TRATAMENTO DE PLANTAS MATRIZES DE *Chrysanthemum*
morifolium Ramat cv. “Bi Time” COM N, P, K⁺, Ca²⁺ E Mg²⁺ E
CALOGÊNESE
In Vitro

FÁBIO BORGATTO
Biólogo

Orientador: Prof. Dr. MURILO DE MELO

Dissertação apresentada à Escola Superior
de Agricultura “Luiz de Queiroz”,
Universidade de São Paulo, para a
obtenção do título de Mestre em Ciências,
Área de Concentração: Fisiologia e
Bioquímica de Plantas.

PIRACICABA
Estado de São Paulo – Brasil
Outubro – 2000

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - Campus "Luiz de Queiroz"/USP

Borgatto, Fábio

Tratamento de plantas matrizes de *Chrysanthemum morifolium* Ramat cv. "Bi Time" com N.P.K⁺, Ca²⁺ e Mg²⁺ e calogênese *in vitro* / Fábio Borgatto. - - Piracicaba, 2000.

61 p.

Dissertação (mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2000.
Bibliografia.

1. Calo embriogênico 2. Calogênese 3. Crescimento vegetal 4. Crisântemo 5.
Explante vegetal 6. Fisiologia vegetal 7. Nutrição mineral 8. Planta ornamental 9.
Propagação "in vitro" I. Título

CDD 635.93355

Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Murilo Melo pela orientação e oportunidade concedida.

À empresa SCHOENMAKER VAN ZANTEM AGRI, Holambra-SP, em especial ao Sr. Kees Bakker, pela cessão das mudas de crisântemo utilizadas neste experimento

Ao Prof. Dr. Ricardo Ferraz de Oliveira pelo apoio.

Ao Prof. Dr. Quirino Augusto de Camargo Carmello, pela elaboração da composição química das soluções nutritivas utilizadas neste trabalho.

Ao Prof. Dr. Carlos Tadeu dos Santos Dias, pelo auxílio na elaboração das análises estatísticas.

À Antônio Francisco de Campos Amaral, Técnico de Nível Superior do Depto. de Ciências Biológicas-CEBTEC, pelo apoio técnico na realização do trabalho.

Aos amigos Adriana K. Hayashi, Daniela Defávares, Hélio M. Kamida, Larissa A.C. Moraes, Nilton César Chopes, Paulo Celso M. Farias.

Ao amigo Alcides Junior em especial pela compreensão.

À amiga Telma K. Hayashi pelas dicas e amizade.

À amiga Elenice C. Conforto pelo apoio, incentivo e conselhos.

Aos meus pais e irmãos pelo apoio.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de estudos que permitiu a realização do Curso de Mestrado.

ÍNDICE

	Página
LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	ii
RESUMO	v
SUMMARY	vii
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO DE LITERATURA	04
2.1 O Crisântemo	04
2.2 Aspectos Econômicos	06
2.3 Cultura de Tecidos	08
2.4 Fatores que afetam a morfogênese <i>in vitro</i>	10
2.4.1 Genótipo	11
2.4.2 Meio de Cultura	12
2.4.3 Condições ambientais	13
2.4.4 Tipo de Explante	14
2.4.5 Manejo da Planta Matriz	16
3. MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1 Local	18
3.2 Obtenção das Mudas	18
3.3 Plantio das Mudas	18
3.4 Tratamento com solução nutritiva	19
3.5 Explantes	21
3.6 Assepsia	22
3.7 Inoculação	22
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
4.1 Nitrogênio	24
4.2 Fósforo	29
4.3 Potássio	33
4.4 Cálcio	37
4.5 Magnésio	41
5. CONCLUSÃO	44
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45
APÊNDICE	56

LISTA DE FIGURAS

	Página
1 Efeito do tratamento de matrizes de <i>Chrysanthemum morifolium</i> cv “Bi Time” com diferentes concentrações de nitrogênio em segmento caulinar.....	28
2 Efeito do tratamento de matrizes de <i>Chrysanthemum morifolium</i> cv “Bi Time” com diferentes concentrações de nitrogênio em segmento foliar.....	28
3 Efeito do tratamento de matrizes de <i>Chrysanthemum morifolium</i> cv “Bi Time” com diferentes concentrações de fósforo em segmento caulinar.....	32
4 Efeito do tratamento de matrizes de <i>Chrysanthemum morifolium</i> cv “Bi Time” com diferentes concentrações de fósforo em segmento foliar.....	32
5 Efeito do tratamento de matrizes de <i>Chrysanthemum morifolium</i> cv “Bi Time” com diferentes concentrações de potássio em segmento caulinar.....	36
6 Efeito do tratamento de matrizes de <i>Chrysanthemum morifolium</i> cv “Bi Time” com diferentes concentrações de potássio em segmento foliar.....	36
7 Efeito do tratamento de matrizes de <i>Chrysanthemum morifolium</i> cv	

“Bi Time” com diferentes concentrações de cálcio em segmento caulinar.....	40
8 Efeito do tratamento de matrizes de <i>Chrysanthemum morifolium</i> cv “Bi Time” com diferentes concentrações de cálcio em segmento foliar.....	40
9 Efeito do tratamento de matrizes de <i>Chrysanthemum morifolium</i> cv “Bi Time” com diferentes concentrações de magnésio em segmento caulinar.....	43
10 Efeito do tratamento de matrizes de <i>Chrysanthemum morifolium</i> cv “Bi Time” com diferentes concentrações de magnésio em segmento foliar.....	43

LISTA DE TABELAS

	Página
1 Composição química das soluções estoque empregadas no preparo de soluções nutritivas (mL.L ⁻¹) de SARRUGE (1975) empregadas no tratamento das plantas de <i>Chrysanthemum morifolium</i>	20
2 Composição em nutrientes das soluções nutritivas utilizadas nos tratamentos das plantas matrizes de <i>Chrysanthemum morifolium</i>	21
3 Sais e vitaminas componentes do meio de cultura básico de Murasghige e Skoog (1962) empregados na indução de calogênese em <i>Chrysanthemum morifolium</i>	23
4 Efeito do tratamento de matrizes de <i>Chrysanthemum morifolium</i> cv. “Bi Time” com diferentes concentrações de nitrogênio no peso da massa fresca dos calos formados a partir do explante caulinar.....	57
5 Efeito do tratamento de matrizes de <i>Chrysanthemum morifolium</i> cv. “Bi Time” com diferentes concentrações de nitrogênio no peso da massa fresca dos calos formados a partir do explante foliar.....	57
6 Efeito do tratamento de matrizes de <i>Chrysanthemum morifolium</i> cv. “Bi Time” com diferentes concentrações de fósforo no peso da massa fresca dos calos formados a partir do explante caulinar.....	58
7 Efeito do tratamento de matrizes de <i>Chrysanthemum morifolium</i> cv. “Bi Time” com diferentes concentrações de fósforo no peso da massa	

fresca dos calos formados a partir do explante foliar.....	58
8 Efeito do tratamento de matrizes de <i>Chrysanthemum morifolium</i> cv. “Bi Time” com diferentes concentrações de potássio no peso da massa fresca dos calos formados a partir do explante caulinar.....	59
9 Efeito do tratamento de matrizes de <i>Chrysanthemum morifolium</i> cv. “Bi Time” com diferentes concentrações de potássio no peso da massa fresca dos calos formados a partir do explante foliar.....	59
10 Efeito do tratamento de matrizes de <i>Chrysanthemum morifolium</i> cv. “Bi Time” com diferentes concentrações de cálcio no peso da massa fresca dos calos formados a partir do explante caulinar.....	60
11 Efeito do tratamento de matrizes de <i>Chrysanthemum morifolium</i> cv. “Bi Time” com diferentes concentrações de cálcio no peso da massa fresca dos calos formados a partir do explante foliar.....	60
12 Efeito do tratamento de matrizes de <i>Chrysanthemum morifolium</i> cv. “Bi Time” com diferentes concentrações de magnésio no peso da massa fresca dos calos formados a partir do explante caulinar.....	61
13 Efeito do tratamento de matrizes de <i>Chrysanthemum morifolium</i> cv. “Bi Time” com diferentes concentrações de magnésio no peso da massa fresca dos calos formados a partir do explante foliar.....	61

TRATAMENTO DE PLANTAS MATRIZES DE *Chrysanthemum morifolium* Ramat cv. “Bi Time” COM N, P, K⁺, Ca²⁺ E Mg²⁺ E
CALOGÊNESE
In Vitro

Autor: FÁBIO BORGATTO

Orientador: Prof. Dr. MURILO DE MELO

RESUMO

O presente trabalho teve por objetivo estudar o efeito do estado nutricional de plantas matrizes de *Chrysanthemum morifolium* Ramat cv “Bi Time”, na indução e crescimento de calos a partir de explantes caulinares e foliares.

Plantas de crisântemo foram cultivadas em vasos plásticos contendo areia lavada, e mantidas em casa de vegetação. Essas plantas foram submetidas a tratamentos com soluções nutritivas contendo diferentes níveis dos nutrientes nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio e magnésio. Decorridos 30, 45 e 60 dias após o início do tratamento com as soluções nutritivas, foram extraídos explantes de segmento caular e foliar, e inoculados em meio de cultura MS suplementado com 0,1 mg L⁻¹ Kin e 5,0 mg L⁻¹ NAA. As avaliações foram efetuadas 30 dias após a inoculação, com base no ganho de massa de matéria fresca dos calos formados.

Os dados obtidos mostraram que a produção de massa de matéria fresca de calos foi dependente dos níveis e da duração do tratamento com nitrogênio. Resultados similares foram obtidos com o nutriente fósforo, onde maiores e menores doses deste nutriente reduziram a calogênese. Nos experimentos com potássio verificou-se que a calogênese em explantes caulinares foi independente da duração do tratamento, porém foi dependente dos níveis de potássio, enquanto que para o explante foliar observou-se dependência dos níveis e da duração do tratamento. Os resultados obtidos com o cálcio demonstraram grande influência na calogênese *in vitro*, a qual foi inversamente proporcional à concentração e diretamente proporcional à duração do tratamento. A calogênese foi diretamente proporcional aos níveis de magnésio, e inversamente proporcional à duração do tratamento em explantes caulinares.

**TREATMENT OF *Chrysanthemum morifolium* Ramat cv “Bi Time”
WITH N, P, K⁺, Ca²⁺ AND Mg²⁺ AND CALOGENESIS *in vitro***

Author: FÁBIO BORGATTO

Adviser: Prof. Dr. MURILO DE MELO

SUMMARY

This work was aimed at investigating the effect of *Chrysanthemum morifolium* plants mineral nutrition on tissue explants callogênese induction and callus growth.

Chrysanthemum morifolium Ramat cv “Bi Time” plants were sandy grown in plastic pots maintained in greenhouse under 8/16 hour photoperiod and environmental temperature. These plants were treated with mineral nutritive solution containing different levels of nitrogen, phosphorus, potassium, calcium and magnesium for 60 days. Explants (leaves and shoots) were collected after 30, 45 and 60 days after mineral treatment started and inoculated on Murashige and Skoog growth medium supplemented with kinetin 0.1 mg.L⁻¹ and naphthalen acetic acid 5.0 mg.L⁻¹. Incubation conditions were 8/16 hours photoperiod and 26± 2° C temperature.

Evaluations based on callus fresh weight were carried out at 30 days after explants inoculation. The obtained results indicated the callogenesis induction and the callus cells growth to be nitrogen and potassium levels and

treatment duration dependent. Levels of Phosphorus higher or lower than that of complete nutritive solution caused reduced callogenese and callus growth. Callogenesis induction was great by calcium dependent, being inversely proportional to the calcium concentration and directly proportional to the treatment duration. Magnesium treatment affects callogenesis and cell growth positively, but the long duration calcium treatments reduced callogenesis on shoot explants.

1. INTRODUÇÃO

A espécie *Chrysanthemum morifolium* Ramat, atualmente denominada *Dendranthema grandiflora* (Anderson, 1987), pertence a família Asteraceae, anteriormente denominada Compositae (Salinger, 1991). O crisântemo é um híbrido complexo, e a sua popularidade ao longo da história de cultivo levou à introdução de milhares de cultivares, mostrando grande diversidade na forma das flores (Cockshull, 1985). Segundo Olivetti et al. (1994), o crisântemo é a principal flor de corte vendida no estado de São Paulo, sendo que seu cultivo predomina nos municípios próximos à cidade de São Paulo, sendo comercializados acima de 300 mil maços por ano.

O crisântemo pode ser eficientemente propagado de forma assexuada por meio de estacas caulinares (Halevy, 1985), mas neste caso a produção pode ser altamente afetada por inúmeras doenças causadas por vírus (Horst, 1989). Roest & Bokelmann (1975) destacaram a importância da micropropagação do crisântemo quando se necessita produzir mudas livres de vírus a partir de plantas infectadas. A cultura de meristemas é aplicada com grande sucesso para obter plantas livres de vírus, sendo a micropropagação através da cultura *in vitro* um meio de produção de crisântemo utilizada em larga escala (Bajaj et al., 1992). Alguns estudos demonstraram a eficiência da cultura de meristemas no processo de limpeza clonal (Adams, 1972; Betti, 1991).

