

EFEITO DE CONCENTRAÇÕES DE ÁGAR E NÍVEIS DE pH NA PROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE CRISÂNTEMO¹

Patrícia Duarte de Oliveira Paiva²

Moacir Pasqual²

Renato Paiva³

1. INTRODUÇÃO

A utilização da cultura de tecidos para a propagação clonal de plantas tem sido aceita como tecnologia para a produção de plantas matrizes, segundo DEBERGH (3) e DEBERGH e READ (4), e propagação assexuada de plantas ornamentais economicamente importantes (1, 9, 10, 11, 12, 17). A propagação *in vitro* do crisântemo é realizada quando se deseja propagação rápida de plantas, facilitando a introdução de novos cultivares, indexação de plantas para viroses ou a produção de plantas livres de vírus e patógenos (1, 5, 10, 11).

A adequação da solidificação do meio de cultura (sólido ou líquido) é importante no desenvolvimento de protocolos eficientes de propagação *in vitro* segundo GEORGE (6). Os meios líquidos têm a vantagem de serem preparados com maior rapidez e menor custo do que os meios sólidos, e ainda apresentam maior homogeneidade, segundo CALDAS *et al.* (2).

O ágar é o agente solidificante mais utilizado em preparo de meios sólidos e semi-sólidos, segundo GEORGE e SHERRINGTON (7) e PIERIK (16), variando a concentração entre 0,6 e 0,8%, de acordo com

¹ Parte da dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras (UFLA) pelo primeiro autor. Aceito para publicação em 09.07.1998.

² Departamento de Agricultura, Universidade Federal de Lavras, Cx. Postal 37, 37200-000 Lavras, MG.

³ Departamento de Biologia, UFLA

PIERIK (16). A solidez de meio com ágar é dependente, além da concentração utilizada e do pH do meio. Em pH levemente ácido, comumente utilizado em cultura de tecidos, e concentração de ágar entre 0,5-1,0% , tem-se um meio semi-sólido, segundo GEORGE (6) e GEORGE e SHERRINGTON (7). Em pH baixo - de 4,5 a 4,8 - o meio não solidifica, de acordo com MURASHIGE (12) e PIERIK (16). De acordo com SINGHA (19), o processo de autoclavagem afeta o pH e a redução do seu valor depende do valor aferido inicialmente, e essas mudanças ocorrem com maior intensidade em meios com pH entre 5,2 e 5,8.

O presente trabalho teve como objetivo determinar o valor de pH, assim como a concentração de ágar, adequados ao meio de cultura no cultivo *in vitro* de crisântemo.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Utilizaram-se plantas de crisântemo (*Dendranthema grandiflora* cv. Orange Reagen) já estabelecidas *in vitro* e submetidas à uniformização no meio de MURASHIGE e SKOOG (13) modificado para crisântemo, segundo OLIVEIRA *et al.* (14), e solidificado com 0,7% de ágar e pH ajustado em 5,8. No experimento, utilizou-se o mesmo meio modificado para crisântemo, acrescido dos tratamentos estabelecidos por concentrações de ágar - 0,0; 0,35; 0,7 e 1,05% - combinadas com pH ajustado em 4,6; 5,0; 5,4; 5,8; 6,2; 6,6 e 7,0; formando um fatorial 4 x 7, com três tubos por parcela e quatro repetições, em delineamento inteiramente casualizado.

Nos tratamentos que não continham solidificante (meio líquido), utilizaram-se pontes de Heller para sustentação dos explantes. O ajuste de pH foi realizado utilizando-se NaOH ou HCl antes da adição de ágar. O meio foi esterilizado por autoclavagem a 121°C, com pressão de 1 atm, por 20 minutos.

Em cada tubo de ensaio (25 x 150 mm) com 15 mL de meio de cultura inoculou-se uma microestaca contendo duas gemas, retirada da parte mediana do broto. O experimento foi conduzido em sala de crescimento com temperatura de $26 \pm 1^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 16 horas de luz e intensidade luminosa de $30 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

Após um período de 30 dias, efetuou-se a avaliação do experimento, por meio dos seguintes parâmetros: número e tamanho (cm) de brotos, número de folhas, peso da matéria seca (g) da parte aérea e número médio de raízes. O peso da matéria seca da parte aérea foi efetuado em balança analítica, após secagem do material em estufa (60°C, 72 horas). O pH foi medido após a adição de ágar, a autoclavagem e 30 dias de cultivo dos explantes. Nos meios sólidos, realizou-se agitação destes antes da medição de pH.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os níveis de ágar e pH testados não apresentaram efeitos significativos quanto ao número e tamanho dos brotos formados e número de folhas (Quadro 1). A variedade Orange Reagen apresentou boa adaptação a meios com diferentes consistências, desenvolvendo bem tanto em meio líquido, semi-sólido (0,35% de ágar) ou sólido (0,7 ou 1,05% de ágar).

