

## Influência de fontes de potássio na multiplicação *in vitro* de crisântemo

Flávia Carvalho Santos<sup>1</sup>  
Keize Pereira Junqueira<sup>1</sup>  
Fabíola Villa<sup>2</sup>  
Moacir Pasqual<sup>3</sup>  
Milene Alves de Figueiredo<sup>1</sup>  
Vantuil Antonio Rodrigues<sup>4</sup>

### RESUMO

O estabelecimento do crisântemo *in vitro* e a micropropagação são dependentes de diversos fatores, dentre eles a composição do meio de cultura. Com o objetivo de aprimorar técnicas de micropropagação, segmentos nodais com cerca 2 cm e duas gemas axilares, oriundos de plantas pré estabelecidas *in vitro*, foram excisados e inoculados em meio Knudson, contendo 15 mL do meio de cultura. Os tratamentos consistiram de diferentes concentrações de fosfato de potássio (0, 250, 500 e 1000 mg L<sup>-1</sup>) e de cloreto de potássio (0, 125, 250, 500 e 1.000 mg L<sup>-1</sup>). O pH foi ajustado para 5,8 antes da adição de 6 g L<sup>-1</sup> de ágar e da autoclavagem a 121 °C e 1 atm por 20 minutos. Após a inoculação, os explantes foram transferidos para sala de crescimento a 27 ± 1 °C, irradiância de 35 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> e fotoperíodo de 16 horas, onde permaneceram por 90 dias. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, fatorial 5 x 5, utilizando-se quatro repetições constituídas de três tubos contendo um explante cada. O meio Knudson constituído de 1.000 mg L<sup>-1</sup> de fosfato de potássio combinado com 250 mg L<sup>-1</sup> de KCl proporcionou maior comprimento da parte aérea, do número de raízes e do peso da matéria fresca da parte aérea. Maior peso da matéria fresca das raízes de plântulas foi obtido com 1.000 mg L<sup>-1</sup> de fosfato de potássio.

**Palavras chave:** Cloreto de potássio, fosfato de potássio, Knudson.

### ABSTRACT

#### Influence of potassium on *in vitro* chrysanthemum multiplication

Establishment of *in vitro* chrysanthemum and micropropagation are dependent of several factors, including culture medium composition. Aiming to improve the techniques of chrysanthemum micropropagation, 2cm-long nodal segments and 2 axillary buds, from *in vitro* plants were excised and inoculated in 15 mL of Knudson medium. The treatments consisted of different concentrations of potassium phosphate (0, 250, 500, 1000 mg L<sup>-1</sup>) and KCl (0, 125, 250, 500 and 1000 mg L<sup>-1</sup>). The pH was adjusted to 5.8 before the addition of 6 g L<sup>-1</sup> agar and the sterilization at 121°C and 1 atm during 20 minutes. After the inoculation, the explants were transferred to a growth room at a 27 ± 1°C, with 35 mol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> irradiance (PFFD) and a 16 hours photoperiod for 90 days. The experiment was arranged in a complete randomized factorial 5x5 design, using four repetitions of three tubes with one explant each. The Knudson medium containing 1000 mg L<sup>-1</sup> of potassium phosphate combined with 250 mg L<sup>-1</sup> of KCl provided higher aerial part, larger number of roots and higher fresh weight of aerial part. Higher fresh weight of plantlet roots was obtained with 1000 mg L<sup>-1</sup> of potassium phosphate.

**Key words:** Potassium chloride, potassium phosphate, Knudson.

Recebido para publicação em maio de 2006 e aprovado em setembro de 2008

<sup>1</sup> Doutoranda em Fitotecnia, UFLA, Caixa Postal 3077 - 37200-00 - Lavras, MG, e-mail: flavinha3010@yahoo.com.br

<sup>2</sup> Pós-doutoranda em Fitotecnia, EPAMIG, Maria da Fé, MG, e-mail: fvilla2003@libero.it

<sup>3</sup> D.Sc., Professor Adjunto, Departamento de Agricultura (DAG), UFLA, Lavras, MG, e-mail: mpasqual@ufla.br

<sup>4</sup> Laboratorista, Departamento de Agricultura, UFLA, Lavras, MG.

