

# EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO MEIO MS, NITROGÊNIO E SACAROSE NA MICROPROPAGAÇÃO DE CRISÂNTEMO 'ORANGE REAGEN' <sup>(1)</sup>

PATRÍCIA DUARTE DE OLIVEIRA <sup>(2)</sup>, MOACIR PASQUAL <sup>(2)</sup> e RENATO PAIVA <sup>(3)</sup>

## RESUMO

Realizaram-se experimentos objetivando estabelecer concentrações satisfatórias do meio básico a ser utilizado, Murashige e Skoog (MS), de nitrogênio e de sacarose para a propagação "in vitro" de crisântemo (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev.) cv. Orange Reagen. Testaram-se as concentrações 0, 25, 50, 75, 100, 125 e 150% do meio MS combinadas com 0; 0,75; 1,5; 3,0; 6,0 e 12,0% de sacarose. Num segundo experimento, as concentrações 0, 25, 50, 75, 100, 125 e 150% de nitrogênio (em relação ao MS) foram testadas em combinação com as mesmas concentrações de sacarose. Observou-se melhor desenvolvimento de brotos em meios com concentrações entre 50 e 150%, em relação ao MS, combinados com 6% de sacarose. Na concentração de 50% do MS, o tamanho dos brotos obtidos não foi satisfatório. Concentrações elevadas de meio de cultura inibiram a formação de raízes. Verificaram-se resultados semelhantes para as concentrações testadas de nitrogênio. Pode-se então recomendar a utilização de 75% do meio MS com 75% de nitrogênio, acrescido de 6% de sacarose.

**Termos de indexação:** cultura de tecidos, crisântemo, *Dendranthema grandiflora* Tzvelev., meio MS, nitrogênio, sacarose.

## ABSTRACT

### DIFFERENT CONCENTRATIONS OF THE MS MEDIUM, NITROGEN AND SUCROSE ON MICROPROPAGATION OF CHRYSANTHEMUM

The effect of MS medium, nitrogen and sucrose was investigated on "in vitro" propagation of shoot nodal explants of chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev.) cultivar Orange Reagen. MS medium was tested using the following concentrations: 0, 25, 50, 75, 100, 125 and 150% in combination with sucrose doses of: 0, 0.75, 1.5, 3.0, 6.0 and 12.0%. Nitrogen was tested using the concentrations

---

<sup>(1)</sup> Parte da dissertação de mestrado do primeiro autor, apresentada na Universidade Federal de Lavras (UFLA), em 30 de setembro de 1994. Recebido em 15 de fevereiro e aceito para publicação em 30 de outubro de 1995.

<sup>(2)</sup> Departamento de Agricultura, UFLA, Caixa Postal 37, 37200-000 Lavras (MG).

<sup>(3)</sup> Professor Adjunto, Departamento de Biologia, UFLA.

of 0, 25, 50, 75, 100, 125 and 150% in combination with the sucrose doses used as above. Best shoot development was observed when nodal segments were cultivated on medium containing concentrations between 50 and 150% of MS in combination with 6% sucrose. No satisfactory shoot length was observed when 50% MS was used. Roots were not observed at concentrations above 100% of MS and nitrogen. In order to obtain successful "in vitro" propagation of chrysanthemum, our results suggest the use of 75% MS, with 75% of nitrogen and 6% of sucrose.

**Index terms:** tissue culture, chrysanthemum, *Dendranthema grandiflora* Tzvelev., MS medium, nitrogen, sucrose.

## 1. INTRODUÇÃO

O crisântemo é a primeira flor de corte em volume de produção no Brasil, com grande variedade em coloração e forma de flores, uma exigência do mercado atual.

Seu principal processo de propagação é por meio de estacas (May & Trigiano, 1991), o que tem gerado prejuízos aos viveiristas e produtores pela disseminação de viroses. A utilização de cultura de tecidos tem apresentado bons resultados, pois, além da propagação rápida de plantas, produzindo plantas matrizes (Debergh, 1990; Debergh & Read, 1991) e facilitando a introdução de novos cultivares, é possível indexar e produzir plantas livres de vírus e outros patógenos (Earle & Langhans, 1974; Holdgate, 1977; Ahmed & Andrea, 1987; Jones, 1987; Bhojwani, 1990; Horst, 1990).