As técnicas de micropropagação são bastante similares aos métodos tradicionais de propagação vegetativa usando estacas, porém com a evidente vantagem de produzir um número maior de plantas geneticamente idênticas (clones) em um espaço de tempo muito menor (Hutchinson et al., 1992).

Quando um explante é excisado da planta doadora e inoculado em meio de cultura apropriado, um dos eventos mais comuns é a formação de uma massa de células não diferenciadas, com proliferação contínua e desordenada, que é denominada de calo. A composição do meio de cultura exerce grande influência na indução e no desenvolvimento dos calos. O balanço hormonal e de nutrientes pode induzir a formação de zonas apresentando atividades meristemáticas nesta massa de calo, nas quais podem ocorrer divisões celulares com diversos padrões de diferenciação, que conduzem à regeneração de plantas intactas. A regeneração de plantas a partir de calos pode ser tanto através da organogênese (formação de órgãos) como da embriogênese somática (formação de embriões somáticos) (Handro e Floh, 1990).

Segundo Grattapaglia & Machado (1990), o sucesso de um sistema de micropropagação depende do controle de um grande número de variáveis. George & Sherrington (1984) afirmam que os fatores que afetam o crescimento e morfogênese *in vitro* podem ser: genótipo, meio de cultura, condições de cultivo e fatores do tecido. A maneira com que planta mãe (matriz) é cultivada influencia, de maneira bastante acentuada, o posterior desenvolvimento do explante *in vitro*.

Vários estudos foram realizados utilizando-se diferentes tipos de explantes no processo de regeneração *in vitro* de *Chrysanthemum morifolium* Ramat, incluindo gema apical (Ahmed & Andrea, 1987; Bem-Jaacov & Langhans, 1972; Earle & Langhans, 1974; Sangawan et al., 1987); segmentos caulinares e folhas (Battacharya et al., 1990; Kaul et al., 1990); e pétalas (Bush et al., 1976; Malaure et al., 1991; Khalid et al., 1989 e Roest & Bokelmann, 1975).

May & Trigiano (1991) estudaram a influência da luz e da concentração de sacarose na embriogênese somática em diferentes cultivares de *Chrysanthemum morifolium*. Também são frequentes os estudos que verificam o uso de pétalas como fonte de explantes para a obtenção de variantes somaclonais (Khalid et al., 1989; Malaure et al., 1991).

Alguns autores estudaram o efeito da composição do meio de cultura no crescimento de crisântemo, como o uso de diferentes fontes de nitrogênio (Marques, 1996); diferentes concentrações de carboidratos, nitrogênio e fitorreguladores (Roest & Bokelmann, 1975); e adição de surfactante (Khehra et al., 1995).

Entretanto, nenhum estudo envolvendo as características nutricionais de matrizes fornecedoras de explante no processo de cultivo *in vitro* de plantas pode ser encontrada na literatura. Assim no presente trabalho estão sendo relatados os resultados de investigação envolvendo a variação nutricional de matrizes de *Chrysanthemum morifolium* quanto aos níveis de N, P, K, Ca e Mg, sobre o processo de calogênese *in vitro*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O Crisântemo

O crisântemo é uma planta que tem sido cultivada há mais de 1400 anos na China, sendo atualmente uma das flores mais populares na América, Europa e Japão (Cockshull, 1985). Segundo o sistema de classificação de Cronquist, o crisântemo pertence à família Asteraceae, anteriormente classificada como Compositae (Silveira, 1998).

A espécie *Chrysanthemum morifolium* Ramat foi reclassificada como *Dendranthema grandiflora* Tzvelev (Anderson, 1987). Embora o segundo nome científico seja o correto, o primeiro ainda continua sendo bastante empregado.

O crisântemo é planta perene, herbácea, com folha simples e alternas; as flores se caracterizam por estarem sempre reunidas em capítulos, compostos na periferia por flores exclusivamente femininas, com corola alongada, designadas flores radiais, e internamente formado por uma série de pequenas flores distribuídas em círculos, com corola reduzida, abrigando os elementos femininos e masculinos, constituindo as chamadas flores do disco (Griffiths, 1987; Lorenzi e Souza, 1995). Portanto, o que é conhecido popularmente como “flor de crisântemo”, na verdade é uma inflorescência do tipo capítulo (Kofranek, 1980).

Segundo Horst (1983), o crisântemo apresenta o maior número de cultivares dentre todas as ornamentais cultivadas. Atualmente, existem mais de 1000 variedades conhecidas, e destas, aproximadamente 200 são cultivadas comercialmente (Langton, 1987). No estado de São Paulo são cultivadas mais de 60 variedades, das quais cerca de 1/3 são de tonalidade amarela (Arruda et al., 1996). Essa alta quantidade de cultivares relaciona-se com a complexa variabilidade da estrutura floral, além dos componentes genéticos hexaplóides.

A maioria das espécies do gênero *Chrysanthemum* exige dias curtos para o desenvolvimento das inflorescências. O ciclo vegetativo da planta inicia com o plantio das mudas, sendo o requerimento de luz ao longo do ciclo de no mínimo 16 horas por dia. Sob período de no máximo 11 horas de luz por dia ocorre a indução e desenvolvimento do botão floral. O conhecimento destes dados têm grande importância para a produção comercial pois a classificação das flores se dá em função do comprimento da haste, e esta depende do fotoperíodo. Mesmo durante o enraizamento, as plantas permanecem sob período de dias longos, o que as possibilitam que não sejam induzidas ao florescimento no momento indesejado (Miranda et al., 1994).

Devido ao processo de domesticação e cultivo da espécie, ao longo dos anos ocorreu o aparecimento de plantas com atrofia dos órgãos sexuais masculinos, havendo variedades que possuem a antera reduzida; algumas apresentam somente o filete, e outras não apresentam sequer vestígios da estrutura masculina (Dowrick, 1953). Desta forma, a propagação é feita preferencialmente por estacas, e quando propagado por sementes segrega facilmente (Kofranek, 1980). Entretanto, as plantas assim produzidas têm apresentado sérios problemas por infecções viróticas, ocasionando prejuízos aos viveiristas e produtores (May e Trigiano, 1991). A propagação por meio de cultura de tecidos é uma maneira de produzir plantas livres de patógenos e viroses (Ahmed & Andrea, 1987). Apesar da propagação *in vitro* de crisântemo ser

relativamente ainda cara, existe uma atenção especial para a produção de plantas matrizes sadias com o objetivo de melhorar a produção *in vivo* (Queralt et al., 1991). Segundo Betti (1991), a cultura de meristemas *in vitro* é ainda a maneira mais segura e eficiente de se obter mudas isentas de vírus.

2.2 Aspectos Econômicos

A floricultura no Brasil movimentava anualmente cerca de R\$ 1,5 bilhão; entretanto, a representatividade do setor junto à balança comercial é de apenas US\$ 13 milhões (Franco, 2000). Apesar da estrutura de produção e de comercialização, o consumo *per capita* é de apenas US\$ 4, enquanto em outros países vizinhos como a Argentina, o consumo chega aos US\$ 25; na Europa (que abrange 80% do comércio mundial), onde se encontram os padrões mais avançados de produção e comercialização, chega-se aos US\$ 135, e no Japão, onde as flores movimentam tantos dólares quanto as frutas, o consumo é de US\$ 180 *per capita*. A floricultura é um dos mercados que mais cresce no mundo, mas enfrenta dificuldades na produção interna pela exiguidade do clima e o custo do controle de temperatura das estufas (Almeida e Aki, 1995).

Esse baixo consumo de flores e plantas ornamentais no Brasil está associado à idéia de que tais produtos são supérfluos, e restritos às camadas de renda alta. Tal conceito é reflexo das políticas econômicas adotadas no passado, onde a prioridade era a oferta de alimentos e o controle da inflação, o que deixou de lado alternativas econômicas com potencial ainda não devidamente explorados na agricultura, como é o caso particular da floricultura. Percebe-se que o setor nem sempre é tratado com a devida relevância quando comparada com outras culturas; as estatísticas são escassas, pouco detalhadas e o apoio institucional é quase inexistente (Gatti, 1991). A flor no Brasil ainda é vista como artigo para

presente ou usada para decoração de festas, e infelizmente não é tida como um produto para consumo em massa (Franco, 2000).

Outro obstáculo é o reduzido número de pesquisas com flores no país; as que existem são voltadas principalmente para a nutrição de plantas. A maior parte da tecnologia empregada por floricultores nacionais é de origem estrangeira, principalmente holandesa e japonesa. A constante atualização e a preocupação de ampliar mercados com qualidade é fundamental para manter o setor produtivo nacional competitivo, como já acontece com as rosas produzidas na Colômbia e Equador, cuja durabilidade é pelo menos 50% maior que a das brasileiras (Franco, 2000).

O mercado de flores, mesmo com pouca expressividade nas estatísticas do governo, está entre os que apresentam no agronegócio o maior crescimento de oferta, em torno de 30% ao ano. O Brasil se beneficia do clima favorável e há dois anos a área de plantio totalizava 4500 hectares, sendo desse total 700 ha de produção em estufas (Franco, 2000).

O crisântemo ocupa lugar de destaque entre as plantas ornamentais e flores de corte cultivadas, sendo uma das principais espécies produzidas e comercializadas no mundo. Em 1991, chegou a ser o principal produto da floricultura do Estado de São Paulo, com quase 12 milhões de maços, o que corresponde a quase 30 milhões de dúzias (Olivetti et al., 1994). Nos últimos cinco anos, foi o terceiro produto mais vendido no Veiling-Holambra, sendo o primeiro e o segundo lugar ocupados pelas rosas e violetas, respectivamente (Van Rooyen & Opitz, 1997). No que se refere à produção de flores e folhagens para corte, da área cultivada de 436 ha, o crisântemo ocupa 45% do total (Arruda et al., 1996).

A produção nacional é voltada basicamente para o abastecimento do mercado interno, mas também é exportada para a Argentina como flor de corte, e para a Holanda em forma de mudas. Atualmente o setor de flores e plantas

ornamentais exibe crescimento médio de 30% ao ano, sendo o estado de São Paulo o maior produtor nacional, com aproximadamente 80% da produção (Pastores, 1994). Este potencial de crescimento elevado deve-se ao fato do país poder complementar a oferta de corte no inverno para os países de clima temperado como os Estados Unidos e países europeus, e mesmo no Japão para alguns tipos de flores e plantas (Matsunaga, 1995).

2.3 Cultura de Tecidos

A indústria da floricultura, talvez como nenhuma outra necessita rotineiramente responder às demandas contínuas do consumidor. Mudanças de preferências e moda resultam em pedidos crescentes de flores que apresentam características novas e incomuns. Desta forma, o objetivo maior do setor é a introdução de novas espécies e cultivares, e é exatamente dentro deste contexto que entram as pesquisas com a cultura de tecidos vegetais (Hutchinson et al., 1992).

As técnicas de cultura de tecido *in vitro* vêm expandindo as fronteiras na pesquisa básica com vegetais superiores, possibilitando sua aplicabilidade em diversas áreas, tais como o melhoramento genético de plantas, farmacologia, preservação de germoplasma, obtenção de culturas livres de doenças e micropropagação. Baseado no fenômeno da totipotência de células vegetais, a cultura de tecidos possibilita a regeneração de uma planta idêntica à planta mãe, a partir de células ou fragmentos de seus órgãos (clonagem).

O controle da morfogênese utilizando tecidos cultivados *in vitro* é feito através da introdução exógena de estímulos químicos e de substratos diversos, . A retirada de segmentos de tecidos de um organismo íntegro e sua transferência para meio de cultura contendo nutrientes e reguladores de crescimento apropriados, traz como consequência a liberação de suas células do controle a que

estavam submetidas nesse organismo e expondo-as a uma condição alterada, permite que o potencial de divisão celular possa expressar-se de novas formas, podendo levar à formação de novas estruturas organizadas, num processo morfogenético que ocorre *de novo* (Handro e Floh, 1990).

Atualmente são considerados 5 principais tipos de cultura de tecidos vegetais: (1) cultura de calos; (2) suspensões celulares; (3) cultura de órgãos e células gaméticas (embriões, óvulos e anteras); (4) cultura de meristemas e (5) cultura de protoplastos (Crócomo e Ochoa-Alejo, 1983).

Uma das respostas mais comuns induzida em um tecido cultivado *in vitro* é a formação de calo, que é caracterizado por uma massa de células não diferenciada, de proliferação contínua e desordenada. A partir das células de um calo pode ocorrer a formação de gemas que evoluem para formarem eixos caulinares. Quando a organogênese ocorre diretamente a partir das células do explante original, fala-se em organogênese direta; por outro lado, quando ocorre a partir de células de calo formado no explante, fala-se em organogênese indireta. Um outro processo de morfogênese é a embriogênese somática, onde a partir de células dos tecidos do explante ou de calos, organizam-se estruturas semelhantes aos embriões zigóticos. A embriogênese também pode ser um processo direto ou indireto (Handro e Floh, 1990).