QUADRO 1 - Resumo das análises de variância de número de brotos, tamanho (cm) de brotos, número de folhas, peso da matéria seca (g) da parte aérea (PMSpa) e número de raízes em diferentes níveis de ágar e pH no meio de cultura						
Causas da Variação	GL	Quadrados médios e significância				
		Número de Brotos ¹	Tamanho de Brotos ¹	Número de Folhas ¹	PMSpa ¹	Número de Raízes ²
Ágar	3	0,000416	0,036766	0,054410 **	0,000056 **	0,007007
pH	6	0,000607	0,004845	0,010178	0,000013 **	0,009592
Ágar x pH	18	0,001488	0,018280	0,011736	0,000007 **	0,044020 *
Resíduo	84	0,001488	0,014620	0,015835	0,000002	0,023060
C.V. (%)		1,56	4,59	3,56	0,07	5,07

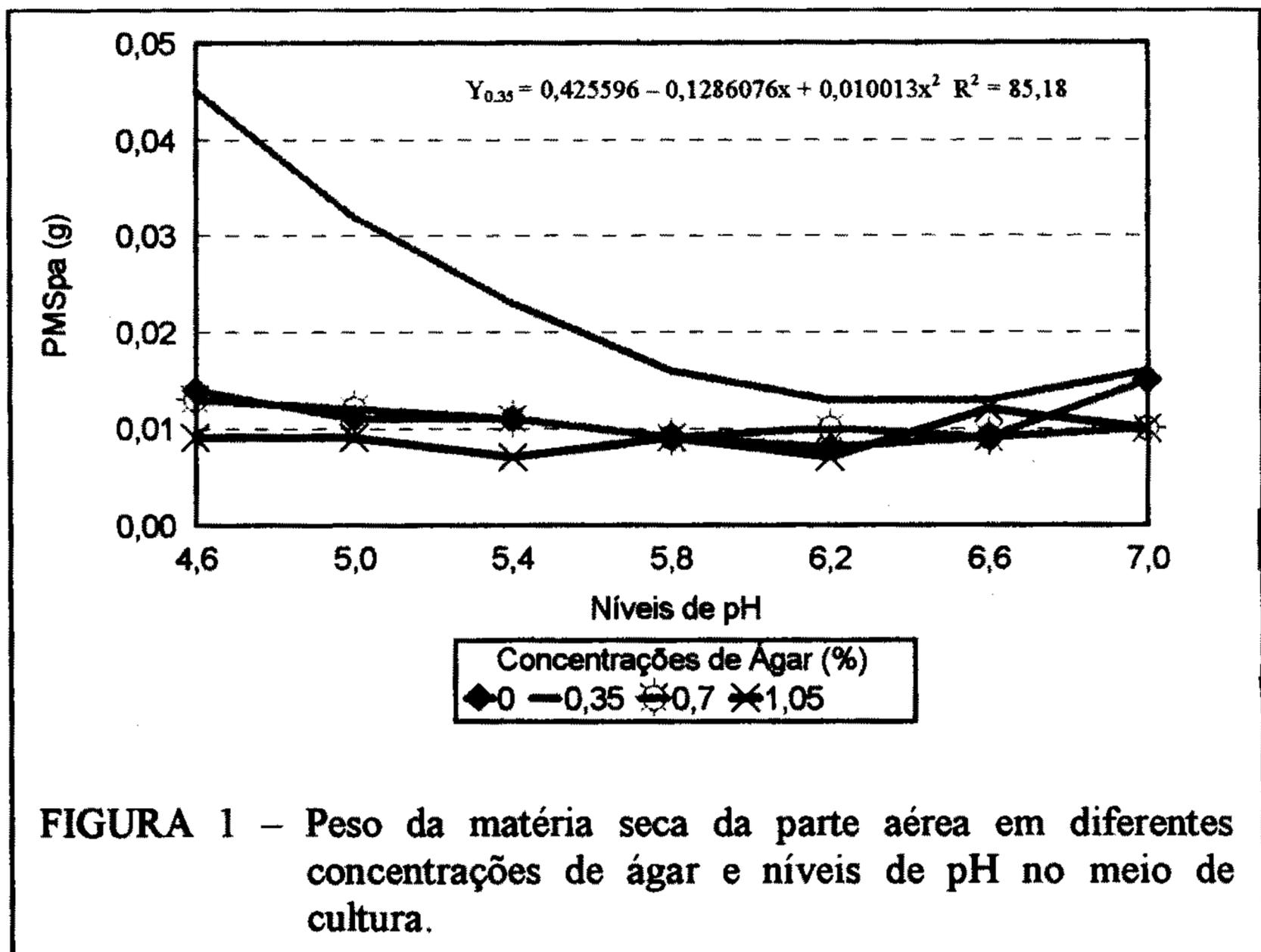
¹ Dados transformados em $\sqrt{x+10}$.
² Dados transformados em $\sqrt{x+5}$.
* Significativo a 5% de probabilidade.
** Significativo a 1% de probabilidade.