Cada clone a ser propagado requer um meio individual otimizado e o estabelecimento de um protocolo, proporcionando adequada razão de multiplicação, de enraizamento e aclimação (Jones, 1987; Bhojwani, 1990). O MS (Murashige & Skoog, 1962) é o meio de cultura mais comumente utilizado para a propagação de várias espécies; entretanto, sua concentração de nutrientes tem sido identificada como sendo elevada (Pierik, 1987) e muitas modificações têm sido sugeridas, objetivando maior adaptação das culturas e redução nos custos (George & Sherrington, 1984). Esses resultados foram observados em rosa (Skirvin & Chu, 1979), espécies temperadas (Lane, 1979), cereais (Karthi et al., 1981; Thorpe & Patel, 1984), crisântemo (Prasad & Chaturvedi, 1988; Lu et al., 1990).

A quantidade total de nitrogênio pode afetar o número de brotações obtidas a partir do pedicelo

de crisântemo (Roest & Bokelmann, 1975), sendo recomendada a utilização de 0,5 a 2,0 vezes a concentração do MS, com ideal próximo de 0,7.

Do & Cormier (1990, 1991a,b) relataram que altas concentrações de sacarose e baixa de nitrato provocaram acúmulo intracelular de antocianinas e inibição do crescimento celular, em suspensão de células de videira cultivadas em 4,5% de sacarose e 6,25 mmol/L de nitrato.

Em cultura de tecidos, é necessária a incorporação de carbono no meio como fonte de energia, sendo os carboidratos essenciais para o crescimento e desenvolvimento "in vitro", pois a fotossíntese é insuficiente nessa condição, devido ao fato de os tecidos verdes não serem suficientemente autotróficos e a concentração de CO<sub>2</sub> ser limitante (George & Sherrington, 1984; Pierik, 1987).

Em estudos com vários cultivares de crisântemo, Shibli et al. (1992) observaram que o aumento no nível de sacarose favorece o crescimento dos brotos, mesmo em concentração elevada (8,8%). Roest & Bokelmann (1975) obtiveram ótimo desenvolvimento de brotos adventícios de crisântemo nas concentrações de 3% para o 'Super Yellow' e 5% para o 'Bravo'. Cuello et al. (1992) observaram que a concentração de 3% de sacarose no meio de cultura promoveu aumento na produção da matéria seca de crisântemo quando comparada à de 2 ou 1%. Ao contrário, May & Trigiano (1991) não verificaram indução de brotações ou enraizamento de explantes de crisântemo em meio com sacarose em concentrações inferiores a 9%.

Assim, procurou-se, neste trabalho, estabelecer uma concentração satisfatória do meio MS, de nitrogênio e sacarose, para a micropropagação do cultivar Orange Reagen de crisântemo.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Utilizou-se o 'Orange Reagen', já estabelecido "in vitro" e submetido à uniformização em meio MS. Os explantes foram microestacas com duas gemas, retiradas da região mediana de um broto, e colocada uma por tubo de ensaio com 15 ml de meio de cultura. Esse processo foi realizado em sala asséptica, empregando câmara de fluxo laminar.

O meio de cultura básico utilizado foi o de Murashige & Skoog (1962), nas seguintes concentrações: 0, 25, 50, 75, 100, 125 e 150%, combinadas com diferentes níveis de sacarose: 0; 0,75; 1,5; 3,0; 6,0 e 12,0% (fatorial 7 x 6). No segundo experimento, utilizou-se o meio MS a 75%, variando os níveis de nitrogênio 0, 25, 50, 75, 100, 125 e 150% em concentrações proporcionais às utilizadas no meio MS, mantendo-se as mesmas proporções das fontes amoniacal e nitrato. As concentrações de nitrogênio foram combinadas com os mesmos níveis de sacarose utilizados no experimento anterior. Ambos os meios foram solidificados com 0,7% de ágar, sendo o pH ajustado para 5,8, antes da autoclavagem (121°C, 1 atm, por 20 minutos).

O delineamento estatístico foi inteiramente casualizado, com 3 tubos por parcela e 4 repetições. Os experimentos foram desenvolvidos em sala de crescimento com temperatura de  $26 \pm 1^\circ\text{C}$  e

fotoperíodo de 16 horas de luz, com intensidade luminosa de 2.500 lux.