A propagação clonal de plantas através das técnicas de cultura de tecidos, tem sido praticada em inúmeras herbáceas (Bhojwani, 1990). O uso da cultura de tecidos tem sido aplicada principalmente na produção de matrizes e propagação assexuada de plantas economicamente importantes (Jones, 1987; Bhojwani, 1990; Debergh, 1990).

Alguns autores (Jones, 1987; Bhojwani, 1990; Sagawa e Kunisak, 1990) citam como vantagens da multiplicação de plantas *in vitro*, incluindo entre elas o crisântemo: (1) a propagação rápida, facilitando a introdução de novas cultivares, (2) a possibilidade de produção de plantas livres de vírus e indexação do material

sucetível à viroses, (3) a facilidade no manuseio e transporte, (4) independência da sazonalidade, (5) necessidade de espaço físico reduzido para o cultivo, e (6) a utilização de reduzidas porções da planta para a produção em larga escala comercial.

Em avaliações de plantas de crisântemo propagadas *in vitro* e *in vivo*, foi constatado que o material propagado *in vitro* é mais precoce e homogêneo, apresentando expressiva superioridade na produção e qualidade das flores (Libiano e Witmer, 1987). Em estudos semelhantes efetuados com begônia, verificou-se novamente que as plantas propagadas *in vitro* eram fenotipicamente mais homogêneas.

2.4 Fatores que afetam a morfogênese *in vitro*

George & Sherrinton (1984) ressaltam que vários fatores podem afetar o processo de crescimento e morfogênese de uma cultura *in vitro*, os quais podem ser divididos em quatro grupos: (1) genótipo do material a ser cultivado; (2) substrato, representado pelos componentes do meio de cultura incluindo presença de fitorreguladores; (3) ambiente, que refere-se às condições físicas do local de crescimento; e (4) fatores do explante, que incluem a natureza física (idade e tipo) e as condições em que a planta matriz tenha sido cultivada. Murashige (1974) destaca que muitos fatores influenciam o comportamento do explante em cultura, os quais incluem (1) o órgão que funciona como fonte de explante, (2) a idade fisiológica e ontogenética do órgão, (3) a época ou estação do ano em que os explantes foram obtidos, (4) tamanho do explante, e (5) as características da planta das quais os explantes foram obtidos.

2.4.1 Genótipo

Grattapaglia & Machado (1990) afirmam que variabilidade na resposta morfogênética *in vitro* pode ocorrer não somente entre espécies do mesmo gênero, mas também entre genótipos da mesma espécie (diferentes cultivares ou clones). Esse fenômeno foi verificado em *Chrysanthemum morifolium*, quando Malaure et al. (1991), ao estudarem 16 cultivares, observaram que a habilidade de regeneração era dependente do cultivar; resultados semelhantes foram observados por Kaul et al. (1990). Mityushkina et al. (1995), estudaram 40 cultivares de crisântemo, e verificaram que 8 não apresentaram respostas de regeneração.

May & Trigiano (1991) verificaram que a habilidade de formar embriões somáticos morfológicamente maduros em crisântemo foi dependente do cultivar, onde apenas 12 dentre os 23 estudados, produziram embriões, embora apenas 5 cultivares tenham regenerado plantas a partir destes embriões.

Existem vários estudos mostrando que a embriogênese somática é altamente dependente do genótipo (Hanning & Conger, 1986; Parrot et al., 1989; Trigiano et al., 1989). Parrot et al. (1989) verificaram que a capacidade de regeneração em milho e trigo está sob controle genético, onde genes de cromossomos específicos estariam envolvidos nesse processo, os quais provavelmente controlariam a síntese de hormônios vegetais.

2.4.2 Meio de cultura

Vários estudos vêm sendo feitos com o objetivo de otimizar a micropropagação do crisântemo. Khehra et al. (1995) observaram que a suplementação do meio de cultura com o surfactante não iônico Pluronic F-68 favoreceu a organogênese, estimulando a formação da parte aérea. Alguns dos

efeitos puderam ser atribuídos ao aumento da permeabilidade da membrana para nutrientes e reguladores de crescimento, sugerindo que a suplementação do meio de cultura com este surfactante pode contribuir para a maximização dos resultados na micropropagação do crisântemo, bem como no processo de regeneração a partir de células. Oliveira et al. (1995) notaram bom desenvolvimento de segmentos nodais usando meio de cultura contendo 75% da concentração dos sais de Murashige e Skoog. Maior desenvolvimento da parte aérea e enraizamento foi obtido com o uso de uréia substituindo a fonte amoniacal de nitrogênio (Marques, 1996).

Estudos feitos com crisântemo por May e Trigiano (1991) mostraram que a concentração de sacarose no meio de cultura regulou as alterações no desenvolvimento do explante, sendo que em baixas concentrações (3% a 6%) ocorreu organogênese e em altas concentrações (12% a 18%), a embriogênese foi favorecida. Resultados semelhantes foram encontrados em estudos feitos com *Helianthus annuus* (Bronner et al., 1994).

Kaul et al. (1990) notaram que a taxa de regeneração de plantas utilizando folhas como explantes aumentou proporcionalmente com o aumento da concentração de ácido naftaleno-acético (ANA) no meio de cultura; e entretanto, quando se usou caule como explante, o número de brotos foi menor com 0,1 μM , alta com 1 μM e mostrou pouco aumento com 5 μM de ANA. Essas observações podem ser reflexo dos níveis endógenos de fitorreguladores presentes nos tecidos de folha e caule, o que pode influenciar a intensidade das respostas à uma aplicação exógena.

Bajaj et al. (1992) cultivaram diferentes explantes de crisântemo (segmento caular, folha, ápice, inflorescência e pedúnculo) em meio suplementado com 4 mg L^{-1} de ácido indolil-acético (AIA) e 2 mg L^{-1} de cinetina (Kin), e notaram a formação de raízes e calo em quase todos os explantes, sendo

que a formação de parte aérea ocorreu somente em explantes de gema apical e segmento de caule; por outro lado, quando cultivados em meio com 0,2 mg L⁻¹ AIA e 2 mg L⁻¹ Kin, nenhuma formação de raízes ocorreu, mas apenas a formação de calos verdes e compactos, sendo que a formação de parte aérea se restringiu aos explantes de gema apical, segmento caulinar e inflorescência.

2.4.3 Condições ambientais

Estudos relacionados às condições ambientais na morfogênese, como o realizado com embriogênese somática de crisântemo por May e Trigiano (1991), mostraram que a concentração de sacarose e o fotoperíodo desempenham papel importante na formação de embriões somáticos. A formação direta de embriões a partir de explantes de folhas foi observada quando estes foram cultivados em meio contendo 9% a 18% de sacarose, e incubados inicialmente no escuro por 28 dias, seguido por 10 dias na luz e então retornados para o escuro durante 14 dias. A embriogênese não ocorreu em condições contínuas de escuro, e foi reduzida drasticamente quando os explantes eram cultivados somente na luz.

Audran et al. (1994) comprovaram que a regeneração de plantas a partir de células em híbrido de *Cichorium* é dependente da temperatura, ocorrendo a indução de calos e organogênese entre 20° C e 25° C, enquanto que a 35° C a embriogênese somática é promovida; a 30° C, pode-se observar tanto organogênese quanto embriogênese.

Observações preliminares indicam que a frequência de regeneração de plantas em crisântemo pode ser melhorada pela manipulação do fotoperíodo e composição de hormônios no meio de cultura. A frequência de regeneração em culturas derivadas de folha e caule foi maior sob 14 horas de luz, quando comparada com condições contínuas de luz. Entretanto, a taxa de regeneração foi

afetada em ambas condições, quando o meio foi suplementado com doses altas de AIA, sozinho ou em combinação com citocinina (Rout & Das, 1997).

Em estudos feitos com tomate verificou-se que as mudanças ambientais que envolvem variações na luz, fotoperíodo e temperatura afetam o conteúdo interno de hormônios e consequentemente acabam alterando o crescimento dos explantes *in vitro*. Estudos semelhantes com *Petunia* indicaram que a qualidade da luz aumentou a regeneração em explantes de folhas, onde a porção vermelha do espectro apresentou os melhores resultados (Frett e Dirr, 1986).

2.4.4 Tipo de Explante

São vários os trabalhos de micropropagação de *Chrysanthemum morifolium* Ramat relacionados com a natureza física (tipo e tamanho) do explante, sendo que nos primeiros estudos o ápice meristemático foi o material mais utilizado (Bem-Jaacov & Langhans, 1972; Earle & Langhans, 1974), e posteriormente surgiram estudos com outros tipos de explante (Ahmed & Andrea, 1987; Bajaj et al., 1992; Bhattacharya et al., 1990; Kaul et al., 1990; Sangwan et al., 1987; Roest et al., 1975).

Khalide et al. (1989) observaram que explantes provenientes de pétalas de crisântemo originaram plantas que apresentaram variações mais acentuada na forma da flor, quando comparadas com as de explantes de folhas. Bush et al. (1976) encontraram resultados semelhantes, além de observarem que as plantas regeneradas a partir de culturas de pétalas apresentavam maiores anormalidades morfológicas, quando comparadas com aquelas regeneradas a partir de gema apical.

Kaul et al. (1990) utilizaram 3 tipos de explantes (folha, caule e pecíolo), e notaram que o pecíolo apresentou respostas pouco expressivas quando comparado

com os demais, e para alguns cultivares, o explante de caule mostrou-se claramente superior aos de folha no processo de regeneração.

Bajaj et al. (1997) inocularam diversos tipos de explantes de crisântemo cv “Fredyule”, e verificaram que o número de brotos produzido por explante foi maior para segmentos de inflorescência, quando comparado com segmento de caule, ápice, pedúnculo e folhas. Em relação ao tamanho, notaram que ápices com menos de 0,5 cm de comprimento formaram calos verdes e compactos, enquanto que explantes maiores que 1 cm resultaram na formação de plantas via organogênese. A vantagem no uso de explantes apicais menores reside no fato de terem menos chance de estarem contaminados por microorganismos; no entanto o potencial de regeneração é inferior aos ápices de maiores dimensões.

Em crisântemo, o estágio de desenvolvimento do explante influencia o processo de regeneração de maneira bastante clara, sendo que explantes provenientes de regiões mais próximas do ápice mostram-se mais competentes na formação de brotos, sendo que esta capacidade decresce conforme se afasta do ápice (Lu et al., 1990). Segundo Vasil (1988), o sucesso no estabelecimento de uma cultura embriogênica está na escolha criteriosa do explante, levando-se em consideração o estágio de desenvolvimento e as condições fisiológicas do mesmo. Alguns autores sugerem que a fragmentação ou a metilação do DNA podem ser responsáveis pela perda da competência em explantes mais velhos. Outros estudos sugerem que a presença de um gradiente de hormônios vegetais endógenos, como o ácido abscísico e o ácido indolilacético, seriam responsáveis por esta competência. Por outro lado, Rout & Das (1997) notaram que segmentos de folhas semi-maduras apresentaram um potencial de regeneração alto, quando comparado com segmentos de folhas imaturas, o que talvez resulte de um desbalanceamento hormonal causado pelo acúmulo endógeno de citocinina nos tecidos foliares.

2.4.5 Manejo da Planta Matriz

Nos últimos 30 anos, vários fatores que afetam o crescimento do explante *in vitro* tem sido amplamente estudados, incluindo fitorreguladores, luz, temperatura, pH, umidade, gases e presença de microrganismos; porém, estudos inerentes ao explante, em particular os relacionados com requerimentos nutricionais (nutrientes minerais, carboidratos, fitorreguladores endógenos, vitaminas e aminoácidos), tem sido pouco explorados (Leifert et al., 1995).

Segundo Grattapaglia & Machado (1990), o maior desafio da cultura de tecidos depende do controle da qualidade do material vegetal em si, e da manipulação deste antes de se isolar o explante final. Esta manipulação inclui o manejo cultural e ambiental da planta matriz, pois o estado nutricional, fisiológico e fitossanitário desta tem grande influência no posterior comportamento do explante e da cultura, sendo que a capacidade de crescimento e regeneração *in vitro* parece estar associada não apenas ao genótipo, mas também à atividade fisiológica e metabólica na planta matriz. Planta bem nutrida, sem sintomas de deficiência nutricional ou hídrica, em geral fornecem explantes de melhores qualidades. Bhojwani & Razdan (1983) destacaram que o estado fisiológico da planta matriz no momento da excisão do explante tem uma influência definitiva na resposta de crescimento, e que para minimizar as flutuações de respostas é recomendável manter as plantas parentais sob condições de casa de vegetação. Este procedimento permite não somente o controle e manipulação do fotoperíodo, intensidade luminosa e temperatura, mas também o controle do estado nutricional e fitossanitário (Grattapaglia & Machado, 1990).