Em todos os níveis de pH ou concentrações de ágar observou-se a formação de apenas um broto, em média, proveniente do desenvolvimento de uma das gemas da microestaca. Os fatores testados também influenciaram o tamanho dos brotos e número de folhas. SHORT *et al.* (18), ao contrário, registraram maior crescimento das plantas de crisântemo cultivadas em meio líquido. Estes diferentes resultados podem ser atribuídos às diferentes variedades utilizadas nestes experimentos.

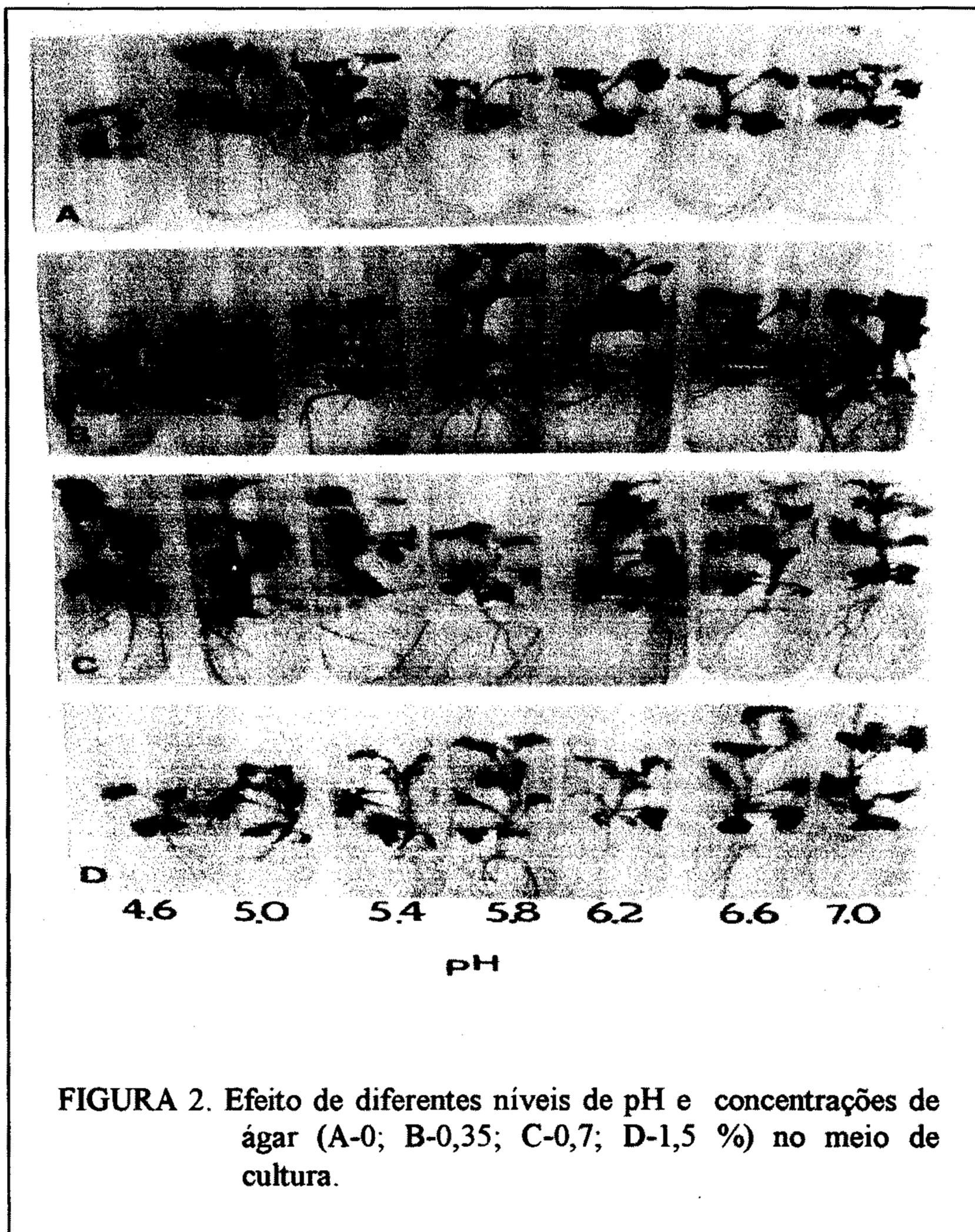
Os meios líquidos apresentam como limitação, no entanto, a necessidade de utilização de pontes de Heller para sustentação do explante, processo este inviável em produções comerciais, devido ao tempo e mão-de-obra necessários. Nos meios semi-sólidos ocorreram problemas com a sustentação dos explantes, que ficaram inclinados ou sobrenadantes, ocasionando a formação de brotos invertidos. Este problema acentuou-se quando estes meios foram ajustados em pH mais baixo, pois a solidificação foi menor ainda. Em concentração mais elevada de ágar (1,05%), o meio apresentou-se bastante rígido, dificultando a penetração do explante, embora não tenha afetado o desenvolvimento dos brotos. SHORT *et al.*