A avaliação dos experimentos foi efetuada 30 dias após a instalação, observando-se número de brotos obtidos, tamanho dos brotos (mm), número de folhas e de raízes primárias, massa seca (g) da parte aérea e das raízes (MSpa e MSraízes respectivamente).

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados observados foram transformados por raiz ( $x + 0,5$ ), com exceção de número de brotos, que foram transformados por raiz ( $x + 5$ ), sendo as médias analisadas estatisticamente pelo teste de Tukey.

Número de folhas, tamanho dos brotos, MSpa e MSraízes foram afetados significativamente pela interação de concentrações do meio de cultura e de sacarose - Quadro 1. Esses dados contrariaram as observações de alguns autores que testaram o efeito de concentrações relativas do meio MS (Lane, 1979; Skirvin & Chu, 1979; Kartha et al., 1981; Prasad & Chaturvedi, 1988; Lu et al., 1990) e de sacarose (Roest & Bokelmann, 1975; Welander, 1976; Chong & Pua, 1985; May & Trigiano, 1991; Cuello et al., 1992; Shibli et al., 1992), mas não encontraram interação significativa entre concentrações do meio de cultura e de sacarose. O número

Quadro 1. Resumo das análises da variância em função de concentrações do meio MS e de sacarose. Lavras (MG), 1994

Causas da variação	GL	Quadrados médios e significância					
		N.º brotos	Tam.brotos	N.º folhas	MSpa	N.º raízes	MSraízes
MS	6	0,155143	1,021286**	1,742112**	0,000146**	0,542150**	0,000006**
Sacarose	5	0,016971	1,510073**	2,805154**	0,002296**	5,856346**	0,000030**
MS x sacarose	30	0,022315	0,100066**	0,132225**	0,000040**	0,078306	0,000004**
Resíduo	126	0,016031	0,013434	0,035891	0,000006	0,063804	0,000001
CV (%)		5,18	8,74	7,49	0,37	12,85	0,15

\*\* Significativo ao nível de 1%.

de raízes foi influenciado pelas concentrações do meio de cultura e de sacarose isoladamente (Quadro 1).

Em concentrações menores dos nutrientes do meio MS, não houve inibição da formação de brotos, mesmo em meio sem tais nutrientes. O número de brotos não variou em função dos tratamentos testados (Quadro 3). A média geral foi de 1,06 broto/explante. Em meios onde se reduziram as concentrações do MS, como se observa no quadro 2, foi possível produzir brotos com tamanho superior aos observados no meio com 100% MS. A melhor média (28,0 mm) foi obtida utilizando 75% do MS e 6% de sacarose. Esses resultados concordam com as observações de Roest & Bokelmann (1975), Lane (1979), Skirvin & Chu (1979), Kartha et al. (1981), Thorpe & Patel (1984), Prasad & Chaturvedi (1988) e Lu et al. (1990), que sugeriram a redução nas concentrações dos componentes do MS.

Em todos os tratamentos testados, avaliando tanto as concentrações de nitrogênio como as do meio MS, observou-se o desenvolvimento médio de um broto apenas, oriundo da brotação de uma das gemas do explante inicial. Houve tendência de aumentar a média (ou seja, a ocorrência de brotação da outra gema da estaca) à medida que se aumentou a concentração de sacarose no meio.

Em concentração mais elevada de sacarose (12%), o tamanho dos brotos foi afetado negativamente. Essa inibição pode ser devida à elevação do potencial osmótico do meio, diminuindo, assim, a disponibilidade de água. Tais resultados se opõem aos obtidos por May & Trigiano (1991) e Shibli et al. (1992), que não observaram efeito das concentrações de sacarose afetando o crescimento do crisântemo, ao contrário, estimulando o processo. As diferentes respostas observadas por esses autores e neste trabalho podem ser atribuídas a diferenças intrínsecas às variedades testadas.

Em segmentos nodais cultivados em meios com 12% de sacarose, notou-se o acúmulo de antocianina. O mesmo efeito foi verificado por Do & Cormier (1991a,b) em cultura de células extraídas das folhas de videira, em meios com níveis elevados de sacarose, sendo a ocorrência de antocianina atri-

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

Maior número de folhas foi obtido em presença de 6% de sacarose (Quadro 2). Em todos os tratamentos, houve a tendência de brotos de maior tamanho apresentarem maior número de folhas e, ao contrário, brotos de tamanho menor, menor número de folhas. O alongamento dos brotos se deu pela formação de novos internódios, e não de estiolamento. Esse resultado é de grande importância no cultivo de segmentos nodais, pois pode-se obter maior número de explantes a partir de brotos grandes, com bom número de nós e entrenós espaçados, o que não ocorre em brotos pequenos e com muitas folhas ou brotos estiolados.