Plantas matrizes de crisântemo devem ser mantidas sob dias longos (maior que 14,5 horas de luz), através da iluminação suplementar com lâmpadas

incandescentes, permanecendo assim sob estado vegetativo para a extração dos explantes (Kofranek, 1980).

Existe uma grande variedade de estudos relacionados com a microprogação do crisântemo; no entanto, ocorre carência de trabalhos que investiguem a influência da origem e características da planta matriz no posterior processo de morfogênese *in vitro*. Um aspecto importante que envolve a origem da planta matriz é o seu estado nutricional. Entretanto esse aspecto ainda não foi abordado nos estudos feitos com crisântemo.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local

Os experimentos foram realizados nos laboratórios do Departamento de Ciências Biológicas, Centro de Biotecnologia Agrícola (CEBTEC), campus da USP em Piracicaba.

3.2 Obtenção das Mudas

As mudas de *Chrysanthemum morifolium* Ramat cv “Bi Time”, foram doadas pela empresa SCHOENMAKER VAN ZANTEM AGRI, Holambra-SP.

3.3 Plantio das Mudas

As mudas de crisântemo com aproximadamente 5,0 cm de comprimento e em média com 6 folhas, foram plantadas para enraizamento em vasos plásticos com capacidade para 1,0 L, contendo areia de granulometria média devidamente lavada e mantidas em casa de vegetação a temperatura ambiente e fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas de escuro.

Durante as duas primeiras semanas após o plantio, as mudas foram irrigadas apenas com água, com o objetivo de amenizar o estresse da aclimação na casa de vegetação.

3.4 Tratamento com solução nutritiva

Após duas semanas do plantio iniciou-se o tratamento com solução nutritiva de SARRUGE (Lima et al., 1987), contendo 5 níveis diferentes dos nutrientes nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio e magnésio (Tabelas 1 e 2).

Cada nível dos diferentes nutrientes constituiu um tratamento, sendo que cada tratamento foi composto por 20 vasos, contendo 3 mudas de crisântemo cada, num total de 100 vasos, os quais foram distribuídos aleatoriamente no interior da casa de vegetação.

A irrigação das mudas com as soluções nutritivas foi realizada a cada dois dias (em média), aplicando-se 200 mL de solução nutritiva por vaso.

Tabela 1. Composição química das soluções estoque empregadas no preparo de soluções nutritivas (mL.L^{-1}) de SARRUGE (1975) empregadas no tratamento das plantas de *Chrysanthemum morifolium*.

Solução Estoque		Tratamentos					
		Completo	Omissão de N	Omissão de P	Omissão de K	Omissão de Ca	Omissão de Mg
KH_2PO_4	1M	1	1	-	-	1	1
KNO_3	1M	5	-	5	-	5	3
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	1M	5	-	5	5	-	4
MgSO_4	1M	2	2	2	2	2	-
KCl	1M	-	5	1	-	-	2
CaCl_2	1M	-	5	-	-	-	1
$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	1M	-	-	-	1	-	-
NH_4NO_3	1M	-	-	-	2	5	-
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1M	-	-	-	-	-	-
$\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$	1M	-	-	-	-	-	2
Micronutrientes*		1	1	1	1	1	1
Fe-EDTA		1	1	1	1	1	1

(M) Concentração da solução estoque (Molar = 1 mol L^{-1})

(*) A solução de micronutrientes tem a seguinte composição (g.L^{-1}): $\text{H}_3\text{BO}_3 = 2,86$; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} = 1,81$; $\text{ZnCl}_2 = 0,10$; $\text{CuCl}_2 = 0,04$; $\text{H}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O} = 0,02$

Tabela 2. Composição em nutrientes das soluções nutritivas utilizadas nos tratamentos das plantas matrizes de *Chrysanthemum morifolium*.

Nutrientes		Concentrações (mg.L ⁻¹)			
Nitrogênio (NH ₄ NO ₃) 0,5 M	0	52.5	105	210	420
Fósforo (KCl) 0,6 M	0	7.75	15.5	31	62
Potássio (CaCl ₂ .2H ₂ O) 0,5 M	0	58.5	117	234	468
Cálcio (CaCl ₂ .2H ₂ O) 0,5 M	0	50	100	200	400
Magnésio (MgCl ₂ .6H ₂ O) 0,2M	0	12	24	48	96

3.5 Explantes

Segmentos caulinares sem gemas (entre-nós) e segmentos foliares foram os explantes usados para a indução de calogênese. Para uniformizar os possíveis efeitos fenológicos da planta e do estado nutricional do tecido, os explantes foram extraídos de folhas maduras totalmente expandidas e o seu correspondente segmento internodal. Em crisântemo, esta folha corresponde a terceira folha a partir do ápice. O efeito tamanho do explante foi controlado através da uniformização, onde o segmento caulinar apresentava a 1,0 cm de comprimento e segmento de folha com 1,0 cm em diâmetro.

3.6 Assepsia

Periodicamente, as plantas matrizes de crisântemo foram tratadas com o fungicida sistêmico Benlat 500 ($0,7 \text{ g L}^{-1}$), via foliar e radicular, com o objetivo de controlar as fontes de contaminações do material a ser inoculado *in vitro*.

Os explantes (segmento caulinar e segmento foliar) devidamente pesados foram tratados em câmara de fluxo laminar, com solução de hipoclorito de sódio 3% contendo Tween-20 (0,1% v/v), durante 30 minutos sob agitação, e em seguida lavados por quatro vezes em água deionizada autoclavada.

3.7 Inoculação

Após a assepsia os explantes foram inoculados em vidros contendo 50 mL de meio de cultura sólido contendo os sais (Tabela 3) de Murashige e Skoog (1962), 3 % de sacarose, solidificado com $2,3 \text{ g L}^{-1}$ de phytigel, e pH ajustado para 5,8. As culturas foram mantidas em sala de crescimento a temperatura de $25 \pm 2^\circ \text{C}$, com intensidade luminosa 2000 lux e fotoperíodo de 16/8 horas (claro/escuro).

Para avaliar o efeito da duração dos tratamentos das plantas matrizes com diferentes níveis de nutrientes minerais na indução de calogênese, as inoculações foram feitas em três épocas distintas, sendo a primeira realizada 30 dias após o início do tratamento das plantas com as soluções nutritivas (Tratamento de curta duração); a segunda aos 45 dias (Tratamento de média duração), e a terceira aos 60 dias após o início do tratamento (Tratamento de longa duração). Os explantes foram inoculados em meio suplementado com $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ Kin e $5,0 \text{ mg L}^{-1}$ NAA, sendo que após 30 dias efetuou-se a avaliação do ganho de massa de matéria fresca dos calos formados, sendo realizadas 20 repetições para cada tipo de explante.

Tabela 3. Sais e vitaminas componentes do meio de cultura básico de Murashige e Skoog (1962) empregados na indução de calogênese em *Chrysanthemum morifolium*.

Componentes	Mg.L-1 de meio
NH_4NO_3	1650
KNO_3	1900
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370
KH_2PO_4	170
NaEDTA	37.3
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27.8
KI	0.83
H_3BO_3	6.30
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	16.9
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8.6
$\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.25
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025
$\text{CoCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.026
Tiamina	0.1
Piridoxina	0.5
Ác. Nicotínico	0.5
Inositol	100
Glicina	2

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Nitrogênio

Os sintomas de deficiência e toxidez tornaram-se evidentes no tratamento de longa duração (60 dias) das matrizes irrigadas com solução nutritiva contendo 0 mgL^{-1} e 420 mgL^{-1} de nitrogênio, respectivamente. As plantas deficientes em nitrogênio apresentaram clorose nas folhas velhas e redução no tamanho da planta. Os indícios da deficiência observados durante o experimento foram semelhantes aos descritos por Lima (1987) com plantas de crisântemo. Por outro lado a toxidez causada pelo excesso de nitrogênio determinou intensificação da coloração verde escuro e enrijecimento foliar.

O efeito do tratamento das plantas matrizes de crisântemo com soluções nutritivas contendo diferentes concentrações de nitrogênio na indução de calogênese ao longo de 60 dias é apresentado nas Figuras 1 (explante caulinar) e 2 (explante foliar). A produção de massa de matéria fresca de calo pelos explantes caulinar e foliar apresentou um perfil similar. Essa similaridade é provavelmente devido a translocabilidade alta do nitrogênio, proporcionando uma concentração de nitrogênio uniforme ao longo da planta.

Observa-se na Figura 1 que a indução e produção de massa de matéria fresca de calo em explante caulinar foi dependente dos níveis e da duração do tratamento com nitrogênio, sendo que a produção máxima de massa fresca de calos de 3,97g/explante ocorreu na dose de 52,5 mg.L⁻¹ de nitrogênio no tratamento de longa duração (60 dias) conforme o modelo de regressão quadrática $Y = 2,3887 + 0,0086X - 0,0005X^2$ ($R^2 = 0,3689$). Desta forma, parece evidente que as doses extremas de nitrogênio, que teoricamente representariam as doses responsáveis pela deficiência e toxidez, afetaram de maneira negativa a indução e o crescimento dos calos *in vitro*, principalmente nos tratamentos de longa duração. Os tratamentos de curta e média duração (30 e 45 dias) apresentaram valores da ordem de 50% mais baixos de ganho de matéria fresca de calos por explantes com relação ao tratamento de longa duração (60 dias), com uma ligeira vantagem para o tratamento de média duração (45 dias). A produção de calos nestes tratamentos não foram significativamente dependente da concentração de N.

Em relação ao explante foliar conforme a Figura 2, a produção de matéria fresca de calos também parece ser dependente dos níveis de nitrogênio e da duração do tratamento, principalmente o tratamento de longa duração (60 dias). O ganho de massa de matéria fresca de calo foi parecido com o do explante caulinar, onde o tratamento de longa duração mostrou-se superior aos demais, conforme a equação de regressão quadrática $Y = 1,187 - 0,0033X - 0,0000006X^2$ ($R^2 = 0,8999$), que indicou máxima produção de massa fresca de calos de 1,538 g/explante na concentração de 105 mg.L⁻¹ de nitrogênio. Para os tratamentos de curta e média duração (30 e 45 dias) a produção de matéria fresca de calos, embora ligeiramente dependente dos níveis de nitrogênio, apresentou baixa variação entre as diferentes concentrações de nitrogênio conforme as equações de regressão quadrática $Y = 0,6064 - 0,0006X - 0,002X^2$ ($R^2 = 0,9341$) e $Y = 0,3231 + 0,0018X - 0,0006X^2$ ($R^2 = 0,889$), com produção máxima de 0,662 e

0,603 g/explante nas concentrações 105 e 210 mg.L⁻¹ de nitrogênio respectivamente. O ganho de massa fresca de calos pelos explantes no tratamento contendo zero de nitrogênio na solução nutritiva foi superior aos tratamentos contendo nitrogênio. Esta alta calogênese provavelmente deve estar relacionado à reciclagem do nitrogênio, através da degradação de compostos nitrogenados e o posterior reaproveitamento deste nutriente na síntese de novas proteínas, tendo como custo o crescimento reduzido. A Ribulose bifosfato carboxilase/oxigenase (RUBISCO) imobiliza cerca de 30% do nitrogênio nas plantas C3. Como células de plantas *in vitro* crescem em meio de cultura contendo fonte de carbono exógena (sacarose), apresenta cloroplasto com baixo grau de estrutura. Contendo também baixa concentração de clorofila aparentemente não depende da eficiência fotossintética para seu crescimento. Isto fica evidente quando se leva em consideração que a atividade de Rubisco é de até 9000 (nove mil) vezes menor que a de folhas intactas, e a quantidade de clorofila é de até 300 (trezentos) vezes menor (Yamada et al., 1978). Estes contrastes com relação a quantidade de nitrogênio comprometido com a Rubisco e clorofila envolvendo planta intacta e células *in vitro* eventualmente favoreçam os eventos celulares dependentes de nitrogênio em células *in vitro* tornando-os satisfatórios mesmos em condições precárias de suprimento de nitrogênio.

A menor indução e crescimento de calos a partir de explantes extraídos de matrizes tratadas com baixos níveis de nitrogênio é reflexo das inúmeras funções essenciais desempenhadas por este nutriente no metabolismo celular. Entre elas destaca-se o fato de que 85% do N total está na forma de proteínas as quais podem ser estruturais, enzimas e de reserva. Além dessas moléculas, cerca de 10% do nitrogênio total está presente em moléculas como DNA e RNA (Mengel & Kirkby, 1987). Certamente baixos teores destes componentes contribuem para tornar as células do explantes mais quiescentes.