(18), ao contrário, observaram que a elevação na concentração de ágar produziu brotos com menor tamanho e menor número de folhas em crisântemo.

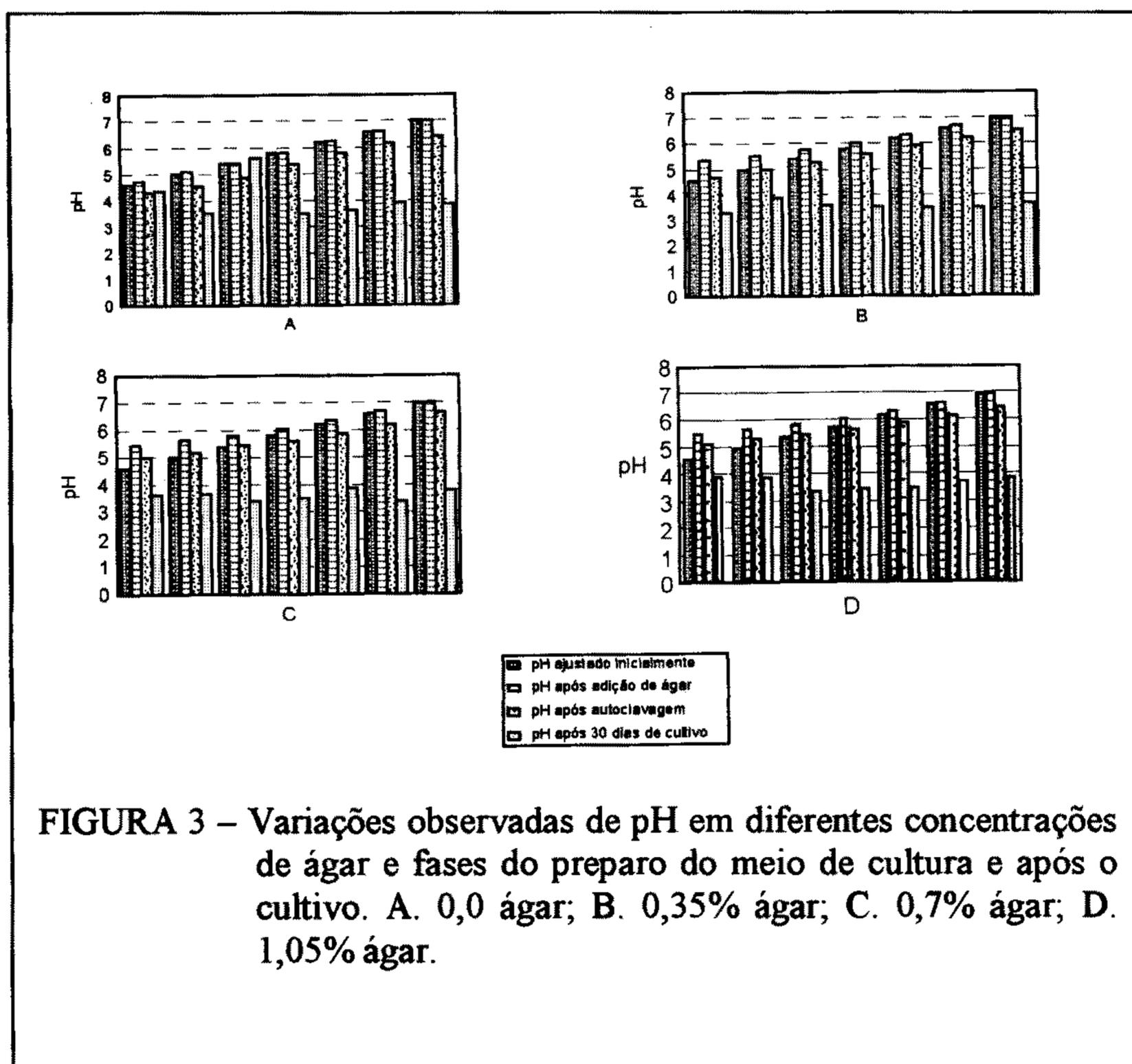
O peso da matéria seca da parte aérea foi afetado significativamente pela interação entre concentrações de ágar e pH. Utilizando-se 0,35% de ágar, o peso diminuiu à medida que se elevou o pH (Figura 1). Em outras concentrações de ágar, este parâmetro foi pouco afetado pelas variações de pH. Resposta semelhante também foi observada por GHASHGHAIE *et al.* (8), propagando roseira em meios com 0,4% de ágar. De acordo com SINGHA (19), o aumento da absorção de nutrientes é favorecido pela concentração de ágar e pelo incremento da disponibilidade de água.



