972.

OLIVEIRA, P.D. & PASQUAL, M. Efeito de diferentes reguladores de crescimento sobre a proliferação "in vitro" de brotos de crisântemo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FISILOGIA VEGETAL, v, Lavras, 1995. **Anais**. Lavras, UFLV, 1995. p. 128.

- PASQUALETTO, P.L.; ZIMMERMAN, R.H.; FORDHAM, I. The influence of cation and gelling agent concentration on vitrification of apple cultivars in vitro. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, The Hague, **14**: 31-40, 1988.
- PHILLIPS, D.J. & MATTHEWS, G.J. Growth on development of carnation shoot tips in vitro. **Botanical Gazette, Chicago**, **125**(1): 7-12, 1960.
- PILATE, G.; SOSSOUNTZOV, L.; MIGINIAC, E. Hormone Levels and Apical Domonance in the Aquatic Fern. *Marsilea drummondii* A. Br. **Plant Physiology**, **90**: 907-912, 1989.
- POLLACO, J. C. Nitrogen Metabolism in soybean tissue culture I. Assimilation of urea. *Plant Physiology*. Lancaster, **58**: 350-357, 1976.
- POLLACO, J. C. Nitrogen Metabolism of soybean tissue culture. II. Urea utilization and urease synthesis require  $Ni^{+2}$ . **Plant Physiology**. Lancaster, **59**: 827-830, 1977.
- QI-GUANG, Y.; READ, P.E.; FELLMAN, C.D.; HOSIER, M.A. Effect of cytokinin, IBA, and rooting regime on chinese chestnut in vitro. **HortSci.**, **21**: 133-134, 1986.
- QUOIRIN, M. & LEPOIVRE, P. Etude de milieux adaptes aux cultures "in vitro" de *Prunus*. **Acta Hort.**, **78**: 437-442, 1977.
- RAAB, T.K. & TERRY, N. Nitrogen source regulation of growth and photosynthesis in *Beta vulgaris* L. **Plant Physiology**, **105**: 1159-1166, 1994.

- RAJU, B. C. & OLSON, C. J. Indexing systems for producing clean stock for disease control in commercial floriculture. **Plant Dis**, **69**: 189-192, 1985.
- REINERT, J. ; TAZAWA, M. & SEMENOFF, S. Nitrogen compounds as factors of embryogenesis "in vitro". **Nature**, **216**: 1215-1216, 1967.
- RIKER, A.J. & GUTSCHE, A.E. The growth of sunflower tissue in vitro on synthetic media with various organic and inorganic sources of nitrogen. **American J. Botany**, New York, **35**: 142-154, 1948.
- RISSER, P. G. & WHITE, P. R. Nutritional requirements fo spruce tumor cells "in vitro". **Physiol. Plant.**, **17**: 620-623, 1964.
- ROCHELLE, L.A.; RODRIGUES, R.R.; CAPELLARI jr., **Famílias de plantas fanerogâmicas de interesse econômico**. Piracicaba, SP: ESALQ/USP/Depto. Botânica, 1990. 51p.
- ROEST, S. & BOKELMANN, G. S. Vegetative propagation of Chrysanthemum morifolium Ram. "in vitro". **Scientia Hort.**, 317-330, 1975.
- SAGAWA, Y & KUNISAKI, J.T. Micropropagation of floriculture crops. In: AMMIRATO, P.V.; EVANS, D.A.; SHARP, W.R.; BAJAJ, Y.P.S., eds. **Handbook of plant cell culture: ornamental species**, 1990. v.5, cap.3, p.25-26.
- SANGWAN, C. & DETREZ, B. S. "In vitro" culture of shoot-tip meristems in some higher plants. "In vitro" Problems Related to Mass Propagation. **Acta Horticulturae**, **212**, 1987.

