

## MORPHOGENESIS *in vitro* OF CHRYSANTHEMUM (*Dendranthema grandiflora* TZELEV) FROM STEM AND PEDICEL EXPLANTS

### MORFOGÊNESE *in vitro* DE CRISÂNTEMO (*Dendranthema grandiflora* TZELEV) A PARTIR DE EXPLANTES DE CAULE E PEDICELO

Maria Rita de Cássia CAMPOS<sup>1</sup>; Adão de Siqueira FERREIRA<sup>2</sup>; Paulo Roberto CECON<sup>3</sup>; Wagner Campos OTONI<sup>4</sup>

1. Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás - UFG, Catalão, GO, Brasil.campos.mariarita@yahoo.com.br; 2. Instituto de Ciências Agrárias – ICIAG, Universidade Federal de Uberlândia - UFU, Uberlândia, MG, Brasil; 3. Departamento de Estatística, Universidade Federal de Viçosa - UFV, Viçosa, MG, Brasil; 4. Laboratório de Cultura de Tecidos II, Departamento de Biologia Vegetal - UFV, Viçosa, MG, Brasil.

**RESUMO:** Visando a adequação de um protocolo de morfogênese *in vitro* para plantas de crisântemo (*Dendranthema grandiflora* Tzelev) analisou-se três fatores que afetam a frequência da regeneração. Foram avaliadas três concentrações de ácido indolil-acético (AIA) e 6- Benzilaminopurina (BAP), a fonte de explante (caule e pedicelo) e a orientação de inoculação do explante no meio de cultivo. Ao final de 15-30 dias de cultivo, observou-se que a fonte de explante, o tipo de explante e a interação explante e meio de cultivo afetaram significativamente a frequência de regeneração (FR) e o número de ramos por explantes (NRE) em crisântemo. Os explantes de pedicelo apresentaram maiores frequências de regeneração (15-20 dias) em meio de cultivo suplementado com 0,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP e 2,0 mg L<sup>-1</sup> de AIA e os explantes caulinares (30 dias) em meio com 2,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP e 0,5 mg L<sup>-1</sup> de AIA. Respostas diferenciais em relação à morfogênese foram observadas quando as duas posições do pedicelo foram inoculadas no meio de cultivo, a região seccionada em contato com o meio de cultivo suplementado com 0,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP e 2,0 mg L<sup>-1</sup> de AIA proporcionou maior frequência de brotos. Foram obtidas plantas com flores 45-60 dias após a transferência para a casa de vegetação. As flores apresentavam os mesmos padrões e características das flores das plantas doadoras de explantes. Pode-se concluir que o tipo de explante, sua orientação em relação ao meio de cultura bem como as combinações de reguladores de crescimento são fatores-chave envolvidos no sucesso da regeneração de plantas de crisântemo *in vitro*.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Dendranthema grandiflora*. Explantes. Fitorreguladores. Regeneração *in vitro*.

## INTRODUÇÃO

O crisântemo (*Dendranthema grandiflora* Tzelev) representa o segundo grupo de flor de corte de maior importância econômica no mundo. Esta popularidade como flor de corte exige a introdução de cultivares com grande diversidade de cores e tamanho das flores (BARAKAT et al., 2010). A floricultura é uma atividade que requer, cada vez mais, a aplicação de biotecnologia para atender as demandas de consumo, através da introdução de novas espécies com maior valor ornamental. Programas de melhoramento envolvendo processos de biotecnologia, como o uso do cultivo *in vitro*, têm focado em várias características de valor ornamental incluindo cor, tamanho e forma da flor, fenótipo da planta, resistência a doenças e tempo de vida em vaso (HUTCHINSON et al., 1982).