Valores mais elevados de MSpa ocorreram em meios com maiores concentrações do MS e de sacarose - Quadro 2 - sendo esse efeito atribuído à disponibilidade de nutrientes no meio. A formação de raízes - Quadro 4 - foi menor em meios com menor porcentagem de nutrientes do MS ou em menor concentração de sacarose. Em meios sem os componentes do MS (0%), houve uma pequena tendência de diminuição no número de raízes formadas. Formação radicular satisfatória foi obtida em meios com concentrações do MS entre 25 e 125%. Nesse intervalo, situa-se o nível observado por Lu et al. (1990), que obtiveram como melhor meio para enraizamento 50% do MS. Nota-se, por esses resultados, que valores extremos são limitantes para a ocorrência de enraizamento, tendendo este a ser menor tanto em meios com alta ou com baixa concentração de nutrientes.

Maior enraizamento pôde ser obtido em meios com sacarose acima de 3%. Esse resultado concorda com Welander (1976), Chong & Pua (1985), Pierik (1987) e Shibli et al. (1992), que observaram a necessidade de fornecimento de alta concentração de sacarose para a emissão de raízes em várias espécies, inclusive em crisântemo, espécie estudada por Shibli et al. (1992), utilizando até 8,8% de sacarose no meio de cultura.

Quadro 2. Tamanho dos brotos, número de folhas, massa seca da parte aérea e das raízes observados em meios com diferentes concentrações de sacarose e do meio MS. Lavras (MG), 1994

MS	Sacarose (%)					
	0	0,75	1,50	3,0	6,0	12,0
%						
<b>Tam. brotos (mm)</b>						
0	2,7aA	4,5dA	2,4cA	2,3cA	2,5cA	1,5cA
25	2,6aB	23,2aA	25,4aA	27,7aA	20,8abA	7,8bB
50	3,4aC	19,3abAB	20,7aAB	23,0abA	17,3bAB	13,5abB
75	2,4aC	16,7abcB	17,2abB	18,5abB	28,0aA	14,9abB
100	1,8aB	14,0bcA	16,7abA	18,8abA	18,3abA	15,3aA
125	2,8aB	15,3abcA	16,5abA	17,4bA	19,8abA	18,6aA
150	1,7aC	9,1cdB	11,8bAB	14,9bAB	17,1bA	18,8aA
<b>Número de folhas</b>						
0	3,24aAB	4,25bA	3,18bAB	3,30bAB	3,80bA	1,82cB
25	3,05aB	6,81aA	7,30aA	7,78aA	7,90aA	4,36bB
50	4,01aB	6,41abA	7,40aA	7,59aA	7,61aA	6,17abAB
75	3,80aC	6,23abB	6,62aB	7,90aAB	9,47aA	5,79abBC
100	2,63aB	6,98aA	7,44aA	7,82aA	7,79aA	6,81aA
125	3,84aB	6,74aA	7,82aA	8,23aA	8,38aA	7,00aA
150	2,54aB	6,15abA	6,82aA	7,35aA	7,68aA	6,56abA
<b>MSpa (g)</b>						
0	0,0004aA	0,0014aA	0,0008aA	0,0009aA	0,0012bA	0,0005cA
25	0,0006bB	0,0041bAB	0,0059aAB	0,0099aA	0,0098abA	0,0088bcAB
50	0,0009aC	0,0042bBC	0,0050aBC	0,0076aABC	0,0106aAB	0,0159abA
75	0,0008aB	0,0045bB	0,0050aB	0,0069aB	0,0169aA	0,0194aA
100	0,0006aC	0,0038bBC	0,0059aABC	0,0078aABC	0,0129aAB	0,0151abA
125	0,0046aA	0,0042bA	0,0053aA	0,0069aA	0,0125aA	0,0038cA
150	0,0004aD	0,0271aA	0,0049aD	0,0071aCD	0,0160aBC	0,0204aAB
<b>MSraízes (g)</b>						
0	0,0000aA	0,0009bA	0,0006aA	0,0010aA	0,0016aA	0,0031bcA
25	0,0002aB	0,0008bAB	0,0013aAB	0,0027aAB	0,0026aAB	0,0044bA
50	0,0002aB	0,0007bB	0,0008aB	0,0015aB	0,0026aB	0,0107aA
75	0,0003aB	0,0005bB	0,0005aB	0,0009aB	0,0026aAB	0,0047bA
100	0,0001aA	0,0003bA	0,0007aA	0,0010aA	0,0017aA	0,0035bcA
125	0,0001aA	0,0005bA	0,0007aA	0,0013aA	0,0015aA	0,0003cA
150	0,0000aB	0,0058aA	0,0005aB	0,0014aB	0,0028aAB	0,0037bcAB