Alguns autores têm citado o fato de que o fornecimento de nitrogênio às plantas estimula o crescimento vegetativo, porém requer maior necessidade de energia e outros nutrientes, inclusive o potássio. O fornecimento de nitrogênio, somente mostrará eficiência máxima se as plantas fixarem eficientemente CO_2 e o reduzir a carboidratos e também forem supridas com quantidades adequadas de potássio, pois este participa do processo de absorção e redução do nitrogênio, bem como do processo de fixação de CO_2 e da oxidação de carboidratos que geram esqueleto carbono para assimilação da amônia (Lopes & Guilherme, 1990; Stromberger et. al., 1994). As enzimas que realizam a fixação do CO_2 são estimuladas pela presença do potássio em concentrações satisfatórias, e quando a relação potássio/nitrogênio (K/N) é tida como ótima a produção de carboidrato é normal. O excesso de nitrogênio proporciona acúmulo de amônia, a qual deve ser assimilada na forma de aminoácidos, uma vez que é tóxica em altas concentrações. Desta forma, se o carbono não for satisfatoriamente fixado na fotossíntese passa a ser quase todo consumido na assimilação da amônia via alfa-cetoglutarato formado no Ciclo de Krebs. Com isto, a velocidade da segunda parte do Ciclo de Krebs é reduzida levando à diminuição no nível de ATP e ácidos orgânicos (oxalacetato), e conseqüentemente o crescimento celular é retardado. Assim sendo, o aumento excessivo no fornecimento de N deve ser acompanhado do aumento no nível de K fornecido. Esse aumento concomitante tem o objetivo de produzir esqueleto carbônico suficiente para o bom funcionamento do Ciclo de Krebs e sincronia com a assimilação da amônia sem afetar o estado energético celular. Este fenômeno pode contribuir para a explicação do fato de que os explantes provenientes de matrizes tratadas com altas doses de nitrogênio acumularam menores quantidades de massa fresca de calos.

Figura 1. Efeito do tratamento de matrizes de *Chrysanthemum morifolium* cv “Bi Time” com diferentes concentrações de **nitrogênio** em segmento **caulinar**.

$$30 \text{ dias: } y = 1,0529 - 0,0019x - 0,006x^2 \quad (R^2 = 0,8242)$$

$$45 \text{ dias: } y = 0,9287 + 0,0038x - 0,05x^2 \quad (R^2 = 0,9129)$$

$$60 \text{ dias: } y = 2,3887 + 0,0086x - 0,0005x^2 \quad (R^2 = 0,3689)$$

Figura 2. Efeito do tratamento de matrizes de *Chrysanthemum morifolium* cv “Bi Time” com diferentes concentrações de **nitrogênio** em segmento **foliar**.

$$30 \text{ dias: } y = 0,6064 - 0,0006x - 0,002x^2 \quad (R^2 = 0,9341)$$

$$45 \text{ dias: } y = 0,3231 + 0,0018x - 0,0006x^2 \quad (R^2 = 0,889)$$

$$60 \text{ dias: } y = 1,187 + 0,0033x - 0,0000006x^2 \quad (R^2 = 0,8999)$$

4.2 Fósforo

As matrizes de crisântemo iniciaram a apresentar os sintomas típicos de deficiência no tratamento com solução nutritiva contendo zero mg.L^{-1} de fósforo aos 45 dias após o início do tratamento das plantas com as soluções nutritivas. A característica desta deficiência foi a diminuição da coloração verde das folhas velhas, acompanhada de uma expressiva redução no crescimento. Essas descrições dos sintomas visuais da deficiência do fósforo em crisântemo são concordantes com as observadas experimentalmente por diferentes autores, como Fernandes et al. (1975) e Lima (1987).

O efeito do tratamento das plantas matrizes de crisântemo com soluções nutritivas contendo diferentes concentrações de fósforo na indução de calogênese (massa de matéria fresca de calos) ao longo de 60 dias é apresentado nas Figuras 3(explantes caulinar) e 4 (explante foliar). A calogênese foi ligeiramente mais intensa nos explantes caulinares, sendo os perfis das curvas de resposta para tratamentos com diferentes níveis de fósforo em função da duração destes tratamentos bastante similares para os dois explantes utilizados. A calogênese foi sempre proporcional a concentração de fósforo na solução nutritiva e maior no tratamento por 45 dias. A calogênese aos 30 e 60 dias foi semelhante para os dois explantes.

A indução e produção de massa de matéria fresca de calo em explante caulinar e foliar mostrou ser significativamente dependente dos níveis de fósforo para todos os períodos de duração dos tratamentos testados. Os tratamentos de curta (30 dias), média (45 dias) e longa duração (60 dias) responderam respectivamente de acordo com os modelos de equação de regressão quadrática $Y = 0,624 + 0,0147X - 0,0002X^2$ ($R^2 = 0,935$); $Y = 0,8987 + 0,0216X - 0,0004X^2$ ($R^2 = 0,619$) e $Y = 0,7294 + 0,0093X - 0,0002X^2$ ($R^2 = 0,5698$), para explantes caulinares. Para os explantes foliares, os tratamentos de curta, média e longa

duração responderam respectivamente de acordo com os seguintes modelos de equação de regressão quadrática $Y = 0,5354 + 0,0089X - 0,0001X^2$ ($R^2 = 0,4007$); $Y = 0,5386 + 0,0163X - 0,0001X^2$ ($R^2 = 0,9929$) e $Y = 0,4395 + 0,0093X - 0,0001X^2$ ($R^2 = 0,6098$). A produção máxima de massa fresca de calos de 1,31g/explante ocorreu na dose de 31 mg.L⁻¹ de fósforo e 1,0 g/explante na dose de 62 mg.L⁻¹ de fósforo no tratamento de média duração (45 dias) para os explantes caulinar e foliar respectivamente. Tanto níveis mais baixos como mais altos do que 30 mg.L⁻¹ para o explante caulinar afetaram negativamente a calogênese ao longo do tratamento.

O efeito das diferentes concentrações de fósforo na produção de massa de matéria fresca de calos em explantes caulinar e foliar mostraram ser significativamente dependente da duração do tratamento apenas nos tratamentos de média duração (45 dias), onde a massa fresca de calos obtida foi maior quando comparada aos demais tratamentos (30 e 60 dias).

O alto requerimento de fósforo inorgânico pelos produtos intermediários fosforilados da via de fixação e redução do CO₂, biossíntese de sacarose e da oxidação de carboidratos pode estar relacionado com a menor indução e crescimento de calos a partir do explante caulinar procedentes de matrizes tratadas com solução nutritiva contendo baixos níveis de fósforo. Em condições de luz a fixação de CO₂ é conseguida com uma concentração de fósforo na faixa de 2,0-2,5 mM, mas a fotossíntese é drasticamente reduzida quando a concentração de fósforo alcança a faixa de 1,4-1,0 mM. Também a participação do fósforo como elemento estrutural de moléculas como os fosfolípidios, DNA e RNA, além da sua função na conservação e transferência de energia podem ter contribuído para a menor indução da calogênese e menor crescimento dos calos. Quando a concentração do fósforo atinge valores ainda mais baixos (menos de 0,2 mM) o nível de esteres fosfatos ricos em energia diminui cerca de 30% do nível original (Marschner, 1995). A manutenção de um “pool” de fosfato

inorgânico no citoplasma é necessário para a síntese de sacarose via triose fosfato. Se esta concentração de fosfato inorgânico foi limitante ocorrerá não só inibição das vias de fixação e redução do CO_2 , bem como na síntese e desequilíbrio na relação fonte/dreno de sacarose.

As curvas obtidas no gráfico da figura 3 aproximam-se da típica curva de crescimentoXaplicação de nutrientes descrita por Marschener (1995). Esta curva apresenta um primeiro momento onde a taxa de crescimento aumenta conforme a aplicação do nutriente, o que representa a faixa quando o nível do nutriente é limitante; em uma segunda etapa a taxa de crescimento atinge um máximo e permanece constante, e corresponde à aplicação de quantidades adequadas do nutriente; e finalmente numa terceira fase, a taxa de crescimento é afetado com aumento de aplicação do nutriente, correspondendo à faixa de concentração tóxica do nutriente, ou a partir de quando a concentração de outros nutrientes passar a ser limitante.

Figura 3. Efeito do tratamento de matrizes de *Chrysanthemum morifolium* cv "Bi Time" com diferentes concentrações de fósforo em segmento **caulinar**.

$$30 \text{ dias: } Y = 0,624 + 0,0147x - 0,0002x^2 \quad (R^2 = 0,935)$$

$$45 \text{ dias: } Y = 0,8987 + 0,0216x - 0,0004x^2 \quad (R^2 = 0,619)$$

$$60 \text{ dias: } Y = 0,7294 + 0,0093x - 0,0002x^2 \quad (R^2 = 0,5698)$$

Figura 4. Efeito do tratamento de matrizes de *Chrysanthemum morifolium* cv "Bi Time" com diferentes concentrações de fósforo em segmento **foliar**.

$$30 \text{ dias: } Y = 0,5354 + 0,0089x - 0,0001x^2 \quad (R^2 = 0,4007)$$

$$45 \text{ dias: } Y = 0,5386 + 0,0163x - 0,0001x^2 \quad (R^2 = 0,9929)$$

$$60 \text{ dias: } Y = 0,4395 + 0,0093x - 0,0001x^2 \quad (R^2 = 0,6098)$$

4.3 Potássio

As plantas matrizes de crisântemo tratadas com soluções nutritivas contendo diversos níveis de potássio iniciaram a apresentar os primeiros sintomas visuais de deficiência aos 45 dias após o início do tratamento com soluções contendo 0 mg.L^{-1} de potássio. Essa deficiência foi caracterizada por clorose seguida de necrose nas pontas e margens das folhas velhas. Esses sintomas de deficiência foram bastante semelhantes aos estudos feitos com crisântemo por Lima (1987).

O efeito do tratamento das plantas matrizes de crisântemo com diferentes concentrações de potássio na indução de calogênese (massa de matéria fresca de calos ao longo de 60 dias) é ilustrado nas Figuras 5 (explante caulinar) e 6 (explante foliar).

Nos resultados da Figura 5 observa-se que a calogênese (produção de massa de matéria fresca de calos) pelo explante caulinar não foi significativamente ($p < 0,05$) dependente da duração do tratamento (30, 45 e 60 dias), e somente foi ligeiramente influenciada pelos níveis de potássio na solução nutritiva, onde a produção de massa fresca de calos foi diretamente proporcional ao aumento da concentração de potássio.

Os resultados obtidos para o explante folha (Figura 6) mostram que a maior indução de calogênese e produção de matéria fresca de calos ocorreu no tratamento de curta duração (30 dias) segundo o modelo de regressão quadrática $Y = 0,2475 - 0,0005X - 0,0000000007X^2$ ($R^2 = 0,9012$).

Nos tratamentos de média e longa duração (30 e 45 dias), a calogênese foi inversamente proporcional ao níveis de potássio na solução nutritiva, conforme as equações de regressão quadrática $Y = 0,1942 - 0,000005X - 0,007X^2$ ($R^2 = 0,9979$) e $Y = 0,1522 - 0,0002X - 0,007X^2$ ($R^2 = 0,9166$) respectivamente. Estes resultados também podem ser interpretados de acordo com Marschner (1995),

segundo o qual, a diminuição da produção pode estar associada não apenas com a toxidez imposta por um nutriente, mas como a deficiência iniduzida por um outro nutriente devido ao desbalanço iônico entre os nutrientes. Neste caso altas concentrações de potássio possivelmente poderiam ter interferido na absorção e disponibilidade fisiológica de cálcio e magnésio.

A uniformidade na indução e ganho de massa de matéria fresca de calos no tratamento de curta duração (30 dias) para o explante caulinar, pode ser resultado do fato dos explantes ainda estarem sob o efeito dos nutrientes aplicados durante a produção das mudas de crisântemo, ou pelas raízes não estarem totalmente desenvolvidas. Além disto, esta uniformidade tanto para níveis de potássio como para duração do tratamento pode ser sim devido a translocabilidade do K, mantendo em qualquer condição concentração constante no caule. Segundo Mengel & Kirkby (1987), a extrema mobilidade do potássio pela planta inteira em consequência da permeabilidade da membrana propicia o transporte do K em direção as folhas mais jovens e a redistribuição do potássio das partes mais maduras da planta para as mais jovens.

Por outro lado, a baixa indução e crescimento de calos em explantes caulinares nas doses menores de potássio deve ser atribuída às inúmeras funções desempenhadas por este elemento. Segundo Marschner (1995) em plantas deficientes em potássio ocorre acúmulo de carboidratos e compostos nitrogenados solúveis, tais como amidas, aminoácidos, amônia, nitrato, além de certas aminas como putrescina, agmatina, N-carbamil-putrescina, decorrentes da maior absorção do nitrogênio, magnésio e cálcio. Essas mudanças no metabolismo de carboidratos estão relacionadas ao alto requerimento de K^+ por certas enzimas regulatórias que catalizam a transferencia do grupo fosfato, como a piruvato kinase e fosfofrutokinase, que regulam o fluxo de intermediários metabólicos da glicose a piruvato.