O crisântemo tem sido relativamente flexível nas respostas a diferentes técnicas de cultivo *in vitro*. Existem diversos trabalhos envolvendo os fatores que afetam a regeneração em crisântemo, mas na maioria dos casos, os ramos foram produzidos passando por uma fase intermediária de calo (SUTTER; LANGHANS,

1981; SHERMAN; MOYER; DAUB, 1998; TEIXEIRA da SILVA 2003; JARAMILLO et al., 2008). Ramos adventícios têm sido regenerados de uma grande variedade de explantes, produzidos por organogênese direta e indireta (HILL, 1968; BEN-JAACOV; LANGHANS, 1972; EARLE; LANGHANS, 1974; LATADO; TULMANN NETO; MENDES, 1996; KARIM et al., 2002; JARAMILLO et al., 2008). A morfogênese *in vitro*, a exemplo de crisântemo, depende da interação de fatores como a fonte de explante, incluindo tamanho e orientação no meio, o meio de cultivo, concentração de reguladores de crescimento e condições de cultura (BAJAJ, SIDHU; GILL, 1992; SUGIYAMA, 1999; ZHAO et al., 2008; BORGES et al., 2011).

A obtenção de plantas morfológica e fisiologicamente normais após o cultivo *in vitro* é uma condição necessária para técnicas que envolvam transformação genética de plantas. Assim, o presente trabalho teve como objetivos comparar a capacidade morfogênica de explantes caulinares e de pedicelo de *D. grandiflora* Tzelev 'Repin Rosa' em três combinações de reguladores de crescimento e avaliar o efeito da orientação de explantes de

pedicelo inoculados no meio de cultivo na regeneração de ramos *in vitro*.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Material vegetal

O estudo foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos II, Instituto de Biotecnologia Aplicada à Pesquisa Agropecuária, Universidade Federal de Viçosa. Plantas axênicas de *Dendranthema grandiflora* Tzelev 'Repin Rosa' foram fornecidas pelo pesquisador Dr. Rodrigo Rocha Latado do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA) da USP/ESALQ (Piracicaba).

### Estabelecimento *in vitro* das culturas

Visando a ampliação do número de plantas *in vitro*, o estoque de plantas foi micropropagado inicialmente por subcultivos mensais em meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com 100 mg L<sup>-1</sup> de i-inositol, complexo vitamínico do meio B5 (GAMBORG et al., 1968), 100 mg L<sup>-1</sup> de caseína hidrolizada e 0,75% (p/v) de ágar (Sigma Chemical Company, USA). O pH ajustado em 5,7 ± 0,1 antes da autoclavagem. Posteriormente, as culturas foram subcultivadas a cada dois meses, utilizando-se segmentos nodais como explantes.

As culturas foram mantidas em sala de crescimento, sob irradiância de 24 μmoles m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>, temperatura de 26 ± 2 °C e 16 horas de fotoperíodo (duas lâmpadas fluorescentes, Luz do Dia Especial, 20W, Osram, Brasil). Periodicamente, plantas *in vitro* foram aclimatadas e transferidas para casa de vegetação, as quais constituíram plantas doadoras de explantes (pedicelos), após a indução ao florescimento das mesmas.

### Tipo de explante

Os explantes caulinares (5 a 10 mm de comprimento) foram obtidos de plantas axênicas e cultivados em placas de Petri contendo o meio para regeneração. Para a obtenção dos pedicelos, plantas axênicas de um mês de idade foram aclimatadas e transferidas para casa de vegetação e utilizadas como fonte de explantes após a indução do florescimento.

A aclimação das plantas constou da retirada das mesmas dos tubos de ensaio seguido de lavagens em água corrente das raízes, visando a retirada do excesso de meio de cultura. Em seguida, foram acondicionadas em copos plásticos contendo água deionizada e autoclavada, envolvidas por um saco plástico evitando a perda excessiva de água e mantidas sob condições ambientais. Pequenos orifícios foram feitos no saco plástico a cada dois

dias, sendo que após o sétimo dia as plantas foram transferidas para vasos plásticos com capacidade de 3 kg, contendo substrato orgânico (Plantagro, Brasil) e conduzidas para casa de vegetação.

O florescimento foi induzido utilizando plantas de crisântemo com aproximadamente 5 semanas, após a transferência para casa de vegetação, cultivadas em condições de fotoperíodo curto (8 horas de luz/16 horas de escuro). As plantas foram mantidas sob controle fotoperiódico até o surgimento dos botões. Os pedicelos obtidos foram lavados em água corrente e em seguida desinfestados pela imersão em álcool (70%), por 1 minuto, hipoclorito de sódio (2,0%) e Tween-20 (2 gotas/100 mL), por 10 a 15 minutos, e enxaguados quatro vezes em água deionizada e autoclavada. Para avaliar respostas diferenciais à regeneração a partir de pedicelos, esses foram seccionados longitudinalmente em duas seções sendo que uma região seccionada estava em contato com o meio de cultivo de melhor resposta morfogênica.