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 1%. Letras minúsculas referem-se à comparação nas colunas (meio MS) e maiúsculas, à comparação nas linhas (sacarose).

A MSraízes (Quadro 2) apresentou a tendência de aumentar à medida que se elevaram os níveis de sacarose, mas não em relação aos níveis de MS, já que maiores massas secas foram observadas na concentração 50% do MS. Maior número de raízes foi obtido em meios com menor concentração de MS; no entanto, eram bastantes tenras. Ao contrário, meios com maior concentração do MS produziram menor número de raízes, porém com maior vigor, o que justifica a maior produção de massa nessas concentrações.

As concentrações de nitrogênio e sacarose testadas afetaram significativamente número e

tamanho dos brotos, número de folhas e massa seca da parte aérea e das raízes. O número de raízes não foi influenciado pela interação desses dois fatores, mas por cada um isoladamente - Quadro 5.

O número de brotos foi influenciado pelos diferentes tratamentos, porém a média de brotos formados por explante apresentou-se baixa. Em geral, as microestacas originaram entre um e dois brotos, correspondentes ao desenvolvimento das gemas. As concentrações de nitrogênio e sacarose apresentaram efeitos limitantes entre si, provavelmente em função da relação C:N.

Quadro 3. Número médio de brotos por explante obtido em meios com diferentes concentrações do meio MS e de sacarose. Lavras (MG), 1994

Número de brotos						
MS (%)						
0	25	50	75	100	125	150
0,98	1,09	1,38	1,06	0,99	0,94	1,03
Sacarose (%)						
0	0,75	1,50	3,0	6,0	12,0	-
1,07	1,07	1,00	1,00	1,00	0,94	-

Quadro 4. Número médio de raízes por explante obtidas em meios com diferentes concentrações do meio MS e níveis de sacarose. Lavras (MG), 1994

Número de raízes						
MS (%)						
0	25	50	75	100	125	150
2,26b	3,80a	3,74a	3,75a	3,26a	3,72a	3,09ab
Sacarose (%)						
0	0,75	1,50	3,0	6,0	12,0	-
0,65D	3,25C	3,56BC	4,29AB	4,68A	4,72A	-

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 1%.

Apesar de ocorrer a formação de brotos em meios sem nitrogênio, estes se apresentavam com pequeno tamanho, como se vê no quadro 6. O tamanho dos brotos formados foi incrementado até a concentração de 6% de sacarose, declinando após. Observou-se, também, a tendência de concentrações menores de nitrogênio serem efetivas para o crescimento dos brotos, quando combinadas com concentrações mais baixas de sacarose. Brotos de maior tamanho foram obtidos, utilizando-se 50% de nitrogênio e 3% de sacarose no meio de cultura ou em meios com 75 ou 100% de nitrogênio combinados com qualquer concentração de sacarose, com exceção de meios sem sacarose. Tais resultados confirmam as observações de Roest & Bokelmann (1975), que obtiveram boa formação de brotos em crisântemo cultivado em concentrações de nitrogênio próximas de 70%.

A ocorrência de brotos em microestacas cultivadas em meios sem nitrogênio pode ser atribuída a reservas do explante. No entanto, esses brotos não desenvolveram, por ser fator limitante a ausência do nutriente no meio de cultura, o que se pode verificar pelos parâmetros avaliados (tamanho dos brotos, número de folhas, MSpa).

O número de folhas formadas foi maior em meios com 3% de sacarose, declinando em concentrações maiores. Quanto ao efeito do nitrogênio, não se

observou diferença, à exceção dos explantes submetidos a meios sem esse nutriente (Quadro 6).

