

EFEITOS DO NITRATO DE AMÔNIA NA MULTIPLICAÇÃO E REGENERAÇÃO DE GEMAS LATERAIS DE *Dyckia maritima* Baker – BROMELIACEAE

EFFECTS OF AMMONIUM NITRATE IN THE MULTIPLICATION AND REGENERATION OF LATERAL BUDS IN *DYCKIA MARITIMA* BAKER – BROMELIACEAE

SILVA, André Luís L. da¹; FRANCO, Elci T. H.²; BISOGNIN, Dilson A.³; DORNELLES, Eduardo B.⁴; Walter, Juline M.⁵

- NOTA TÉCNICA -

RESUMO

Gemas laterais de bromélias têm sido usadas em diversos protocolos de clonagem *in vitro*. Agrupamentos de gemas laterais de *Dyckia maritima* Baker foram obtidos por organogênese direta e utilizados como explantes para investigar os efeitos do nitrato de amônia (NH_4NO_3) sobre a multiplicação e regeneração. Foram avaliadas as concentrações de 0; 0,1; 0,25; 0,5 e 1,0 g L⁻¹ de NH_4NO_3 combinado ou não com 0,22 mg L⁻¹ de 6-furfurilammonopurina (KIN). Após 40 dias de cultivo foram avaliados o número de gemas e de brotos por grama de inóculo através do quociente entre o número de gemas finais e de brotos pela matéria fresca final. Os dados foram submetidos a análise de variância e regressão. Em presença de KIN, o aumento da concentração de NH_4NO_3 no meio de cultura reduziu o número de gemas por grama de inóculo e inibiu a brotação. Na ausência de KIN, os dados apresentaram regressões lineares positivas para o número de brotos por grama de inóculo e também para o número de gemas por grama de inóculo. O nitrato de amônia pode ser utilizado no meio de cultura em substituição do regulador de crescimento (KIN), durante a fase de multiplicação e de regeneração dos agrupamentos de gemas, conseqüentemente reduzindo o custo para a propagação massal da espécie.

Palavras-chave : nitrogenadas, bromélias, pitcairnioidea, clonagem *in vitro*.

Gemas laterais têm sido usadas com sucesso para a propagação *in vitro* de bromélias, sendo referidas por gemas laterais (PESCADOR & KOLLER, 1992; SILVA, 2005), protuberâncias (MERCIER & KERBAUY, 1992) ou brotações laterais (POMPELLI, 2002). Algumas concentrações de nitrato de amônia (NH_4NO_3) podem influenciar os níveis endógenos hormonais como por exemplo em *Eleusine coracana* (L.) Gaertn. para o qual altas concentrações de nitrato de amônia substituíram a necessidade do ácido naftalenoacético (NAA) na regeneração das plantas (PODDAR et al, 1997). Também foi verificado um elevado conteúdo de ácido indolacético (AIA) e algumas citocininas em bromélias cultivadas com nitrato de amônia (MERCIER & KERBAUY, 1998).

Concentrações de NH_4NO_3 adicionadas ao meio de cultura produziram um aumento no número de raízes em *Pitcairnia flammaea* e *Vriesia philippocoburgii* (MERCIER & KERBAUY, 1998). Na comparação das seguintes fontes de nitrogênio, glutamina e NH_4NO_3 , estes mesmos autores verificaram em *Tillandsia pohliana* que o NH_4NO_3 induziu um

acréscimo nas concentrações de citocininas e paralelamente um declínio no conteúdo de IAA, sendo que o NH_4NO_3 possuiu um melhor resultado no crescimento de *T. pohliana* sobre a matéria fresca e sobre a matéria seca. No entanto, foi observado em estudos com bromélias que dependendo do hábito da planta há uma escolha da forma de N orgânico que a planta utiliza (MERCIER & KERBAUY, 1998), pois durante a fase de regeneração de plantas de cevada provenientes de cultura de anteras foi observado um papel inibitório do NH_4NO_3 , contudo este problema foi superado com a suplementação da glutamina em vez do NH_4NO_3 (OLSEN, 1987 apud PODDAR et al., 1997).