## INTRODUÇÃO

O crisântemo (*Dendranthema morifolium* (Ramat.) Tzvelev.) é uma planta ornamental cultivada em todo o mundo e comercialmente valiosa por possuir inúmeros híbridos, bastante apreciados pela sua inflorescência rica em diversidade de cores, formas e durabilidade (Dowrick, 1953). Sua propagação vem sendo realizada por meio de estacas, mas o cultivo *in vitro* tem sido um método alternativo, pela rapidez e homogeneidade na obtenção de mudas.

Recentes pesquisas foram publicadas em relação a micropropagação do crisântemo e ao emprego de meios utilizados, como, por exemplo, o MS (Rout *et al.* 2006; Teixeira da Silva, 2003). A utilização de segmentos nodais como explante para a micropropagação é uma das maneiras de se viabilizar a produção *in vitro* (Oliveira, 1994). Bhojwani (1990) sugere a utilização de segmentos com apenas uma gema para a propagação de crisântemo. Prasad & Chaturvedi (1988) obtiveram brotações de crisântemo apenas em ápices e segmentos nodais.

Embora o meio MS tenha favorecido o crescimento e desenvolvimento de várias espécies, a utilização de composições mais diluídas, como o meio Knudson, para algumas espécies ornamentais tem fornecido melhores resultados (Grattapaglia & Machado, 1998). A maioria das descrições de meios de cultura alternativos não demonstra de maneira comparativa se o novo meio é ou não melhor do que aquele de sua origem. O meio deve ser selecionado em função da espécie e do tipo de cultivo ou do estágio cultural que está sendo efetivado (Pasqual, 2001).

O potássio é um elemento essencial tanto para as plantas quanto para os animais (Malavolta, 1996). Elementos como cloro podem entrar na composição de meios nutritivos em concentrações muito variáveis como íon acompanhante de algum elemento essencial, por exemplo, quando o cloro é utilizado como íon acompanhante do potássio e este está presente em concentrações altas em determinadas composições experimentais de meios. Já o fósforo, nos meios de cultura, é fornecido como fosfato de sódio solúvel ou fosfato de potássio mono e dihidrogenado. Altas concentrações de fosfato dissolvido no meio podem diminuir o crescimento do explante, possivelmente porque o cálcio e alguns micronutrientes são precipitados da solução ou sua absorção é reduzida (Pasqual, 2001).

O fosfato de sódio ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) é um componente do meio White (1943) e B5 (Gamborg *et al.*, 1968). O cloreto de potássio (KCl) é encontrado somente no meio White. O meio MS possui baixas concentrações de sódio e de cloro. Contudo, estudos com a micropropagação de orquídeas demonstraram a necessidade de se adicionarem ao meio de cultura concentrações maiores desses sais (Chen *et al.*, 2000).

Objetivou-se determinar a melhor concentração de cloreto e fosfato de potássio na multiplicação *in vitro* de crisântemo (*Dendranthema morifolium* (Ramat.) Tzvelev.), cv. White Polaris.