A matéria seca obtida da parte aérea apresentou maiores massas em meios com concentrações de nitrogênio entre 50 e 125% de nitrogênio. O quadro 6 mostra que os maiores valores para MSpa foram obtidos na concentração de 6%. As produções de matéria seca das raízes apresentaram valores baixos, devido ao pequeno número de raízes obtidas (Quadros 6 e 7). Os melhores resultados foram alcançados utilizando também 6% de sacarose, em meios com concentrações mais elevadas de nitrogênio.

O número de raízes - Quadro 7 - não foi influenciado pelas concentrações de nitrogênio, o que é justificado pela função desempenhada por esse nutriente. As concentrações de sacarose, ao contrário, proporcionaram diferenças no número de raízes formadas, sendo o melhor resultado obtido utilizando 6% de sacarose. Shibli et al. (1992) já haviam registrado a essencialidade do açúcar para a formação de raízes. May & Trigiano (1991) citam que não ocorre enraizamento em meios com concentrações inferiores a 9%. Os resultados deste experimento discordam desses autores, pois obteve-se melhor enraizamento em meios com 6% de sacarose, ocorrendo também enraizamento em concentrações menores, embora em menor intensidade. Em meios sem nitrogênio ou sacarose, a formação de raízes foi totalmente inibida.

Quadro 5. Resumo das análises da variância em função de concentrações de nitrogênio e de sacarose. Lavras (MG), 1994

Causas da variação	GL	Quadrados médios e significância					
		N.º brotos	Tam.brotos	N.º folhas	MSpa	N.º raízes	MSraízes
Nitrogênio	6	0,528571**	1,861752**	3,363027**	0,033344**	0,301900**	0,000006**
Sacarose	5	0,152467**	1,025805**	2,057818**	0,008272**	0,078223**	0,000001
Nitrogênio x sacarose	30	0,044309**	0,070362**	0,269569**	0,001438**	0,039029	0,000001*
Resíduo	126	0,012462	0,025014	0,077331	0,000418	0,026057	0,000000
CV (%)	-	8,02	9,91	13,92	2,71	6,99	0,12

\*\* Significativo ao nível de 1% e \* significativo ao nível de 5%.

Quadro 6. Número e tamanho dos brotos, número de folhas, massa seca da parte aérea e das raízes observados em meios com diferentes concentrações de sacarose e de nitrogênio. Lavras (MG), 1994

Nitrogênio	Sacarose (%)					
	0	0,75	1,50	3,0	6,0	12,0
%						
<b>Número de brotos</b>						
0	1,11aA	1,24aB	1,23aA	1,65aA	1,00aB	0,00bB
25	1,00bA	1,82aAB	1,65abA	2,00aA	1,32abAB	1,31abA
50	1,07bA	1,49abA	1,91aA	1,57abA	1,82abA	1,11bA
75	1,23bcA	2,43aA	1,90abA	1,73abcA	1,57bcAB	1,00cA
100	1,22abA	1,81aA	1,90aA	1,65abA	1,91aA	1,00bA
125	1,00bA	1,39abB	1,77aA	1,86aA	2,14aA	1,00bA
150	1,00bA	1,81aA	1,32abA	1,73abA	1,73abAB	1,00bA
<b>Tamanho dos brotos (mm)</b>						
0	3,0aA	3,2aB	2,8aC	7,3aB	2,3aB	0,0aC
25	2,5cA	20,3abA	19,6abAB	20,0abA	27,0aA	11,9bcAB
50	3,6cA	23,5abA	28,1abA	31,3aA	27,5abA	15,8bAB
75	3,8bA	16,5aA	19,7aAB	29,2aA	25,6aA	19,8aA
100	3,1bA	21,8aA	21,9aAB	28,4aA	28,5aA	16,7aAB
125	3,0bA	20,9aA	23,2aAB	28,7aA	25,2aA	6,9bBC
150	4,1dA	17,5abcA	14,2bcdB	28,7aA	25,3abA	7,9cdABC
<b>Número de folhas</b>						
0	4,32aA	4,14aB	4,07aB	4,90aB	3,46aA	0,00bB
25	3,22bA	9,22aAB	8,74aAB	8,40aB	7,65aA	5,23abA
50	5,17bA	9,96abA	9,78aB	18,84aA	7,54bA	6,31bA
75	4,46bA	8,04abAB	9,87aA	9,99aAB	7,62abA	5,40abA
100	3,87bA	9,73aA	10,13aA	10,33aAB	5,25abA	5,25abA
125	3,09bA	11,40aA	5,86abAB	10,36aAB	6,45abA	4,25bA
150	4,06bA	9,27aAB	8,11abAB	9,97aAB	6,85abA	4,17bA
<b>MSpa (g)</b>						
0	0,0016aA	0,0060aA	0,0047aB	0,0256aB	0,0066aB	0,0000aB
25	0,0008cA	0,0346bcA	0,0773abAB	0,0909abAB	0,1470aA	0,1093abA
50	0,0019dA	0,0375cdA	0,1041bcA	0,1156bA	0,2100aA	0,0753bcA
75	0,0039cA	0,0478bcA	0,0541bcAB	0,0999abAB	0,1709aA	0,0850bA
100	0,0024cA	0,0545bcA	0,0458bcAB	0,0900bAB	0,2042aA	0,0966bA
125	0,0020cA	0,0545bcA	0,0563bcAB	0,1115bA	0,2160aA	0,0393bcAB
150	0,0036cA	0,0466bcA	0,0326cAB	0,1123abA	0,1569aA	0,0362cAB
<b>MSraízes (g)</b>						
0	0,0000aA	0,0000aA	0,0000aA	0,0001aA	0,0000aB	0,0000aA
25	0,0000aA	0,0000aA	0,0000aA	0,0012aA	0,0000aB	0,0000aA
50	0,0000aA	0,0000aA	0,0001aA	0,0008aA	0,0028aAB	0,0000aA
75	0,0000aA	0,0000aA	0,0000aA	0,0001aA	0,0002aB	0,0019aA
100	0,0000bA	0,0000bA	0,0000bA	0,0001bA	0,0051aA	0,0000bA
125	0,0000aA	0,0000aA	0,0000aA	0,0009aA	0,0021aAB	0,0012aA
150	0,0000aA	0,0000aA	0,0000aA	0,0000aA	0,0001aB	0,0000aA