Os explantes caulinares e de pedicelo, após a inoculação nos meios de cultivo, foram mantidos em sala de crescimento, sob irradiância de 24 μmoles m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>, temperatura de 26 ± 2 °C e com fotoperíodo de 16 horas (Luz do Dia Especial, 20W, Osram, Brasil).

### Meios de regeneração

Três combinações de reguladores de crescimento foram adicionadas ao meio básico contendo sais MS, 100 mg L<sup>-1</sup> de i-inositol, complexo vitamínico do meio B5, 100 mg L<sup>-1</sup> de caseína hidrolizada e 0,75% (p/v) de ágar e pH ajustado (5,7). Em cada meio, o 6-benzil aminopurina (BAP) foi adicionado antes, e o ácido indol acético (AIA) após a autoclavagem. As combinações de reguladores foram assim constituídas: (R1) 0,5 mg L<sup>-1</sup> BAP + 2,0 mg L<sup>-1</sup> AIA; (R2) 2,0 mg L<sup>-1</sup> BAP + 0,5 mg L<sup>-1</sup> AIA e (R3) 1,0 mg L<sup>-1</sup> BAP + 0,1 mg L<sup>-1</sup> AIA. Os meios foram autoclavados e distribuídos em alíquotas de 25 ml em placas de Petri (90 X 15 mm). Após a inoculação dos explantes, as placas foram vedadas com filme plástico de PVC (Resinite, Alba Química, Argentina) e mantidas sob as condições descritas anteriormente.

### Avaliação da morfogênese

Os dados da regeneração dos explantes foram registrados ao final de 30 dias (caule) e 15-20 dias (pedicelo) do início das culturas. Os tempos de avaliação foram adotados mediante ensaios preliminares. Neste período, foram analisados: a eficiência da regeneração considerando a frequência

de regeneração (FR), número de ramos por explantes (NRE) e comprimentos dos ramos (CR) em mm. A regeneração em pedicelos, avaliada aos 15-20 dias do início da inoculação, foi feita considerando também a posição dos explantes de acordo com a parte seccionada.

### Análise estatística

Foi utilizado o delineamento experimental inteiramente casualizado, com 50 explantes em cada tratamento. Cada unidade experimental foi constituída de uma placa de Petri contendo dez explantes. Os dados obtidos no experimento foram submetidos à análise de variância. As médias comparadas pelo teste F e, ou, Tukey,  $F \leq 5\%$ .

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A morfogênese *in vitro* foi observada em crisântemo e plantas com flores apresentando

mesmos padrões e características de plantas doadoras de explantes foram obtidas a partir de caule e pedicelo. Os meios de indução de ramos R1 e R2 forneceram a maior frequência de regeneração em ramos, maior número de ramos por explante, para pedicelo e caule, respectivamente, com ramos formados por organogênese direta. Além disso, verificou-se que os reguladores de crescimento adicionados ao meio de cultivo influenciaram as respostas morfológicas quando comparados ao grupo controle (dados não mostrados).

Neste trabalho foi verificado, nos períodos de avaliação, que a fonte de explante, o tipo de explante e a interação explante e meio de cultivo afetaram significativamente a frequência de regeneração (FR) e o número de ramos por explantes (NRE) em crisântemo. O comprimento dos ramos (CR) não diferiu estatisticamente entre os tratamentos (Tabela 1).