## MATERIAL E MÉTODOS

Segmentos nodais de crisântemo (*Dendranthema morifolium* (Ramat.) Tzvelev.), cv. White Polaris, com cerca de 2 cm de comprimento e duas gemas axilares, foram excisados de plantas preestabelecidas *in vitro*, oriundos de três subcultivos, em meio Knudson (1946) (Tabela 1). Esses foram inoculados em tubos de ensaio contendo 15 mL do mesmo meio Knudson de cultura, suplementados com diferentes concentrações de fosfato de potássio ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  - 0, 250, 500, 750, 1000  $\text{mg L}^{-1}$ ) e de cloreto de potássio (KCl - 0, 125, 250, 500 e 1000  $\text{mg L}^{-1}$ ). O meio foi acrescido de 25  $\text{g L}^{-1}$  de sacarose e 4,0  $\text{mg L}^{-1}$  de BAP e solidificado com 6  $\text{g L}^{-1}$  de ágar (Merck®), e o pH foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem a 121 °C e 1 atm por 20 minutos. Posteriormente à inoculação, as culturas foram transferidas para sala de crescimento a 25 ± 2 °C, irradiância de 35  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  fornecida por tubos fluorescentes de 20 W (Osram®), luz do dia especial e fotoperíodo de 16 horas diárias, permanecendo nessas condições por 90 dias. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, utilizando-se de quatro repetições, com 12 plantas cada. O experimento foi avaliado pelo comprimento da parte aérea e das raízes, de número de raízes e folhas, peso da matéria fresca e seca da parte aérea e do sistema radicular. Os dados foram analisados por meio do software Sisvar (Ferreira, 2000), utilizando-se regressão polinomial para as concentrações dos sais.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Houve interação significativa entre as concentrações de sais para número de folhas, comprimento da parte aérea e de raízes, número de raízes e peso da matéria fresca da parte aérea. Para as demais variáveis, apenas o fosfato de potássio apresentou significância a 5% de probabilidade. O número de folhas aumentou à medida que foram aumentadas as concentrações de cloreto de potássio (Figura 1). Maior número de folhas (30,17) foi obtido na au-

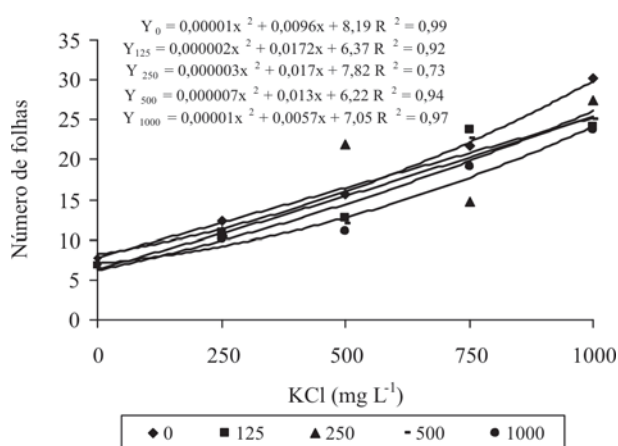


Figura 1 - Número de folhas em plântulas de crisântemo, em função de diferentes concentrações de cloreto e de fosfato de potássio.

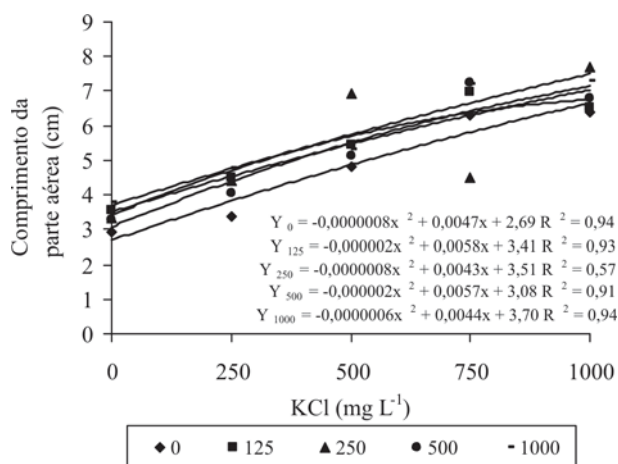
**Tabela 1** - Composição do meio de cultura Knudson (1946)

Sol. estoque	Compostos	Concent. da solução estoque (mg L <sup>-1</sup> )	Volume da sol. estoque adicionada ao meio (mL)	Concent. final (mg L <sup>-1</sup> )
Knudson	Ca(NO <sub>3</sub> ).4H <sub>2</sub> O	40.000	25	1.000
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	25.000	20	500
MICRO I	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	11,2	5	1,4
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	50.000		250
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	5,2		0,026
	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	50.000		250
MICRO II	MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	1.500	5	15
	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	66,2		6,62
	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	12,4		0,062
	FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1250		25
Carvão ativado	0,2%	—	—	—
Açúcar	Sacarose (2%)	—	—	20.000
Ágar (0,6%)	—	—	—	6.000
pH = 5,8±0,1				

sência do fosfato de potássio, associado a 1000 mg L<sup>-1</sup> de KCl. Estes dados discordam de estudos de micropropagação de crisântemo, em que Junqueira *et al.* (2003) verificaram que, com a adição de 1.000 mg L<sup>-1</sup> de nitrato de cálcio em meio MS e na ausência de cloreto de potássio, é possível obter maior número de folhas dessa ornamental.