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 1%. Letras maiúsculas referem-se à comparação nas colunas (nitrogênio) e minúsculas, nas linhas (sacarose).



Quadro 7. Número médio de raízes por explante obtidas em meios com diferentes concentrações de nitrogênio e níveis de sacarose. Lavras (MG), 1994

Número de raízes						
Nitrogênio (%)						
0	25	50	75	100	125	150
0,00	0,11	0,71	0,45	0,56	0,37	0,11
Sacarose (%)						
0	0,75	1,50	3,0	6,0	12,0	-
0,00 b	0,00 b	0,12 b	0,62 ab	1,21 a	0,06 b	-

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 1%.

#### 4. CONCLUSÕES

1. É possível diminuir as concentrações do meio utilizado sem prejuízos para o processo de micropropagação.

2. Melhores resultados foram obtidos com meio de cultivo contendo 75% do MS, com 75% da concentração de nitrogênio e 6% de sacarose.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMED, H.A. & ANDREA, M. Effect of heat treatment on acceleration chrysanthemum multiplication by meristem-tip culture. *Acta Horticulturae*, Skierniewice, **212**:99-106, 1987.
- BHOJWANI, S.S. Plant tissue culture: applications and limitations. Amsterdam, Elsevier, 1990. 461p.
- CHONG, C. & PUA, E.C. Carbon nutrition of Ottawa three apple rootstocks during stages of in vitro propagation. *Journal of Horticultural Science*, Kent, **60**:285-290, 1985.
- CUELLO, J.L.; WALKER, P.N. & HEUSER, C.W. Controlled in vitro environment for stage II micropropagation of chrysanthemum. *Transactions of the ASAE*, St. Joseph, **35**(3):1079-1083, 1992.
- DEBERGH, P.C.A. Recent trends in the applications of tissue culture to ornamentals. In: GREEN, C.G.; SOMERS, D.A.; HACKETT, W.P. & BLESBOER, D.D. *Plant tissue and culture*. New York, A.R. Liss, 1990. p.383-393.
- DEBERGH, P.C.A. & READ, P.E. Micropropagation. In: DEBERGH, P.C.A. & ZIMMERMAN, R.H., eds. *Micropropagation - technology and application*. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, 1991. p.1-14.
- DO, C.B. & CORMIER, F. Accumulation of anthocyanins enhanced by a high osmotic potential in grape (*Vitis vinifera* L.) cell suspension. *Plant Cell Reports*, Berlin, **9**:143-146, 1990.
- DO, C.B. & CORMIER, F. Effects of high ammonium concentrations on growth and anthocyanin formation in grape (*Vitis vinifera* L.) cell suspension cultured in a production medium. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, Dordrecht, **27**:169-174, 1991a.
- DO, C.B. & CORMIER, F. Effects of low nitrate and high sugar concentration on anthocyanin content and composition on grape (*Vitis vinifera* L.) cell suspension. *Plant Cell Reports*, Berlin, **9**:500-504, 1991b.
- EARLE, E.D. & LANGHANS, R.W. Propagation of *Chrysanthemum* in vitro. II. Production, growth and flowering of plantlets from tissue cultures. *Journal of The American Society for Horticultural Science*, Alexandria, **99**(4):352-358, 1974.
- GEORGE, E.F. & SHERRINGTON, P.D. *Plant propagation by tissue culture - Handbook and directory of commercial laboratories*. Eversley, Exegetics, 1984. 593p.
- HOLDGATE, D.P. Propagation of ornamentals by tissue culture. In: REINERT, J. & BAJAJ, Y.P.S., eds. *Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture*. Berlin, Springer-Verlag, 1977. p.18-43.