- SARGENT, P. A. & KING, J. Investigations of growth-promoting factors in conditioned soybean root cells and in the liquid medium in which they grow: ammonium, glutamine, and amino acids. **Can. J. Bot.**, **52**: 1747-1755, 1974.
- SHABDE, M. & MURASHIGE, T. Hormonal Requirements of excised *Dianthus caryophyllus* L. shoot apical meristem "in vitro". **American Journal of Botany, Baltimore**, **64**(4): 433-48, 1977.
- SHEAT, D.E.G. ; FLETCHER, B. H. ; STREET, H. E. Studies on the growth of excised roots. VIII The growth of excised tomato roots supplied with various inorganic sources of nitrogen. **The New Phytologist**, Oxford, **58** (2): 128-141, 1959.
- SKOOG, F. & MILLER, C. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured "in vitro". **Symp. Soc. Exp. Biol.**, **11**: 118-131, 1957.
- SMITH, R. H. & MURASHIGE, T. "In vitro" development of the isolated shoot apical meristem of angiosperms. **Amer. J. Bot.**, **57**: 562-568, 1970.
- SOSSOUNTZOV, L.; HABRICOT, Y.; GARREC, J.P.; LAMANT, A. Early Effects of Decapitation on the Mg<sup>2+</sup>, K<sup>+</sup>, ATPase and cation contents in Lateral Buds of the Aquatic Fern, *Marsilea drummondii* A. Br. **Protoplasma**, **127**: 192-203, 1985.
- STONE, O.M. Factors affecting the growth of carnation and Sweet William by meristem-tip culture. **Annals of Applied Biology**, Wellesbourne, **52**: 119-209, 1963.

SUTTER E. G. & LANGHANS, R. W. Epicuticular wax formation on carnation plantlets regenerated from shoot tip culture. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, St. Joseph, **104**(4): 493-6, 1979.

TAIZ, L. & ZEIGER, E. **Plant Physiology**. Redwood City, CA: Benjamin/Cummings, 1991.

TAKAYAMA, S. & MISAWA, M. Factors affecting differentiation "in vitro", and a mass-propagation scheme for *Begonia x hiemalis*. **Science Horticulturae**, Amsterdam, **16**: 65-75, 1982.

TONIN, G.S.; CARVALHO, M.T.V.; CROCOMO, O.J. Amino acids in the callus growth and root morphogenesis of bean (*Phaseolus vulgaris*) leaves cultured "in vitro" Turrialba, Costa Rica, **31**: 245-252, 1981.

VELIKY, I. A. & ROSE, D. Nitrate and ammonium as nitrogen nutrients for plant cell cultures. **Can. J. Bot.**, **51**: 1837-1844, 1973.

VELIKY, I. A. Synthesis of carboline alkaloids by plant cell cultures. **Phytochemistry**, London, **11**: 1405-1406, 1972.

WEAVER, R.J. Rooting and propagation. In: -----, ed. **Plant growth substances in agriculture**. San Francisco, Freeman, 1972. chap. 5, p. 118-45.

WERNER, E.M. & BOE, A.A. In vitro propagation of malling 7 apple rootstocks. **Hortscience**, Alexandria, **15**(4): 509-510, 1980.



YATAZAWA, M. & FURUHASHI, K. Nitrogen sources for the growth of rice callus tissue. **Soil Sci. Plant Nutr.**, **14**: 73-79, 1968.

YU, D. & MEREDITH, C.P. The influence of explant origin on tissue browning and shoot production in shoot tip cultures of grapevine. **J. Amer. Soc. Hort. Sci.**, **111**: 972-975, 1986.

ZAERR, J. B. & MAPES, M. O. Action of growth regulators. In: BONGA, J. M. & DURZAN, D.J. eds. **Tissue culture in forestry**. Segunda edição. Dordrecht, Martinus Nijhoff Publishers, 1985, p. 231-255.

ZIV, M. ; SCHWARTZ, A. ; FLEMINGER, D. Malfunctioning stomata in vitreous leaves of carnation (*Dianthus caryophyllus*) plant propagated "in vitro"; implications for hardening. **Plant Science**, Lucknow, **52**: 127-34, 1987.

ZIV, M. Vitrification: morphological and physiological disorders of in vitro plants. In: DEBERGH, P.C. & ZIMMERMAN, R.H., ed. **Micropropagation: technology and application**. Dordrecht, Kluwer Academic Publ., 1991, chap. 4, p. 45-69.

VAN, M.T.T. Direct flower neof ormation from superficial tissue of small explants of *Nicotiana tabacum* L. **Planta** (Berl.), **115**: 87-92, 1973a.

VAN, M.T.T. In vitro control of de novo flower, bud, root, and callus differentiation from excised epidermal tissues. **Nature**, **246**: 44-45, 1973b.