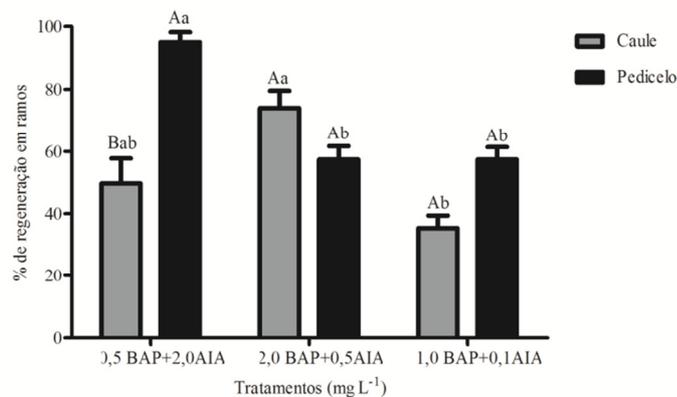
**Tabela 1.** Análise de variância do efeito do tipo de explante em combinações de BAP e AIA na organogênese *in vitro* de crisântemo (*Dendranthema grandiflora* Tzelev 'Repin Rosa')

Fonte de Variação	GL	Quadrados médios		
		FR	NRE	CR
Combinação de reguladores de crescimento	2	3557,17 **	2,88 **	0,79 <sup>NS</sup>
Explante	1	398,64 *	2,50 **	0,26 <sup>NS</sup>
Meio x Explante	2	535,34 **	2,26 **	0,97 <sup>NS</sup>
Resíduo	54	672,38	0,28	0,37
CV (%)		44,19	61,96	43,89

\*  $F \leq 5\%$ , \*\*  $F \leq 1\%$ , NS, Não-significativo; FR- Frequência de regeneração (%); NRE- Número de ramos por explantes; CR- Comprimento dos ramos (mm)

A frequência de regeneração *in vitro* foi significativamente diferente entre os explantes

caulinares e de pedicelo e depende das combinações dos reguladores de crescimento (Figura 1).

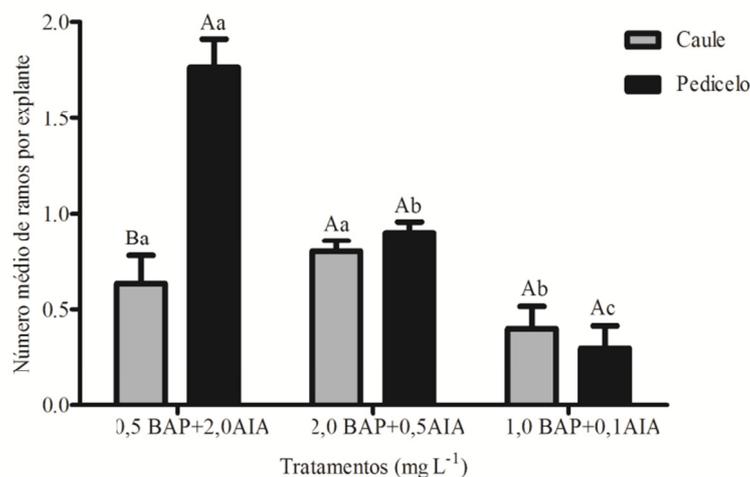


**Figura 1.** Valores médios de frequência de regeneração de ramos adventícios de crisântemo (*Dendranthema grandiflora* Tzelev 'Repin Rosa') para os explantes de caule e pedicelo em diferentes combinações de BAP e AIA (mg L<sup>-1</sup>). Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes entre explantes e minúsculas entre combinações dos reguladores diferem significativamente pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade.

Os resultados mostram que a combinação 0,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP e 2,0 mg L<sup>-1</sup> de AIA (R1) é eficaz na FR, NRE e CR para pedicelo. Além disso, o explante obtido a partir do pedicelo apresentou um aumento de 39,6% com a combinação de reguladores R1 em relação aos demais tratamentos. Para o explante caulinar destaca-se que a combinação 2,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP e 0,5 mg L<sup>-1</sup> de AIA se mostrou mais eficiente na FR e NRE. A concentração de AIA a ser utilizada para explantes caulinares deve ser igual ou superior a 0,5 mg L<sup>-1</sup> uma vez que na concentração de 0,1 mg L<sup>-1</sup> houve redução significativa na frequência de regeneração em ramos. Estes resultados são apoiados por estudos anteriores em outras variedades, onde a relação citocinina/auxina foi requerida na indução da morfogênese *in vitro* em crisântemo (ROEST; BOKELMANN, 1975; De JONG; RADEMAKER; VAN WORDRAGEN, 1993; De JONG; MERTENS; RADEMAKER, 1994; NHUT et al. 2003, JARAMILLO et al. 2008). Auxinas e citocininas são importantes no desenvolvimento *in vitro* dos explantes e estão relacionadas com a divisão celular e o crescimento do meristema

(MALAURE et al., 1991; SOUSA et al., 2007; MORAIS et al., 2012; ZANOTTI et al., 2012).