- HORST, R.K. Chrysanthemum. In: AMMIRATO, P.V.; EVANS, D.A.; SHARP, W.R. & BAJAJ, Y.P.S., eds. *Handbook of plant cell culture - ornamental species*. New York, McGraw-Hill, 1990. v.5, p.319-336.
- JONES, L.H. Clonal propagation of plantation crops. In: ABBOT, A.J. & ATKIN, R.K. *Improving vegetatively propagated crops*. London, Academic Press, 1987. p.385-405.
- KARTHA, K.K.; PAHL, K.; LEUNG, N.L. & MROGINSKI, L.A. Plant regeneration from meristems of grain legumes: soybean, peanut, chickpea and bean. *Canadian Journal of Botany*, Ottawa, **59**:1671-1679, 1981.
- LANE, W.D. In vitro propagation of *Spirea bumalda* and *Prunus cistena* from shoot apices. *Canadian Journal of Plant Science*, Ottawa, **59**:1025-1029, 1979.
- LU, C.Y.; NUGENT, G. & WARDLEY, T. Efficient direct plant regeneration from stem segments of chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium* Ramat. cv. Royal Purple). *Plant Cell Reports*, Berlin, **8**:733-736, 1990.
- MAY, R.A. & TRIGIANO, R.N. Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaves of *Dendranthema grandiflora*. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, Alexandria, **116**(2):366-371, 1991.
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, **15**:473-497, 1962.
- PIERIK, R.L.M. *In vitro culture of higher plants*. Dordrecht, Martinus Nyhoff, 1987. 344p.
- PRASAD, R.N. & CHATURVEDI, C. Effect of season of collection of explants on micropropagation of *Chrysanthemum morifolium*. *Biologia Plantarum*, The Hague, **30** (1):20-24, 1988.
- ROEST, S. & BOKELMANN, G.S. Vegetative propagation of *Chrysanthemum morifolium* Ram. in vitro. *Scientia Horticulturae*, Amsterdam, **3**:317-330, 1975.
- SHIBLI, R.A.; SMITH, M.A.L. & SPOMER, L.A. Osmotic adjustment and growth responses of three *Chrysanthemum morifolium* Ramat. cultivars to osmotic stress induced in vitro. *Journal of Plant Nutrition*, Montcello, **15**(9):1373-1381, 1992.
- SKIRVIN, R.M. & CHU, M.C. In vitro propagation of 'Forever Yours' rose. *HortScience*, Wallingford, **14**:608-610, 1979.
- TAIZ, L. & ZEIGER, E. *Plant Physiology*. Redwood City, The Benjamin/Cummings, 1991. 559p.
- THORPE, T.A. & PATEL, K.R. Clonal propagation: adventitious buds. In: VASIL, I.K. *Cell culture and somatic cell genetics of plants - Laboratory procedures and their applications*. New York, Academic Press, 1984. v.1, p.49-60.
- WELANDER, T. Effect of nitrogen, sucrose, IAA and Kinetin on explants of *Beta vulgaris* growth in vitro. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, **36**:7-10, 1976.