O potássio é ativador de muitas enzimas envolvidas na fotossíntese, onde o papel deste nutriente na fixação do CO_2 pode ser demonstrado mais claramente em cloroplastos isolados. O aumento na concentração externa, para níveis semelhantes ao do citosol de células intactas estimula a fixação de CO_2 mais de três vezes. O potássio em associação com ânions orgânicos e inorgânicos, é o principal soluto necessário no vacúolo para a expansão celular (Marschner, 1995). Segundo Leigh & WYN Jones (1984), quando a concentração de potássio no tecido vegetal é baixa, a concentração de potássio no vacúolo da célula pode ficar abaixo de seu nível crítico, causando diminuição de sua concentração no citosol, resultando na redução dos processos metabólicos dependentes de K^+ , e consequentemente reduzindo o crescimento celular.

Como o potássio está envolvido em inúmeros passos no processo de tradução, incluindo a ligação do tRNA ao ribossomo, o baixo ganho de massa de matéria fresca de calo também devem estar relacionado com o baixo teor de proteínas acumuladas nestas células. Além disso o K^+ também influencia a fotossíntese, tanto no contrabalanceamento do bombeamento de prótons para o interior dos tilacóides, como na etapa de fixação do CO_2 , onde aumentos na concentração de K^+ na ordem de 100 mM acima do normal estimula a fixação do CO_2 , o que concorre para maior crescimento celular.

Figura 5. Efeito do tratamento de matrizes de *Chrysanthemum morifolium* cv “Bi Time” com diferentes concentrações de potássio em segmento caulinar.

$$30 \text{ dias: } y = 0,7674 + 0,0001x - 0,007x^2 \quad (R^2 = 0,2454)$$

$$45 \text{ dias: } y = 0,6577 + 0,0009x - 0,06x^2 \quad (R^2 = 0,8402)$$

$$60 \text{ dias: } y = 0,6131 + 0,0005x - 0,000007x^2 \quad (R^2 = 0,9376)$$

Figura 6. Efeito do tratamento de matrizes de *Chrysanthemum morifolium* cv “Bi Time” com diferentes concentrações de potássio em segmento foliar.

$$30 \text{ dias: } y = 0,2475 - 0,0005x - 0,0000000007x^2 \quad (R^2 = 0,9012)$$

$$45 \text{ dias: } y = 0,1942 - 0,000005x - 0,007x^2 \quad (R^2 = 0,9979)$$

$$60 \text{ dias: } y = 0,1522 - 0,0002x - 0,007x^2 \quad (R^2 = 0,9166)$$

4.4 Cálcio

Nenhum sintoma visível de deficiência ou toxidez de cálcio puderam ser observados para os tratamentos das plantas matrizes de crisântemo com soluções nutritivas contendo os diferentes níveis de cálcio e durante o período de tratamento testados.

Os resultados para o efeito do tratamento de matrizes de crisântemos com diferentes níveis de cálcio na calogênese mostrados nas Figuras 7 (explante caulinar) e 8 (explante foliar) revelam perfis similares de produção de calos para os dois explantes, tanto em função da concentração de cálcio como em função da duração dos tratamentos embora duas vezes mais calogênese tenha ocorrido no explante foliar. No tratamento de curta duração (30 dias), onde ocorreu a maior indução de calogênese, observa-se que o ganho de matéria fresca de calos seguiu a linha de tendência polinomial e inversamente proporcional aos níveis de cálcio na solução nutritiva para ambos explantes, caulinar e foliar. As equações representando a produção de calos em função dos níveis de cálcio para caule e folha foram $Y = 1,3418 - 0,0024X - 0,000006X^2$ ($R^2 = 0,4907$) e $Y = 1,9876 - 0,0032X - 0,000000006X^2$ ($R^2 = 0,2999$), onde o menor ganho de massa de matéria fresca de calos foram 0,976 e 1,488 g/explante nas doses 100 e 50 mg.L⁻¹ de cálcio respectivamente. Concentrações de cálcio maiores ou menores que estas afetaram positivamente a calogênese no tratamento com cálcio por 30 dias.

No tratamento de média duração (45 dias), para o explante caulinar, não ocorreram diferenças estatísticas significativas ao nível de 5% de probabilidade entre as médias de matéria fresca de calos para os tratamentos com diferentes níveis de cálcio. Entretanto no tratamento com 60 dias as doses intermediárias de cálcio aplicadas às plantas matrizes de crisântemo na casa de vegetação

permitiram que os explantes caulinar e foliar provenientes destas plantas produzissem massa de calos ligeiramente superiores aos demais níveis de cálcio.

Um aspecto a ser discutido foi o efeito da duração do tratamento na produção de calos em explantes caulinar e foliar. Tratamentos de longa duração (60 dias) mostraram ganho de massa de matéria fresca da ordem de 70% menor comparado com os tratamentos de 30 e 45 dias para ambos os explantes.

Os resultados encontrados no presente estudo são concordantes com os obtidos por Frett & Dirr (1986), que avaliaram o efeito do tratamento de planta matrizes de *Petunia x híbrida* com diferentes doses de cálcio na calogênese *in vitro*. Os mesmos autores argumentam que o aumento de massa de matéria fresca de calo na ausência de cálcio, deve ser devido ao decréscimo na lignificação da parede celular em tecidos deficientes de cálcio, o que viria facilitar a iniciação e o crescimento de calos *in vitro*.

A baixa produção de calos nas doses elevadas de cálcio pode ser provavelmente devido a toxidez causada por este nutriente. Segundo Hepler & Wayne (1985) o cálcio em níveis elevados pode atuar como uma citotoxina, uma vez que pode reagir com fosfato inorgânico formando um precipitado insolúvel, afetando portanto a disponibilidade de fósforo e ainda competir com o magnésio pelos sítios de ligação. Desta forma o metabolismo dependente de energia baseada em fosfato pode ser severamente inibida, prejudicando o crescimento das células. O crescimento de calos também pode ser prejudicado em presença de altos níveis de cálcio, resultante do efeito inibitório deste elemento sobre enzimas, além de inibir a absorção de magnésio, que está relacionado com a síntese protéica e ativação de enzimas importantes na regulação dos processos de crescimento celular (Marchner, 1995).

Por outro lado o aumento na produção de calos em explantes foliares no tratamento de curta duração (30 dias) poderia ser entendido através do mecanismo que envolve a auxina e o cálcio como mensageiro secundário. Neste

caso a auxina liga-se a receptores específicos existentes na membrana da parede celular, e como consequência mensagens serão traduzidas e amplificadas induzindo a abertura de canais de cálcio na membrana o que acarreta o influxo deste elemento para o interior da célula. Ao mesmo tempo ocorre a liberação de fosfolipídios da membrana celular, os quais irão permitir a liberação de cálcio armazenado no vacúolo e no retículo endoplasmático. Uma vez aumentada a concentração de cálcio no interior da célula, este irá se ligar a proteínas específicas de ligação ao cálcio (Calmodulina), formando um complexo denominado Ca-Calmodulina. Esse complexo Ca-Calmodulina, e o próprio cálcio livre do citoplasma, estimulam enzimas Kinases que por sua vez fosforilam outras enzimas. Como consequência ocorrem respostas fisiológicas do tipo bombeamento de prótons H^+ para fora da célula e a síntese de celulose, que no final levam ao aumento da expansão celular (Guern, 1987; Marschner, 1995).

Figura 7. Efeito do tratamento de matrizes de *Chrysanthemum morifolium* cv “Bi Time” com diferentes concentrações de cálcio em segmento **caulinar**.

$$30 \text{ dias: } y = 1,3418 - 0,0024x - 0,000006x^2 \quad (R^2 = 0,4907)$$

$$45 \text{ dias: } y = 1,0822 - 0,0001x - 0,00000007x^2 \quad (R^2 = 0,314)$$

$$60 \text{ dias: } y = 0,6349 + 0,0012x - 0,0006x^2 \quad (R^2 = 0,2769)$$

Figura 8. Efeito do tratamento de matrizes de *Chrysanthemum morifolium* cv “Bi Time” com diferentes concentrações de cálcio em segmento **foliar**.

$$30 \text{ dias: } y = 1,9876 - 0,0032x - 0,000000006x^2 \quad (R^2 = 0,2999)$$

$$45 \text{ dias: } y = 1,4798 - 0,0014x - 0,0006x^2 \quad (R^2 = 0,4722)$$

$$60 \text{ dias: } y = 1,2397 - 0,000000005x - 0,00000007x^2 \quad (R^2 = 0,4865)$$

4.5 Magnésio

As plantas matrizes de crisântemo não apresentaram os sintomas característicos de deficiência ou toxidez durante o tratamento com as soluções nutritivas contendo as diferentes concentrações de magnésio testados.

Os resultados para o efeito do tratamento de plantas de crisântemo com diferentes níveis de magnésio na calogênese são apresentados nas figuras 9 (explante caulinar) e 10 (explante foliar). Os resultados indicam efeito dos níveis de magnésio na solução nutritiva, bem como da duração do tratamento na indução e crescimento dos calos pelo explante caulinar e nenhum efeito para o foliar. Soluções nutritivas com níveis crescentes de magnésio induzem calogênese crescente nos explantes caulinares independente da duração dos tratamentos, sendo esta tendência mais pronunciada para os tratamentos de curta (30 dias) e longa (60 dias) duração, sendo a calogênese maior aos 60 dias. Os resultados para estes tratamentos podem ser respectivamente representados pelos modelos de equações quadráticas $Y = 0,55 + 0,0031 - 0,000006 X^2$ ($R^2 = 0,3931$) e $Y = 0,6944 + 0,0007X - 0,00005X^2$ ($R^2 = 0,8998$), onde a máxima calogênese ocorreu com níveis de magnésio de 96 mg.L^{-1} para 30 e 60 dias de tratamento.

A indução e crescimento dos calos pelos explantes foliares foi bastante semelhante tanto para os diferentes níveis de magnésio como para as diferentes durações do tratamento com soluções nutritivas.

Os resultados obtidos com o explante caulinar são diferentes daqueles observados por Defávári (2000) que trabalhando com calogênese em *Bauhinia forficata*, observou relação inversamente proporcional entre o ganho de massa de matéria fresca de calos e aumento nos níveis de magnésio na solução nutritiva fornecida às plantas matrizes doadoras dos explantes. Porém, os estudos feitos por He et al. (1989), relatam menor calogênese em trigo quando a concentração de magnésio no meio de cultura foi reduzida, indicando maior exigência de

magnésio para proporcionar produção de calo elevada. Entretanto essas comparações tem efeito apenas especulativo pois espécies distantes de plantas foram estudadas e certamente suas exigências para magnésio são bastante diferentes.

Embora o magnésio seja facilmente translocável, a sua função como constituinte da clorofila é certamente aquela que viria a causar prejuízos mais relevantes ao crescimento das plantas contendo baixos níveis deste nutriente. Estas plantas por desenvolverem menos fotossíntese acumulariam menos material celular. Devido esta limitação na fonte de esqueleto carbônico o metabolismo celular (principalmente o do nitrogênio) seria consideravelmente afetado causando portanto desbalanço na relação C/N celular. A participação essencial do magnésio nas reações de transferencia de fosfato, principalmente as da glicólise e ciclo das pentoses durante a oxidação de carboidratos, é sem dúvida a que afeta mais drasticamente o desenvolvimento das plantas e tem consequência similar aquela de constituinte da clorofila que é a insuficiência no metabolismo do carbono. Ambos casos acima afetam também a eficiência nutricional dos nutrientes nitrogênio e fósforo. Também a participação do magnésio na estabilização das subunidades dos ribossomos e consequentemente na eficiência de síntese de proteína, em condições de deficiência deste nutriente comprometeria o metabolismo do carbono e do nitrogênio, resultando certamente em redução de ganho de matéria fresca e de crescimento. Este fenômeno foi demonstrado em estudos realizados por Defávári (2000), onde os explantes provenientes de plantas matrizes de *Bauhinia forficata* tratadas com baixos níveis de magnésio, produziram calos com teores de proteínas reduzidos.

A possível substituição do magnésio pelo manganês em reações enzimáticas que requer magnésio e a alta translocabilidade, ou até mesmo a baixa exigência com magnésio pelo crisântemo, podem ter tornado o efeito do tratamento com magnésio na calogênese pelo explante foliar menos relevante.

Figura 9. Efeito do tratamento de matrizes de *Chrysanthemum morifolium* cv “Bi Time” com diferentes concentrações de **magnésio** em segmento **caulinar**.

$$30 \text{ dias: } y = 0,55 + 0,0031x - 0,000006x^2 \quad (R^2 = 0,3931)$$

$$45 \text{ dias: } y = 0,3975 + 0,0023x - 0,005x^2 \quad (R^2 = 0,9279)$$

$$60 \text{ dias: } y = 0,6944 + 0,0007x - 0,00005x^2 \quad (R^2 = 0,8998)$$

Figura 10. Efeito do tratamento de matrizes de *Chrysanthemum morifolium* cv “Bi Time” com diferentes concentrações de **magnésio** em segmento **foliar**.

$$30 \text{ dias: } y = 0,921 + 0,0004x - 0,0006x^2 \quad (R^2 = 0,4635)$$

$$45 \text{ dias: } y = 0,9192 + 0,0013x - 0,05x^2 \quad (R^2 = 0,5849)$$

$$60 \text{ dias: } y = 0,9283 - 0,0007x - 0,0000006x^2 \quad (R^2 = 0,5655)$$

5. CONCLUSÕES

Nas condições em que os experimentos foram realizados concluiu-se que:

A calogênese em *Chrysanthemum morifolium* foi afetada pelo estado nutricional em nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio e magnésio das plantas matrizes fornecedoras dos explantes.