Uma visão desafiadora têm sido proposta recentemente, a qual coloca que é possível substituir os reguladores de crescimento no meio de cultura por nutrientes orgânicos e inorgânicos (PREECE, 1995). Os reguladores de crescimento possuem um custo bastante elevado quando comparado com o nitrato de amônia. A substituição de alguns reguladores de crescimento por nitrato de amônia em protocolos de clonagem *in vitro* possibilitaria uma redução significativa nos custos de operação de uma laboratório industrial.

O objetivo deste trabalho foi verificar os efeitos do nitrato de amônia na multiplicação e regeneração de gemas laterais de *Dyckia maritima* obtidas por organogênese direta.

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Santa Maria. Os explantes utilizados foram agrupamentos de gemas laterais obtidas por organogênese direta em *D. maritima* (SILVA, 2005). As unidades experimentais foram mantidas em sala de crescimento com a temperatura de 25°C ± 2°C e fotoperíodo de 16 horas, sob intensidade luminosa de aproximadamente 14,3 µE m⁻². S⁻¹ obtidas por lâmpadas fluorescentes brancas.

Dois experimentos foram conduzidos, um com a presença de 0,22 mg L⁻¹ de KIN e o outro sem a presença de KIN. Foram utilizadas as seguintes concentrações 0; 0,1; 0,25; 0,5 e 1,0 g L⁻¹ de NH_4NO_3 . O meio basal utilizado foi o MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) adicionado de 30 g L⁻¹ de sacarose, 2 ml L⁻¹ de um complexo vitamínico constituído por 2,5 g L⁻¹ de ácido nicotínico, 2,5 g L⁻¹ de piridoxina.HCl, 0,5 g L⁻¹ de tiamina.HCl, 50 g L⁻¹ de inositol e 1 g L⁻¹ de glicina e solidificado com 6 g L⁻¹ de agar. O pH foi ajustado para 5,7.

¹ Biólogo, Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) e Bolsista do Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Científico (CNPq). Rua 10 de Abril, 305 – Bairro: Centro – Passo Fundo, RS – 99010-210 – E-mail: clonageinvitro@yahoo.com.br

² Bióloga, Dra., Professora do Departamento de Biologia, UFSM.

³ Engenheiro Agrônomo, Ph.D., Professor do Departamento de Fitotecnia, UFSM.

⁴ Acadêmico do Curso de Ciências Biológicas da Universidade Luterana do Brasil (ULBRA-CANOAS).

⁵ Acadêmica do Curso de Ciências Biológicas, UFSM.

Foram avaliadas após 40 dias de cultivo, o número de gemas por grama de inóculo representado pelo quociente entre o número de gemas ou de brotos finais pela massa final e a percentagem de sobrevivência e de regeneração dos aglomerados de gemas. Foram contados como brotos também os primórdios foliares (Figura 1).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, constituindo de 10 repetições. Os dados foram submetidos a análise de variância e regressão, conforme procedimentos do software GENES (CRUZ, 2001).

O experimento que continha $0,22 \text{ mg L}^{-1}$ de KIN seguiu uma regressão linear negativa para o número de gemas por grama de inóculo (Figura 2). A concentração de $1,0 \text{ g L}^{-1}$ de NH_4NO_3 produziu gemas com tamanhos maiores a todas as outras gemas dos outros tratamentos (observação visual). Todos os aglomerados de gemas tiveram uma taxa de 100% de sobrevivência, não foi observado nenhum efeito fitotóxico do NH_4NO_3 , porém nas concentrações mais elevadas alguns dos agrupamentos apresentaram regiões com oxidação. Nas concentrações 0 e $0,1 \text{ g L}^{-1}$ de NH_4NO_3 (na presença de KIN) houve uma baixa percentagem de regeneração (60 e 20%), respectivamente. Nas demais concentrações ($0,25$; $0,5$ e $1,0 \text{ g L}^{-1}$ de NH_4NO_3) houve inibição da regeneração de brotos. A taxa de 60% de regeneração da testemunha (sem NH_4NO_3 e $0,22 \text{ mg L}^{-1}$ de KIN) é concordante com o resultado apresentado em experimentos com KIN realizados com *D. maritima* por SILVA, (2005) o qual apresentou uma taxa de 70% de regeneração. Uma possível explicação destes efeitos negativos do NH_4NO_3 sobre a multiplicação e regeneração dos aglomerados de gemas, pode ter sido causada por um desequilíbrio hormonal de algum regulador de crescimento produzido com o auxílio do NH_4NO_3 juntamente com a presença da KIN ($0,22 \text{ mg L}^{-1}$) no meio de cultura.