A hiper-hidricidade foi verificada nas folhas dessa ornamental e pode estar relacionada ao cloro. Como este tem pouca influência do ponto de vista nutricional, estudos têm sido realizados para reduzir sua concentração.

Analisando-se a Figura 2, pode-se observar que, para o comprimento da parte aérea, o comportamento do KCl foi dependente do fosfato de sódio. Incrementos nas concentrações de fosfato de potássio, adicionados ao meio

**Figura 2** - Comprimento da parte aérea em plântulas de crisântemo, em função de diferentes concentrações de cloreto de potássio e de fosfato de potássio.

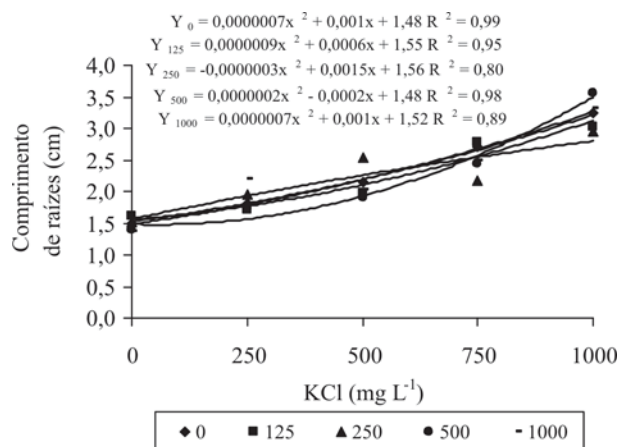
Knudson, proporcionaram aumento de forma quadrática no comprimento das plântulas. Menor comprimento das plantas foi observado na ausência de sais no meio e maior (7,71 cm) foi constatado na presença de 250 mg L<sup>-1</sup> de KCl, associado a 1.000 mg L<sup>-1</sup> de fosfato de potássio, discordando assim de Junqueira *et al.* (2003), que obtiveram maior comprimento da parte aérea de plântulas de crisântemo com baixas concentrações de nitrato de cálcio combinadas com 1.000 mg L<sup>-1</sup> de cloreto de potássio.

Poddar *et al.* (1997) estudaram altas concentrações de nitrato de amônio em *Eleusine coracana* e observaram que o nitrato pode funcionar como um regulador de crescimento, estimulando brotações. Araujo *et al.* (2005), estudando as espécies de orquídea *Cattleya nobilior* x *Cattleya nobilior* e *Cattleya leopoldii*, observou que o nitrato de potássio estimulou o crescimento de brotações até certo ponto, tornando-se tóxico a partir desse, com o aumento das concentrações.

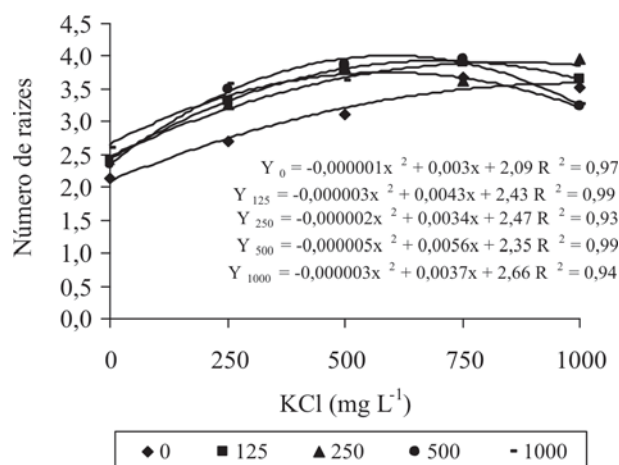
O comprimento das raízes se comportou de forma semelhante ao número de folhas e comprimento da parte aérea (Figura 3), em que melhores resultados foram verificados com a associação de 500 mg L<sup>-1</sup> de KCl e altas concentrações de fosfato de potássio.