A produção de massa de matéria fresca de calos foi dependente dos níveis e da duração do tratamento com nitrogênio, fósforo e potássio.

O efeito do cálcio na produção de calos mostrou ser inversamente proporcional à concentração e diretamente proporcional à duração do tratamento com este nutriente.

O magnésio apresentou um perfil inverso ao ocorrido com o cálcio.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, A.B. Na improved medium for strawberry meristem culture. **Journal of Horticultural Science**, v. 47, p.263-264, 1972.
- AHMED, H.A.; ANDREA, M. Effect of reat treatment on acceleration chrysanthemum multiplication by meristem-tip culture. **Acta Horticulturae**, v.212, p.99-106, 1987.
- ALMEIDA, F.R.F.; AKI, A.Y. Grande crescimento no mercado das flores. **Agroanalysis**, p.8-11, set, 1995.
- ANDERSON, N.O. Reclassifications of the genus Chrysanthemum L. **HortScience**, v.22, p.313, 1987.
- ARRUDA, S.T.; OLIVETTE, M.P.; CASTRO, C.E.F. Diagnóstico da floricultura do estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v.2, n.2, p.1-18, 1996.
- AUDRAN, J.C.; DECOUT, E.; DUBOIS, T.; GUEDIRA, M.; VASSEUR, J. Role of temperature as a triggering signal for oragnogenesis or somatic embryogenesis in wounded leaves of chicory cultured in vitro. **Journal of Experimental Botany**, v.45, n.281, p.1859-1865, Dec. 1994.

- BAJAJ, Y.P.S.; SIDHU, M.M.S.; GILL, A.P.S. Micropropagation of Chrysanthemum. In: BAJAJ, Y.P.S. (Ed). **High-Tech and micropropagation IV**. Berlin: Springer-Verlag, 1992. cap.5, p.69-79. (Biotechnology in Agriculture and Forestry, 20).
- BEN-JAACOV, J.; LANGHANS, R.W. Rapid multiplication of chrysanthemum plants by stem-tip proliferation. **HortScience**, v.7, p.287-290. 1972.
- BETTI, J.A. Obtenção de material propagativo vegetal testado livre de vírus. In: CROCOMO, O.J.; SHARP, W.R.; MELO, M. (Ed). **Biotecnologia para produção vegetal**. Piracicaba: CEBTEC/FEALQ, 1991, p.145-170.
- BHATTACHARYA, P.; DEY, S.; DAS, N.; BHATTACHARYYA, B.C. Rapid mass propagation of *Chrysanthemum morifolium* by callus derived from stem and leaf explants. **Plant Cell Reports**, v.9, p.439-442, 1990.
- BHOJWANI, S.S. **Plant tissue culture: applications and limitations**. Amsterdam: Elsevier, 1990. 461p.
- BHOJWANI, S.S.; RAZDAN, M.K. **Plant tissue culture: theory and practice**. Amsterdam: Elsevier, 1983. 502p. (Developments in Crop Science, 5)
- BRONNER, R.; JEANNIN, G.; HAHNE, G. Early cellular events during organogenesis and somatic embryogenesis induced on immature zygotic embryos of sunflower (*Helianthus annuus*). **Canadian Journal of Experimental Botany**, v.72, p.239-248, 1994.

- BUSH, S.R.; EARLE, E.D.; LANGHANS, R.W. Plantlets from petal segments, petal epidermis, and shoot tips of the periclinal chimera, *Chrysanthemum morifolium* "Indianapolis". **American Journal of Botany**, v.63, n.6, p.729-737, 1976.
- COCKSHULL, K. *Chrysanthemum morifolium*. In: HALEVY, A.H. **CRC handbook of flowering**. Boca Raton: CRC Press, 1985. v.2, p.238-257.
- 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.
- DEFÁVARI, D. Efeito do estado nutricional em Ca^{+} , Mg^{2+} e K^{+} de matrizes de *Bauhinia forficata* Link na calogênese in vitro. Piracicaba, 2000. 72p. Dissertação (M.S.) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- DEMATTE, M.E.S.P.; HAAG, H.P.; VASQUES, L.H. Nutrição mineral de plantas ornamentais. XI Deficiências de N, P, Ca, Mg, S e B em crisântemo (*Chrysanthemum morifolium* CV Golden Polaris). **Anais da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"**, v.54, 1987.
- DOWRICK, G.J. The cromossomes of *Chrysanthemum* II. Garden varieties. **Heredity**, v.7, p.59-72, 1953.
- DUBOIS, L.A.M.; ROGGEMANS, J.; SOYEURT, G.; VRIES, D.P. Comparison of the growth and development of dwarf rose cultivars propagated in vitro

and in vivo by softwood cuttings. **Scientia Horticulturae**, v.35. p.293-299, 1988.

EARLE, E.D.; LANGHANS, R.W. Propagation of *Chrysanthemum in vitro*. I. Multiple plantlets from shoot tips and the establishment of tissue cultures. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.99, n.2, p.128-132. 1974.

FRANCO, A. O comércio que floresce. **Panorama Rural**, n.11, p.21-25. 2000.

FRETT, J.J.; DIRR, M.A. Effect of nitrogen and calcium stock plant nutrition on PETUNIA X HIBRIDA leaf and anther explant growth in vitro. **Scientia Horticulturae**, v.28, p.289-298, 1986.

GATTI, E.U. A evolução recente do comércio de produtos da floricultura no Brasil. **Agricultura em São Paulo**, v.38, n.3, p.101-117, 1991.

GEORGE, E.F.; SHERRINGTON, P.D. **Plant propagation by tissue culture: handbook and directory of commercial laboratories**. Eversley: Exegetics, 1984. 693p.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP; EMBRAPA, CNPH, 1990. p.99-169.

GRIFFITHS, M. **Index of garden plants: the new royal horticultural society dictionary**. 4ed. London: Macmillan, 1987. 123p.

GUERN, J. Regulation from within: The Hormone Dilemma. **Annals of Botany**, v.60, p.75-102, 1987. Supplement, 4.

HALEVY, A.H. **CRC handbook of flowering**. Boca Raton: CRC Press, 1985, v.2. 526p.

HANDRO, W.; FLOH, E. I. S. Aspectos básicos do controle da morfogênese *in vitro*. In TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP; EMBRAPA, CNPH, 1990. p.99-169.

HANNING, G.E.; CONGER, B.V. Factors influencing somatic embryogenesis from cultured leaf segments of *Dactylis glomerata*. **Journal of Plant Physiology**, v.123, p.23-29, 1986.

HE, D.G.; YANG, Y.M.; SCOTT, K.J. The effect of macroelements in the induction of embryogenic callus from immature embryos of wheat (*Triticum aestivum* L.). **Plant Science**, v.64, n.2, p.251-258, 1989.

HEPLER, P.K.; WAYNE, R.O. Calcium and plant development. **Annual Review of Plant Physiology**, v.36, p.394-298, 1986,

HORST, R.K. Chrysanthemum. In: AMMIRATO, P.V.; EVANS, D.A.; SHARP, W.R.; BAJAJ, Y.P.S. (Ed.) **Handbook of plant cell culture: ornamental species**. New York: McGraw-Hill, 1983. cap. 13, p.319-337.

HUTCHINSON, J.F.; KAUL, V.; MAHESWARAN, G.; MORAN, J.R.; GRAHAM, M.W.; RICHARDS, D. Genetic improvement of floricultural

- crops using biotechnology. **Australian Journal of Botany**, v.40, p.765-787, 1992.
- 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.
- KALLAK, H.; REIDLA, M.; HILPUS, I.; VIRUMAE, K. Effects of genotype, explant source and growth regulators on organogenesis in carnation callus. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.51, p.127-135. 1997.
- KARKI, A. Generation of genetic variability by the chrysanthemum tissue culture method. In: PRASAD, B.N.; GHIMIRE, G.P.S.; AGRAWAL, V.P. **Role of biotechnolgy in agriculture**. Lebanon: Science Publishers, 1992. cap. 11, p.109-114.
- KAUL., V.; MILLER, R.M.; HUTCHINSON, J.F.; RICHARDS, D. Shoot regeneration from stem and leaf explants of *Dendranthema grandiflora* Tzvelev (syn. *Chrysanthemum morifolium* Ramat.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.21, p.21-30. 1990.
- KAWAMURA, M.Y.; SALVADOR, E.D.; PASQUAL, M. Efeito de dormex e BAP na propagação “in vitro” de crisântemo (*Dendranthema grandiflora* Tzevelev). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS, 10^o, Campinas, 1995. p.32.

- KHALID, N.; DAVEY, M.R.; POWER, J. Na assessment of somaclonal variation in *Chrysanthemum morifolium*: the generation of plants of potencial commercial value. **Scientia Horticulturae**, v.38, p.287-294. 1989.
- KHEHRA, M.; LOWE, K.C.; DAVEY, M.R.; POWER, J.B. An improved micropropagation system for *Chrysanthemum* based on Pluronic F-68 supplemented media. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.41, p.87-90. 1995.
- KOFRANEK, A.M. *Chrysanthemum*. In: LARSON, R.A. (ed.) **Introductory floriculture**. New York: Academic Press, 1980. p-5-45.
- LANGTON, F.A. Breeding for improved ornamental plants. In: ABBOT, A.J.; ATKIN, R.K. **Improving vegetatively propagated crops**. London: Academic Press, 1987. p.159-180.
- LEIFERT, O.; MURPHY, K.P.; LUMSDEN, P.J. Mineral and carbohydrate nutrition of plant cell and tissue cultures. **Critical Review in Plant Sciences**, v.14, n.2, p.83-109, 1995.
- LIBIANIO, 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, 6º, Campinas, 1987. p.77.
- LITZ, R. E. Organogenesis and somatic embryogenesis. **Acta Horticulturae**, v.336, p.199-205, 1993.

- LOPES, A.S.; GUILHERME, L.R.G. **Uso eficiente de fertilizantes:** aspectos agronômicos. São Paulo: ANDA, 1990. 60p. (Boletim Técnico 4).
- LORENZI, H.; SOUZA, H.M. **Plantas ornamentais do Brasil:** arbustivas, herbáceas e trepadeiras. São Paulo: Plantarum, 1995, 1995. P.283.
- LU, C.; NUGENT, G.; WARDLEY, T. Efficient, direct plant regeneration from stem segments of chrysanthemum. **Plant Cell Reports**, v.8, p.733-736, 1990.
- MALAURE, D.A.; BARCLAY, G.; POWER, J.B.; DAVEY, M.R. The production of novel plants from florets of *Chrysanthemum morifolium* using tissue culture. 1. Shoot regeneration from ray florets and somaclonal variation exhibited by the regenerated plants. **Journal of Plant Physiology**, v.139, p.8-13, 1991.
- MARQUES, D.A. Influência de fitorreguladores e de fontes de nitrogênio na morfogênese *in vitro* de *Chrusanthemum morifolium* (Ramat) Tzvelev cv. Amarelo São Paulo. Piracicaba, 1996. 90p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.
- MARSCHNER, H. **Mineral Nutrition os Higher Plants**. 2 ed. New York: Academic Press, 1995. 889p.
- MATSUNAGA, M. Potencial da agricultura brasileira. **Agroanalysis**, v.15, n.9, p.56, 1995,

- MAY, R.A.; TRIGIANO, R.N. Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaves of *Dendranthema grandiflora*. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.116, n.2, p.366-371, 1991.
- McCOWN, B.H. Adventitious rooting of tissue cultured plants. In: DAVIS, T.D.; HAISSIG, B.E.; SANKHLA, N. **Adventitious root formation in cuttings**. Portland: Dioscorides Press, 1988. p.289-302.
- MIRANDA, M.C.; MATSUNAGA, M.; OKUYAMA, M.G.H. Sistema de cultivo e custo operacional de produção de crisântemos. **Agricultura em São Paulo**, v.41, n.1, p.103-24, 1994.
- MITYUSHKINA, T.Y.; DOLGOV, S.V. Regeneration from leaf disks of *Chrysanthemum morifolium* Ramat. **Acta Horticulturae**, v.420, p.112-114. 1995.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays for tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.437-497. 1962.
- OLIVEIRA, P.D. Propagação *in vitro* de crisântemo (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev.) cv. ORANGE REAGEN. Lavras, 1994. 97p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura de Lavras.
- OLIVETTI, M.P.A.; TAKAES, M.; MATSUNAGA, M. Perfil da produção das principais flores de corte no estado de São Paulo. **Informações Econômicas**, v.24, n.7, p.31-54, jul, 1994.