O requerimento de um estímulo exógeno na forma de regulador de crescimento para obter sucesso na regeneração foi evidente uma vez que na ausência do regulador a formação de ramos foi muito baixa ou não foi observada (dados não apresentados). O número de ramos não foi influenciado pelas combinações dos reguladores no meio de cultura para os explantes caulinares (Figura 2). Por outro lado, a presença dos reguladores de crescimento nos meios de cultivo afetou significativamente o número de ramos por explante em pedicelo com melhores resultados para a combinação 0,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP e 2,0 mg L<sup>-1</sup> de AIA. Destaca-se que o pedicelo foi mais responsivo quanto ao número médio de ramos por explante nas combinações usadas. Latado et al. (1996) observaram que o meio suplementado com 2,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP e 0,5 mg L<sup>-1</sup> de AIA proporcionou o maior número de ramos por explante, porém com avaliação em torno de 30 dias. De Jong et al. (1994) obtiveram altas frequências de regeneração com a adição de 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP e 0,1 mg L<sup>-1</sup> de AIA ao meio MS.



**Figura 2.** Valores médios do número de ramos por explante para os explantes de caule e pedicelo em combinações de BAP e AIA (mg L<sup>-1</sup>) na organogênese *in vitro* de crisântemo (*Dendranthema grandiflora* Tzelev 'Repin Rosa'. Médias seguidas de letras diferentes maiúsculas entre explantes e minúsculas entre combinações dos reguladores diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5%.

Aumentos significativos no número médio de ramos em pedicelo neste estudo foram observados concomitante com o aumento na concentração da auxina. Evans et al., (1981), por outro lado, relatam o uso das auxinas AIA ou ANA na formação de ramos em baixas concentrações (0,01 mL<sup>-1</sup>). As citocininas são importantes na indução e multiplicação de ramos de várias espécies.

Chagas et al. (2004) observaram que o uso de somente BAP foi eficiente no aumento da taxa de multiplicação de ramos por explante a partir de segmentos nodais de crisântemo. Por outro lado, efeito negativo de TDZ (Thidiazuron) no comprimento dos ramos foi observado em explantes provenientes de gemas axilares de crisântemo (SALGADO et al., 2001). Zanotti et al. (2012)

sugerem que a resposta obtida pode ser devido à variação na concentração do regulador de crescimento e ao tipo de explante utilizado.

O comprimento dos ramos, com comprimento maior que 4 mm, foi semelhante para os explantes e nas combinações de reguladores de crescimento (Dados não apresentados). Assim, os ramos dos dois explantes foram transferidos para o meio de alongamento e enraizamento e em seguida aclimatados para se verificar fenótipo das plantas,

bem como flores de plantas oriundas da cultura *in vitro*.

Para avaliar respostas diferenciais à regeneração a partir de pedicelos, esses foram seccionados longitudinalmente em duas secções, sendo que uma região seccionada estava em contato com o meio de cultivo R1. Foram observadas respostas diferenciais em relação à morfogênese, quando as duas posições da parte seccionada do pedicelo foram colocadas em contato com o meio (Tabela 2).

**Tabela 2.** Valores médios da frequência de regeneração (FR), número de ramos por explante (NRE) e comprimento dos ramos (CR) em mm, considerando duas posições em relação ao meio de cultivo na organogênese *in vitro* de crisântemo (*Dendranthema grandiflora* Tzelev 'Repin Rosa')

Posição	Variáveis		
	FR (%)	NRE	CR (mm)
1	94,0 a	1,62 a	0,59 a
2	71,4 b	0,74 b	0,42 b

As médias seguidas de pelo menos uma mesma letra na coluna não diferem entre si a 1% de probabilidade pelo teste Tukey; Posição 1 - Superfície não seccionada em contato com o meio; Posição 2 - Superfície seccionada em contato com o meio.