Observou-se redução de forma quadrática no número de raízes com o aumento das concentrações de fosfato de potássio (Figura 4). Maior número foi verificado com 250 mg L<sup>-1</sup> de KCl combinado com 1.000 mg L<sup>-1</sup> de fosfato de potássio.

Talvez as combinações de concentrações de tais sais tenham interferido na absorção ou na translocação de outros nutrientes essenciais ao aumento no número de raízes/explante. Várias interações entre os íons estão en-



**Figura 3** - Comprimento das raízes em plântulas de crisântemo, em função de diferentes concentrações de cloreto e de fosfato de potássio.

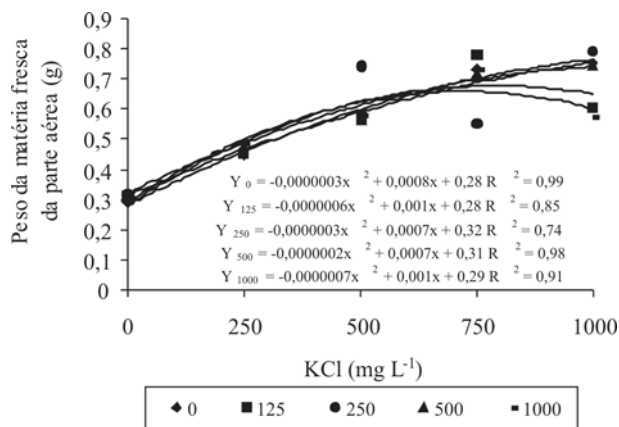


**Figura 4** - Número de raízes em plântulas de crisântemo, em função de diferentes concentrações de cloreto e de fosfato de potássio.

volvidas com a absorção e utilização deles pela planta, como a competição, o sinergismo e a relação cátion-ânion (Marschner, 1986), sendo importante que os sais se encontrem nos substratos em proporções quantitativas equilibradas (Yamada & Sato, 1978; Ziegler, 1993).

O incremento das concentrações de fosfato de sódio adicionadas ao meio Knudson promoveu diminuição na massa fresca das plântulas de forma quadrática, obtendo-se maior massa fresca (0,789 g) na presença de 250 mg L<sup>-1</sup> de KCl combinadas com 1.000 mg L<sup>-1</sup> de fosfato de potássio (Figura 5), discordando assim de Mhatre *et al.* (2000) que, em estudos com cultivares de *Vitis vinifera*, observaram na ausência de cloreto de potássio em meio de cultura ½ MS, aumento de mais de 80% na massa fresca das plântulas e no seu enraizamento.

Silva *et al.* (2001), estudando fontes de nitrogênio no desenvolvimento *in vitro* do porta-enxerto 'Trifoliata' em meio MS, concluíram que melhores resultados são obtidos com 75% da composição dos sais da fonte KNO<sub>3</sub>

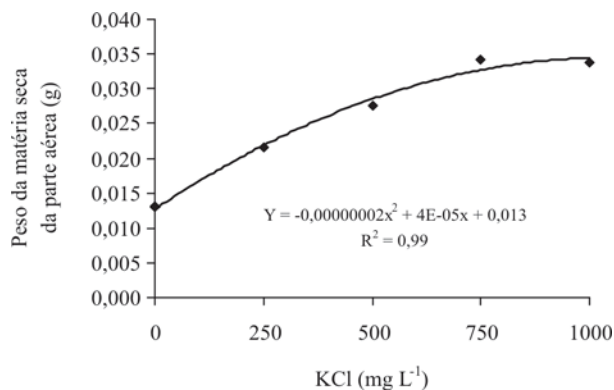


**Figura 5** - Peso da matéria fresca da parte aérea em plântulas de crisântemo, em função de diferentes concentrações de cloreto e de fosfato de potássio.

associada a altas concentrações de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> para altura e peso das brotações dos explantes.