- PARROT, W.A.; WILLIAMS, E.G.; HILDEBRAND, D.F.; COLLINS, G.B.
Effect of genotype on somatic embryogenesis from immature cotyledons of soybean. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.42, p.125-132, 1985.
- PIMENTEL, M. O comercio que floresce. **Panorama rural**, n.11, p.21-25, jan. 2000.
- QUERALT, M.C.; BERUTO, M.; VANDERSCHAEGHE, A.; DEBERGH, P.C.
Ornamentals. In: DEBERGH, M.C.; ZIMMERMAN, R.H. ed.
Micropropagation: technology and application. Dordrecht: Kluwer Academic, 1991. p.215-230.
- ROEST, S.; BOKELMANN, G.S. Vegetative propagation of *Chrysanthemum morifolium* Ramat. *in vitro*. **Scientia Horticulturae**, v.3, p.317-330. 1975.
- ROOYEN, S.R.V.; OPTIZ, R. Veiling – Leilão eletrônico de flores da Holambra. **Preços Agrícolas**, v.11, n.5, p.24-26, maio. 1997.
- ROUT, G.R.; DAS, P. Recent trends in the biotechnology of *Chrysanthemum*: a critical review. **Scientia Horticulturae**, v.69, p.239-257. 1997.
- SAGAWA, Y.; KUNISAKI, J.T. Micropropagation of floriculture crops. In: AMMIRATO, P.V.; EVANS, D.A.; SHARP, W.R.; BAJAJ, Y.P.S., (Ed.) **Handbook of plant cell culture: ornamental species**, 1990. cap.3, p.25-26.
- SALINGER, J.P. **Producción comercial de flores**. Zaragoza: Acribia, 1991. 371p.

- SANGWAN, R.S.; DETREZ, C.; SANGWAN-NORREEL, B.S. In vitro culture of shoot-tip meristems in some higher plants. **Acta Horticulturae**, n.212, p.661-663, 1987.
- SILVEIRA, R.B.A. Avaliação da qualidade de crisântemos (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) produzidos em diferentes regiões do estado de São Paulo. Piracicaba, 1998. 114p. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.
- STROMBERGER, J.A.; TAI, C.Y.; HUBER, D.M. Interactions of potassium with nitrogen and their influence on growth and yield potential in maize. **Journal of Plant Nutrition**, v.12, n.1, p.19-37. 1994.
- TRIGIANO, R.N.; BESTY, R.M.; DIETRICH, J.T. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration in *Cornus florida*. **Plant Cell Reporter**, v.8, p.270-273, 1989.
- VAN ROOYEN, S.; OPITZ, R. Veiling – Leilão Eletrônico de Flores da Holambra. **Preços Agrícolas**, v.11, n.5, p.24-26, 1997.
- VASIL, I.K. Progress in the regeneration and genetic manipulation of cereal crops. **Bio/Technology**, v.6, p.397-402, 1988.

- BAJAJ, Y.P.S.; SIDHU, M.M.S.; GILL, A.P.S. Micropropagação of *Chrysanthemum*. In: BAJAJ, Y.P.S. (Ed). **High-Tech and micropropagation IV**. Berlin: Springer-Verlag, 1992. Cap.5, p.69-80. (Biotechnology in Agriculture Forestry, 20).
- CROCOMO, O.J.; OCHOA-ALEJO, N. The technology of genetic characters transfer "in vivo". In: Proc. COSTED Symp. On Tissue Culture of Economically Important Plants. Singapore (Ed. A.N.Rao). COSTED and Asian Network for Biological Sciences – ANBS, 1981, p.250-258.
- FERNANDES, P.D.; OLIVEIRA, G.D.; HAAG, H.P. Nutrição mineral de plantas ornamentais VIII – Absorção e deficiências de nutrientes pelo *Chrysanthemum morifolium* L. c. Suzuki. **Anais da ESALQ**, v.32, p. 471-492, 1975.
- HEPLER, P.K.; WAYNE, R.O. Calcium and plant development. **Annual Review of Plant Physiology**, v.36, p.397-439, 1985.
- LEIGH, R.A.; WYN JONES, R.G. A hypothesis relating critical potassium concentrations for growth to the distribution and function of this ion in the plant cell. **New Phytologist**, v.97, p.1-3, 1984.
- LIMA, A.M.L.P.; HAAG, H.P. Nutrição mineral de plantas ornamentais XII. Deficiência de N, P, Ca, Mg, S e B em crisântemo (*Chrysanthemum morifolium* cv Golden Polaris). **Anais da ESALQ**, v.44, p.1001-1023, 1987.
- MENGEL, K.; KIRKBY, E.A. **Principles of plant nutrition**. 4 ed. Bern: International Potash Institute, 1987. 655p.
- SARRUGE, J.R. Soluções nutritivas. **Summa Phytopatologica**, v.1, n.3, p.231-233, 1975.

APÊNDICE

Tabela 4. Efeito do tratamento de matrizes de *Chrysanthemum morifolium* cv. “Bi Time” com diferentes concentrações de nitrogênio no peso da massa fresca dos calos formados a partir do explante caulinar coletados em 3 diferentes épocas (30, 45 e 60 dias após o início do tratamento com solução nutritivas).

Tratamentos (mg.L ⁻¹ de nitrogênio)	Duração do tratamento (dias)		
	30	45	60
0	1.006 a	0.871 b	1.479 a
52.5	0.944 ab	1.207 ab	3.927 b
105	1.017 a	1.196 ab	3.414 b
210	0.617 b	1.279 a	2.254 c
420	0.552 b	0.824 b	1.610 d

C.V. = 47.89

Médias seguidas de mesma letra minúscula (colunas) não diferem entre si pelo teste t ao nível de 0,05 de probabilidade.

Tabela 5. Efeito do tratamento de matrizes de *Chrysanthemum morifolium* cv. “Bi Time” com diferentes concentrações de nitrogênio no peso da massa fresca dos calos formados a partir do explante foliar coletados em 3 diferentes épocas (30, 45 e 60 dias após o início do tratamento com solução nutritivas).

Tratamentos (mg.L ⁻¹ de nitrogênio)	Duração do tratamento (dias)		
	30	45	60
0	0.586 a	0.394 a	1.179 a
52.5	0.648 b	0.409 a	1.289 b
105	0.662 b	0.557 b	1.538 c
210	0.600 a	0.603 c	1.435 c
420	0.450 c	0.540 b	1.035 a

C.V. = 27.61

Médias seguidas de mesma letra minúscula (colunas) não diferem entre si pelo teste t ao nível de 0,05 de probabilidade.

Tabela 6. Efeito do tratamento de matrizes de *Chrysanthemum morifolium* cv. “Bi Time” com diferentes concentrações de fósforo no peso da massa fresca dos calos formados a partir do explante caulinar coletados em 3 diferentes épocas (30, 45 e 60 dias após o início do tratamento com solução nutritivas).

Tratamentos (mg.L ⁻¹ de fósforo)	Duração do tratamento (dias)		
	30	45	60
0	0.596 b	0.808 c	0.783 ab
7.75	0.763 ab	1.090 b	0.754 ab
15.5	0.800 ab	1.311 a	0.759 ab
31	0.830 a	1.086 b	0.938 a
62	0.629 b	0.902 bc	0.677 b

C.V. = 23.969

Médias seguidas de mesma letra minúscula (colunas) não diferem entre si pelo teste t ao nível de 0,05 de probabilidade.

Tabela 7. Efeito do tratamento de matrizes de *Chrysanthemum morifolium* cv. “Bi Time” com diferentes concentrações de fósforo no peso da massa fresca dos calos formados a partir do explante foliar coletados em 3 diferentes épocas (30, 45 e 60 dias após o início do tratamento com solução nutritivas).

Tratamentos (mg.L ⁻¹ de fósforo)	Duração do tratamento (dias)		
	30	45	60
0	0.482 a	0.547 a	0.498 a
7.75	0.716 b	0.633 a	0.442 a
15.5	0.572 c	0.776 b	0.512 b
31	0.674 b	0.903 c	0.684 c
62	0.547 a	1.000 c	0.580 b

C.V. = 26.212

Médias seguidas de mesma letra minúscula (colunas) não diferem entre si pelo teste t ao nível de 0,05 de probabilidade.

Tabela 8. Efeito do tratamento de matrizes de *Chrysanthemum morifolium* cv. “Bi Time” com diferentes concentrações de potássio no peso da massa fresca dos calos formados a partir do explante caulinar coletados em 3 diferentes épocas (30, 45 e 60 dias após o início do tratamento com solução nutritivas).

Tratamentos (mg.L ⁻¹ de potássio)	Duração do tratamento (dias)		
	30	45	60
0	0.764 a	0.676 b	0.602 a
58.5	0.768 a	0.695 b	0.665 a
117	0.794 a	0.709 ab	0.659 a
234	0.768 a	0.819 a	0.706 b
468	0.766 a	0.777 a	0.745 b

C.V. = 15.981

Médias seguidas de mesma letra minúscula (colunas) não diferem entre si pelo teste t ao nível de 0,05 de probabilidade.

Tabela 9. Efeito do tratamento de matrizes de *Chrysanthemum morifolium* cv. “Bi Time” com diferentes concentrações de potássio no peso da massa fresca dos calos formados a partir do explante foliar coletados em 3 diferentes épocas (30, 45 e 60 dias após o início do tratamento com solução nutritivas).

Tratamentos (mg.L ⁻¹ de potássio)	Duração do tratamento (dias)		
	30	45	60
0	0.253 a	0.194 a	0.156 a
58.5	0.220 a	0.190 a	0.140 a
117	0.192 b	0.188 a	0.128 a
234	0.194 b	0.171 b	0.127 a
468	0.224 a	0.128 b	0.113 b

C.V. = 15.57

Médias seguidas de mesma letra minúscula (colunas) não diferem entre si pelo teste t ao nível de 0,05 de probabilidade.

Tabela 10. Efeito do tratamento de matrizes de *Chrysanthemum morifolium* cv. “Bi Time” com diferentes concentrações de cálcio no peso da massa fresca dos calos formados a partir do explante caulinar coletados em 3 diferentes épocas (30, 45 e 60 dias após o início do tratamento com solução nutritivas).

Tratamentos (mg.L ⁻¹ de cálcio)	Duração do tratamento (dias)		
	30	45	60
0	1.331 a	1.106 a	0.668 bc
50	1.351 a	1.071 a	0.576 c
100	0.976 b	1.021 a	0.839 a
200	1.132 a	1.123 a	0.735 ab
400	1.120 a	1.126 a	0.680 bc

C.V. = 16.492

Médias seguidas de mesma letra minúscula (colunas) não diferem entre si pelo teste t ao nível de 0,05 de probabilidade.

Tabela 11. Efeito do tratamento de matrizes de *Chrysanthemum morifolium* cv. “Bi Time” com diferentes concentrações de cálcio no peso da massa fresca dos calos formados a partir do explante foliar coletados em 3 diferentes épocas (30, 45 e 60 dias após o início do tratamento com solução nutritivas).

Tratamentos (mg.L ⁻¹ de cálcio)	Duração do tratamento (dias)		
	30	45	60
0	2.193 a	1.529 a	1.263 a
50	1.488 c	1.521 a	1.187 a
100	1.820 b	1.499 a	1.275 a
200	1.755 b	1.728 a	1.227 a
400	1.938 b	1.581 a	1.163 a

C.V. = 15.578

Médias seguidas de mesma letra minúscula (colunas) não diferem entre si pelo teste t ao nível de 0,05 de probabilidade.

Tabela 12. Efeito do tratamento de matrizes de *Chrysanthemum morifolium* cv. “Bi Time” com diferentes concentrações de magnésio no peso da massa fresca dos calos formados a partir do explante caulinar coletados em 3 diferentes épocas (30, 45 e 60 dias após o início do tratamento com solução nutritivas).

Tratamentos (mg.L ⁻¹ de magnésio)	Duração do tratamento (dias)		
	30	45	60
0	0.465 b	0.391 a	0.644 b
12	0.620 b	0.429 a	0.803 b
24	0.787 a	0.448 a	0.702 b
48	0.544 b	0.455 a	0.796 b
96	0.817 a	0.434 a	1.107 a

C.V. = 39.47

Médias seguidas de mesma letra minúscula (colunas) não diferem entre si pelo teste t ao nível de 0,05 de probabilidade.

Tabela 13. Efeito do tratamento de matrizes de *Chrysanthemum morifolium* cv. “Bi Time” com diferentes concentrações de magnésio no peso da massa fresca dos calos formados a partir do explante foliar coletados em 3 diferentes épocas (30, 45 e 60 dias após o início do tratamento com solução nutritivas).

Tratamentos (mg.L ⁻¹ de magnésio)	Duração do tratamento (dias)		
	30	45	60
0	0.926 ab	0.908 b	0.923 ab
12	0.919 b	0.950 a	0.931 a
24	0.926 ab	0.943 a	0.913 b
48	0.937 a	0.947 a	0.909 b
96	0.929 ab	0.940 a	0.924 ab

C.V. = 44.88

Médias seguidas de mesma letra minúscula (colunas) não diferem entre si pelo teste t ao nível de 0,05 de probabilidade.