A superfície não seccionada cultivada em contato com o meio R1 foi a posição que resultou em maiores médias de FR, NRE e CR por explante. A posição do explante afetou significativamente a frequência de regeneração, o número de ramos por explante e o comprimento dos ramos.

Foi observado no explante caulinar alteração morfológica com aumento no tamanho nos primeiros dias de cultivo sem a formação de calo, sugerindo organogênese direta. Nesse explante, os ramos adventícios foram observados em toda região seccionada com três semanas de cultivo. Kaul et al. (1990) observaram o desenvolvimento de calos, uma semana após a inoculação; porém, os ramos adventícios só se tornaram visíveis em 2-3 semanas. Para o explante obtido de pedicelo, assim como os caulinares, houve intumescimento no explante inicial nos primeiros dias de cultivo e ausência de calo. Por outro lado, os ramos observados no explante, visivelmente mais vigorosos que nos explantes caulinares, ao longo de todo explante seccionado, foram observados logo na primeira semana de cultivo. Outros autores usando combinações de reguladores de crescimento BAP e AIA obtiveram elevado número (11,3) de ramos por explante de pedicelo porém, numa avaliação após 80 dias (ROEST; BOKELMANN, 1975).

A posição afeta a frequência de regeneração segundo Lu et al. (1990) observaram regeneração direta de explantes de 'Royal Purple' inseridos verticalmente no meio, bem como a formação de ramos após 7 dias. Latado et al. (1996) observaram que a melhor posição do explante é a superfície

seccionada em contato com o meio de cultura, obtendo em média 1,22 ramos por pedicelo em 30 dias.

As diferenças observadas, como o tempo necessário para avaliação e os resultados obtidos em cada explante, podem ser intrínsecas aos explantes e/ou do efeito da concentração dos reguladores de crescimento adicionados ao meio de cultivo. Neste trabalho foi constatado que AIA, em combinação adequada com BAP, resulta numa maior frequência de regeneração em ramos bem como aumento no número de ramos por explante. Assim, o meio de cultivo para estudos de regeneração *in vitro* com explantes caulinares é composto de 2,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP e 0,5 mg L<sup>-1</sup> de AIA; já para os explantes de pedicelo a melhor combinação é 0,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP e 2,0 mg L<sup>-1</sup> de AIA. Além disso, para estudos envolvendo transformação genética, recomenda-se utilizar o sistema de cultivo onde a superfície não seccionada do explante seja cultivada em contato com o meio.

As etapas do processo de obtenção de plantas por meio da regeneração *in vitro* de crisântemo (*Dendranthema grandiflora* Tzelev 'Repin Rosa') a partir de pedicelo estão resumidas na Figura 3. A regeneração *in vitro* tem início com a utilização de plantas axênicas que após a aclimação são fonte de explante de pedicelos até a obtenção de plantas adultas em vasos cultivadas em casa de vegetação. As flores apresentavam os mesmos padrões e características das flores das plantas doadoras de explantes. Pode-se concluir que a o tipo de explante, sua orientação em relação ao

meio de cultura bem como as combinações de reguladores de crescimento são fatores-chave

envolvidos no sucesso da regeneração de plantas de crisântemo *in vitro*.



**Figura 3.** Regeneração *in vitro* de crisântemo a partir de pedicelo. A - Plantas com aproximadamente 30 dias de idade, utilizadas para aclimação; B - Regeneração de ramos a partir de pedicelos seccionados longitudinalmente (15-20 dias de idade), cultivados em meio MS + 0,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP + 2,0 mg L<sup>-1</sup> de AIA; C - Detalhe dos ramos após 15-20 dias de idade; D - Planta de crisântemo enraizando e alongando em meio MS; E - Planta de crisântemo proveniente de meio de regeneração (MS + 0,5 mg L<sup>-1</sup> BAP + 2,0 mg L<sup>-1</sup> AIA) aclimatada e conduzida em casa de vegetação; F - Detalhe da flor de crisântemo; G - Planta controle (direita) oriunda de meio MS e planta (direita) proveniente de regeneração *in vitro* a partir de pedicelo; H - Planta controle (esquerda), planta regenerada (centro) a partir de pedicelo e planta regenerada (direita) a partir de caule.

### AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Dr. Rodrigo Rocha Latado por fornecer plantas axênicas usadas neste experimento, assim como o apoio financeiro

da CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior, Brasil) e FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais, Brasil).

**ABSTRACT:** Aiming the optimization of a regeneration protocol for chrysanthemum plants (*Dendranthema grandiflora*), experiments of regeneration *in vitro* were accomplished, stem explants and pedicel inoculated in several shoots induction mediums. The stem explants and of pedicels they were sectioned longitudinally and inoculated with the face opposed to the section in the medium of cultivation with the basic salts MS, with different concentrations and combinations of growth regulators BAP and AIA. At the end of 15-30 days of cultivation, significant differences were observed in the regeneration frequency, number of shoots for explante and in the length of the shoots among the appraised

explantes. Explants of pedicel presented potential the best to the explants stem. The pedicel explants presented larger regeneration frequencies in medium of cultivation contends basic salts of MS, with 0,5 mg L<sup>-1</sup> of BAP and 2,0 mg L<sup>-1</sup> of AIA and the explantes of stem in medium with basic salts of MS + 2,0 mg L<sup>-1</sup> of BAP and 0,5 mg L<sup>-1</sup> of AIA. They were obtained plants with flowers 45-60 days after the transfer to the vegetation house. In function of the obtained results, it can be concluded that the choice of the explant type and the medium of cultivation are factor-key involved in the success of the regeneration of plants for posterior use in experiments of genetic transformation.

**KEYWORDS:** *Dendranthema grandiflora*. Explants. Plant hormones. Regeneration *in vitro*.

---

## REFERÊNCIAS

- BARAKAT, M. N., FATTAH, R. S. A., BADR, M., EL-TORKY, M. G. *In vitro* culture and plant regeneration derived from ray florets of *Chrysanthemum morifolium*. **African Journal of Biotechnology**, Lagos, v. 9, n. 8, p. 1151-1158, Fev. 2010.
- BEN-JAACOV, J. & LANGHANS, R. Rapid multiplication of Chrysanthemum plant by stem tip proliferation. **Horticultural Science**, Czech Republic, v. 7, p. 289-290, Jan. 1972.
- BORGES, D., OLIVEIRA, M. C., PENONI, E. S., PÁDUA, T. R. P., BRAGA, F. T., PASQUAL, M. Micropragação de crisântemo (*Dendranthema grandiflora* Tzelev cv Rage) sob luz natural e artificial em diferentes concentrações do meio de cultivo. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, Lavras, v. 7, n. 1, p. 9-16, Jan-Jun. 2011.
- CHAGAS, E. A., FRÁGUAS, F. C., SILVA, E. S., PASQUAL, M., MENDONÇA, V. Multiplicação *in vitro* de crisântemo cv White Polaris. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 10, n. 1, p. 123-126, Jan-Mar. 2004.
- DE JONG, J., MERTENS, M. M. J., RADEMAKER, W. Stable expression of the *GUS* reporter gene in *chrysanthemum* depends on binary plasmid T-DNA. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 14, n. 1, p. 59-64, Jan. 1994.
- DE JONG, J., RADEMAKER, W., VAN WORDRAGEN, M. F. Restoring adventitious shoot formation on *chrysanthemum* leaf explants following cocultivation with *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Londres, v. 32, p. 263-270, Mar. 1993.
- EARLE, E. e LANGHANS, R. 1974. Propagation of *Chrysanthemum in vitro*: II. production, growth and flowerin of plantlets from tissue culture. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria. v. 99, n. 4, p. 352-358, 1974.
- GAMBORG, O. L., MILLER, R. A., OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. **Experimental Cell Research**, Londres, v. 50, p. 151-158, 1968.
- HILL, G. Shoot formation in tissues cultures of *Chrysanthemum* 'Bronze Pride'. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 21, n. 2, p. 386-389, Nov. 1968.
- HUTCHINSON, J. F., KAUL, U., MAHESWARAN, G., MORAN, J. R., CRAHAM. M. W., RICHARDS, D. Genetic improvement of floricultural crops using biotechnology. **Australian Journal Botanical**, East Melbourne, v. 40, p. 765-787, 1982.
- JARAMILLO, E., FORERO, A., CANCINO, G., MORENO, A. M., MONSALVE, L. E., ACERO, W. *In vitro* regeneration of three chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora*) varieties "via" organogenesis an somatic embryogenesis. **Universitas Scientiarum**, Bogotá, v. 13, n. 2, p. 118-127, Jul-Set. 2008.