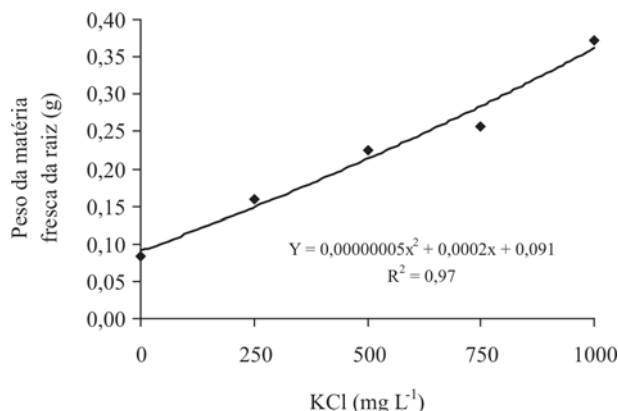
Não foi observada interação significativa para a concentração dos sais em relação ao peso da matéria seca da parte aérea e ao peso da matéria fresca e seca das raízes. Aumento nas concentrações de fosfato de potássio promoveu também aumento de forma quadrática no peso da matéria seca da parte aérea e raiz (Figuras 6, 7 e 8).

Concentrações muito elevadas de cloro podem causar amarelecimento em folhas, enfraquecimento de hastes e até mesmo morte de algumas plantas, conforme verificado neste experimento, corroborando afirmações de Pasqual (2001). Ingstad (1982) revelou que o fator nutricional depende do fluxo de densidade ou da quantidade de nutrientes utilizados por unidade de tempo e de área. A absorção de nutrientes minerais é afetada pela composição do meio de cultura, composição do tecido da planta e pelo ambiente da cultura (Willians, 1991), fatores que poderiam prognosticar e/ou prever a adequada composição do meio de cultura com base nas análises de tecido de plantas crescidas *in vitro*.

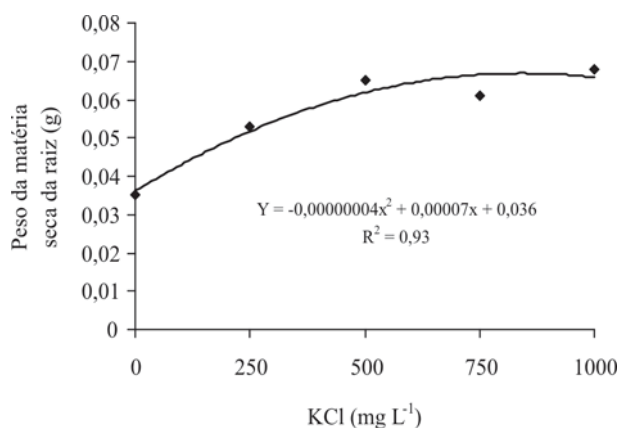


**Figura 6** - Peso da matéria seca da parte aérea em plântulas de crisântemo, em função de diferentes concentrações de cloreto e de fosfato de potássio.





**Figura 7** - Peso da matéria fresca de raízes em plântulas de crisântemo, em função de diferentes concentrações de cloreto e de fosfato de potássio.



**Figura 8** - Peso da matéria seca de raízes em plântulas de crisântemo, em função de diferentes concentrações de cloreto e de fosfato de potássio.

## CONCLUSÕES

O meio Knudson contendo 1000 mg L<sup>-1</sup> de fosfato de potássio combinado com 250 mg L<sup>-1</sup> de cloreto de potássio proporcionou maior comprimento da parte aérea, maior número de raízes e peso da matéria fresca da parte aérea de plântulas de crisântemo multiplicadas “*in vitro*”.