Quanto ao número de raízes formadas, verificou-se também interação entre as concentração de ágar e níveis de pH, porém houve variações significativas, sendo o número de raízes formadas semelhantes nas diferentes concentrações de ágar. HU e WANG (9), PIERIK (16) SHORT *et al.* (18) e GHASHGHAIE *et al.* (8) observaram menor intensidade de formação de raízes em meios com concentrações mais elevadas de ágar (superior a 0,7%), sendo este efeito atribuído à menor aeração e difusão de metabólitos tóxicos. A Figura 2 resume os resultados observados no experimento.



Como se observa na Figura 3, ao final do período de cultivo (30 dias), independentemente do pH inicialmente ajustado, todos os tratamentos apresentavam valores de pH muito ácidos. Este efeito pode ser atribuído à eliminação de íons pela planta, para promover o equilíbrio de pH do meio. Nessa figura estão apresentadas, ainda, as alterações de pH em razão das fases de preparo do meio. Nota-se que há grande influência da adição de ágar, como já demonstrado por PASQUAL *et al.* (15), ocorrendo tendência de elevação do pH e também do processo de autoclavagem, alterando o pH inicialmente ajustado.



Apesar de não se observarem diferenças entre os tratamentos testados, e se notar adaptação das plantas a diferentes meios, inclusive equilibrando o pH do próprio meio, os resultados do experimento permitem concluir que variação na concentração de ágar e pH do meio de cultura do crisântemo não traz benefícios, devendo-se utilizar 0,7% de ágar e ajustar o pH em 5,8 (antes da adição de ágar), visando manter o meio em boa consistência para o cultivo e a inoculação dos explantes.

5. RESUMO

Avaliou-se o comportamento do crisântemo (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev.) em diferentes níveis de pH e meios de cultura com diferentes consistências. Utilizaram-se meios com 0,0; 0,35; 0,7 e 1,05% de ágar, combinados com pH ajustado em 4,6; 5,0; 5,4; 5,8; 6,2; 6,6 e 7,0. O número e tamanho de brotos e número de folhas não foram influenciados pelos tratamentos. Ao contrário, o peso da matéria seca e número de raízes sofreram influências dos diferentes tratamentos testados. Maiores pesos

foram observados em meios semi-sólidos com pH mais baixo. Apesar de não terem sido observadas diferenças quanto a número e tamanho de brotos, recomenda-se a utilização de 0,7% de ágar com pH ajustado em 5,8, proporcionando adequada consistência do meio de cultura. Observaram-se ainda variações do pH inicialmente ajustado em razão das diferentes etapas de preparo e da presença e desenvolvimento do explante.