KARIM, M., AMIN, M. N., ASADUZZAMAN, S., FARUK, H., ISLAMALAM, R. Rapid multiplication of *Chrysanthem morifolium* through *in vitro* culture. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, New York, v. 5, n. 11, p. 1170-1172, 2002.

KAUL, V., MILLER, R. M., HUTCHINSON, J. F., RICHARDS, D. Shoot regeneration from stem and leaf explants of *Dendranthema grandiflora* Tzelev (syn. *Chrysanthemum morifolium* Ramat.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Londres, v. 21, p. 221-230, Jul. 1990.

LATADO, R. R., TULMANN NETO, A., MENDES, B. M. J. Melhoramento de crisântemo (*Dendranthema grandiflora* Tzelev.) cv, Repin rosa, através da indução de mutação *in vitro*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 31, n. 7, p. 489-496, 1996.

LU, CHIN-YI, NUGENT, G., WARDLEY, T. Efficient, direct plant regeneration from stem segments of chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium* Ramat. cv. Royal Purple). **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 8, p. 733-736, 1990.

MORAIS, T. P., LUZ, J. M. Q., SILVA, S. M., RESENDE, R. F., SILVA, A. S. Aplicações da cultura de tecidos em plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, Botucatu, v. 14, n. 1, p. 110-121, Jan-Mar. 2012.

MURASHIGE, T. & SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, p. 473-497, Jul. 1962.

NHUT, D. T., TEIXEIRA, D. A., SILVA, J. A., ASWATH, C. R. The importance of the explant on regeneration in thin cell layer technology. **In Vitro Cellular and Developmental Biology**, New York, v. 11, p. 266-276, Mar-Abr. 2003.

ROEST, S. e BOKELMANN, G. S. Vegetative propagation of *Chrysanthemum morifolium* Ram. *in vitro*. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 3, p. 317-330, Dez. 1975.

SALGADO, S. M. L., CUNHA, R. L., NIELLA, G. R., TEIXEIRA, H., PASQUAL, M. Efeito da utilização de TDZ e benomy na micropropagação do crisântemo (*Dendranthema morifolium*). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 25, n. 2, p. 274-280, Mar-Abr, 2001.

SHERMAN, J., MOYER, J., DAUB, M. A. Regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation system for genetically diverse *Chrysanthemum* cultivars. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, New York, v. 123, p. 189-194, 1998.

SOUSA, C. S., MOREIRA, M. J. S., BASTOS, L. P., COSTA, M. A. P. C., ROCHA, M. A. C., HANSEN, D. S. Germinação e indução de brotações *in vitro* utilizando diferentes reguladores vegetais em mangabeira (*Hancornia speciosa*). **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, p. 276-278, Jul. 2007.

SUGIYAMA, M. Organogenesis *in vitro*. **Current opinion in Plant Biology**, Londres, v. 2, p. 61-64, Fev. 1999.

SUTTER, E. e LANGHANS, R. Abnormalities in *Chrysanthemum* regenerate from long-term culture. **Annual Botanical**, v. 48: 559-568, 1981.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant Physiology**. Redwood City, CA:Benjamin/Cummings, Publishing Company, 1991. 559p.

TEIXEIRA DA SILVA, J. Thin cell layer technology for induced response and control of rhizogenesis in chrysanthemum. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 39, p. 67-76, 2003.

ZANOTTI, R. F., SARTOR, F. R., PÔSSA, K. F., PILON, A. M., FUKUSHIMA, C. H. Fontes de explantes, reguladores e meios de cultura para indução de calogênese do pau-brasil. **Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer**, Goiânia, v. 8, n. 15, p. 962-970, Nov. 2012.

ZHAO, X. Y., SU, Y. H., CHENG, Z. J., ZHANG, X. S. 2008 Cell fate switch during *in vitro* plant organogenesis. **Journal of Integrative Plant Biology**, Carlton South, v. 50, n. 7, p. 816-824, Jul. 2008.