Maior peso da matéria fresca das raízes de plântulas foi obtido com 1.000 mg L<sup>-1</sup> de fosfato de potássio.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Araujo AG, Pasqual M, Rodrigues VA, Silva AB & Soares GA (2005) Concentração de KNO<sub>3</sub> e NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> no crescimento *in vitro* de plântulas de orquídea. *Plant Cell Culture & Micropropagation*, 1:31-36.
- Bhojwani SS (1990) *Plant Tissue Culture: Applications and Limitations*. Amsterdam, Elsevier, 461p.
- Chen Y, Chang C & Chang W (2000) A reliable protocol for plant regeneration from callus culture of *Phalaenopsis*. *Vitro Cellular and Developmental Biology Plant*, 36: 420-423.
- Dowrick GJ (1953) The chromosomes of *Chrysanthemum* II. Garden Varieties. *Heredity*, 7: 59-72.
- Ferreira DF (2000) Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In: 45º Reunião Anual da Região Brasileira da Sociedade Internacional de Biometria, São Carlos. Anais, UFSCar. p. 255-258.
- Gamborg OL, Miller RA & Ojima K (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research*, 50: 151-158.
- Grattapaglia D & Machado MA (1998) Micropropagação. In: Torres AC, Caldas LS & Buso JA (eds). *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília, Embrapa/CNPq, 1. p.183-260.
- Ingestad T (1982) Relative addition rate and external concentration: driving variables used in plant nutrition research. *Plant Cell Environmental*, 5:443-453.
- Junqueira KP, Rodrigues VA, Santos FC & Pasqual M (2003) Crescimento *in vitro* de crisântemo: efeito do nitrato de cálcio (Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O e cloreto de potássio (KCl). In: 14º Congresso Brasileiro de Floricultura e Plantas Ornamentais, 1º Congresso Brasileiro de Cultura de Tecidos de Plantas, Lavras. Anais, Lavras. p. 197.
- Knudson L (1946) A new nutrient solution for the germination of orchid seed. *American Orchid Society Bulletin*, 14:214-217.
- Malavolta C (1996) La Producción Integrada en Europa: Situación y prospectiva. In: Informe para consultoria GTZ - PFI. Valência: Mayo. 48 p.
- Marschner H (1986). Ion uptake mechanisms of individual cells and roots: short-distance transport. In: *Mineral nutrition of higher plants*. 2 ed. Academic Press, London, p. 6-78.
- Mhatre M, Salunkhe CK & Rao PS (2000) Micropropagation of *Vitis vinifera* L.: towards an improved protocol. *Scientia Horticulturae*, 84:357-363.
- Oliveira PD (1994) Propagação “*in vitro*” de crisântemo (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev.) cv. Orange Reagen. Dissertação de Mestrado em Fitotecnia. Lavras, Universidade Federal de Lavras. 116 p.
- Pasqual M (2001). *Cultura de tecidos vegetais: tecnologia e aplicações*. Meios de cultura. Lavras - MG: UFLA/FAEPE, 2001. 74 p.
- Poddar K, Vishnoi RK & Kothari SL (1997) Plant regeneration from embryogenic callus of finger millet *Eleusine coracana* (L.) Gaertn. on higher concentrations of NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> as a replacement of NAA in the medium. *Plant Science*, 129:101-106.
- Prasad RN & Chaturvedi C (1998) Effect of season of collection of explants on micropropagation of *Chrysanthemum morifolium*. *Biologia Plantarum*, 30: 20-24.
- Rout GR, Mohapatra A & Jain MS (2006) Tissue culture of ornamental pot plant: A critical review on present scenario and future prospects. *Biotechnology Advances*, 24:531-560.
- Silva AB, Pio R, Ramos JD, Mendonça V, Pasqual M & Calegari, M (2001) Influência das fontes de nitrogênio NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> e KNO<sub>3</sub> no desenvolvimento *in vitro* do porta-enxerto ‘Trifoliata’. *Revista Científica Rural*, 6:147-152.
- Teixeira da Silva JA (2003) *Chrysanthemum*: advances in tissue culture, postharvest technology, genetics and transgenic biotechnology. *Biotechnology Advances* 21:715-766.
- White PR (1943) *A handbook of plant tissue culture*. Lancaster, Costel e Company, p.273.
- Williams RR (1991) Factor's determining mineral uptake *in vitro*. *Acta Horticulturae*, 289:165-166.
- Yamada Y & Sato F (1978) The photoautotrophic culture of chlorophyllous cells. *Plant Cell Physiology* 19:691-699.
- Ziegler H (1993) Los nutrientes y su transformación en la planta. In: Strassburger, tratado de botánica (Denfer DV *et al.* (eds.). 32 ed. Edições Omega, Barcelona, p. 314-370.