6. SUMMARY

(EFFECT OF AGAR CONCENTRATIONS AND pH LEVELS ON *IN VITRO* PROPAGATION OF CHRYSANTHEMUM)

In vitro propagation of chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev.) using agar concentrations of 0.0, 0.35, 0.7, 1.05% and pH adjusted to 4.6, 5.0, 5.4, 5.8, 6.2, 6.6, 7.0 was tested. Different agar concentrations and pH levels did not affect "in vitro" chrysanthemum development. No differences were observed on shoot length and number of shoots and leaves. Although we did not observe any differences in shoot development, our results suggest that in order to obtain medium consistency and make the explant inoculation process more efficient, a medium containing 0.7% agar and pH adjusted to 5.8 should be used. We also observed a change in the pH level during the process of shoot development. In all treatments, we observed pH close to 3.5 after 30 days of *in vitro* culture.

7. LITERATURA CITADA

1. BHOJWANI, S.S. *Plant tissue culture: applications and limitations*. Amsterdam, Elsevier, 1990. 461p.
2. CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P. & FERREIRA, M.E. Meios nutritivos. In: TORRES, A.C. & CALDAS, L.S. (eds.). *Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas*. Brasília, EMBRAPA-CNPQ/ABCTP, 1990. p.37-70.
3. DEBERGH, P.C.A. Recent trends in the applications of tissue culture to ornamentals. In: GREEN, C.G.; SOMERS, D.A.; HACKETT, P. & BLESBOER, D.D. (eds.). *Plant tissue and culture*. New York, A.R. Liss, 1990. p.383-393.
4. DEBERGH, P.C. & READ, P.E. Micropropagation. In: DEBERGH, P.C. & ZIMMERMAN, R.H. (ed.). *Micropropagation - Technology and application*. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, 1991. p.1-14.
5. EARLE, E.D. & LANGHANS, R.W. Propagation of *Chrysanthemum* in vitro. II. Production, growth and flowering of plantlets from tissue cultures. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 99: 352-358, 1974.
6. GEORGE, E.F. *Plant propagation by tissue culture*. Part I – *In practice*. 2nd ed. Edington, Exegetics Limited, 1996. p.337-343.
7. GEORGE, E.F. & SHERRINGTON, P.D. *Plant propagation by tissue culture - Handbook and directory of commercial laboratories*. Eversley, Exegetics Limited, 1984. 593p.

8. GHASHGHAIE, J.; BRENCHMENN, J. & SAUGIER, B. Effects of agar concentration on water status and growth of rose plants cultured in vitro. *Physiologia Plantarum*, 82:73-78, 1991.
9. HU, C.Y. & WANG, P.J. Meristem, shoot tip and bud cultures. In: EVANS, D.A.; SHARP, W.R.; AMMIRATO, P.V. & YAMADA, Y. (eds.). *Handbook of plant cell Culture - Techniques for propagation and breeding*. New York, Macmillan Publishing Company, 1983. V.1, p.177-277.
10. JONES, L.H. Clonal propagation of plantation crops. In: ABBOT, A.J. & ATKIN, R.K. (eds.). *Improving vegetatively propagated crops*. London, Academic Press, 1987. p.385-405.
11. MAY, R.A. & TRIGIANO, R.N. Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaves of *Dendranthema grandiflora*. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 116: 366-371, 1991.
12. MURASHIGE, T. Plant propagation through tissue culture. *Annual Review of Plant Physiology*, 25: 135-166, 1974.
13. MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15: 473-497, 1962.
14. OLIVEIRA, P.D. de; PASQUAL, M. & PAIVA, R. Efeito de diferentes concentrações do meio MS, nitrogênio e sacarose na micropropagação de crisântemo "Orange Reagen". *Bragantia*, 55: 9-18, 1996.
15. PASQUAL, M.; RIBEIRO, V.G. & BARROS, I.de. Influência da chapa aquecedora e autoclave sobre o pH do meio de cultura. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 27: 603-608, 1992.
16. PIERIK, R.L.M. *In vitro culture of higher plants*. Dordrecht, Martinus Nyhoff Publishers, 1987. 344p.
17. QUERALT, T.M.C.; BERUTO, M.; VANDERSCHAEGHE, A. & DEBERGH, P.C. Ornamentals. In: DEBERGH, M.C. & ZIMMERMAN, R.H. (eds.). *Micropropagation - Technology and application*. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, 1991. p.215-230.
18. SHORT, K.C.; WARBURTON, J. & ROBERTS, A.V. In vitro hardening of cultured cauliflower and chrysanthemum plantlets to humidity. *Acta Horticulturae*, 212: 329-335, 1987.
19. SINGHA, S. Influence of agar concentration on in vitro shoot proliferation of *Malus* sp. *Almey* and *Pyrus communis* Seckel. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 107: 657-660, 1982.