No experimento desprovido de KIN, foi observado uma regressão linear positiva, tanto para o número de gemas por grama de inóculo, quanto para o número de brotos por grama de inóculo (Figura 3). A taxa de sobrevivência também foi de 100% para os agrupamentos de gemas. A percentagem de regeneração variou de 100 a 90% nos aglomerados de gemas. As informações obtidas neste último experimento sugerem que, o nitrato de amônia está relacionado com a biossíntese de alguma regulador de crescimento, por produzir resultados semelhantes com a adição de algumas citocininas, BAP e KIN (SILVA, 2005).

A concentração de $0,22 \text{ mg L}^{-1}$ de KIN (testemunha) produziu uma resposta quase cinco vezes maior do que a concentração de $1,0 \text{ g L}^{-1}$ de nitrato de amônia na ausência de KIN, no entanto uma máxima eficiência técnica não foi encontrada em função dos dados terem seguido uma regressão linear, o que sugere que concentrações maiores que $1,0 \text{ g L}^{-1}$ de nitrato de amônia possibilitariam um maior número de gemas e brotos por grama de inóculo, porém a concentração de $1,0 \text{ g L}^{-1}$ de nitrato de amônia produziu regiões com oxidação nos explantes, o que sugere um possível efeito fitotóxico em concentrações mais elevadas do que $1,0 \text{ g L}^{-1}$, pois o meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) já apresenta algumas fontes de nitrogênio, o próprio nitrato de amônia e o nitrato de potássio. A adição de concentrações exógenas de nitrato de amônia no meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) altera a razão das fontes de nitrogênio, esta razão entre as concentrações parece ser determinante do crescimento, sendo que a de amônia deve ser, no máximo, um terço da do nitrogênio total (CALDAS et al., 1999).

Dentre os experimentos testados pode se afirmar que: O aumento da concentração de nitrato de amônia na presença

de KIN diminui o número de gemas por grama de inóculo e inibe a regeneração das gemas; O aumento das concentrações de nitrato de amônia na ausência de KIN aumenta o número de gemas e de brotos; A concentração de $1,0 \text{ g L}^{-1}$ de nitrato de amônia (sem KIN) não é superior à concentração de $0,22 \text{ mg L}^{-1}$ de KIN (sem nitrato de amônia) no número de gemas e de brotos laterais por grama de inóculo.

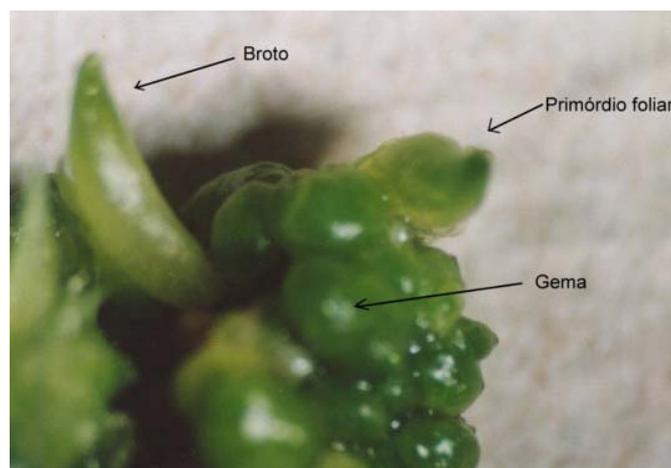


Figura 1 - Estruturas morfogênicas obtidas em aglomerados de gemas de *D. maritima*.

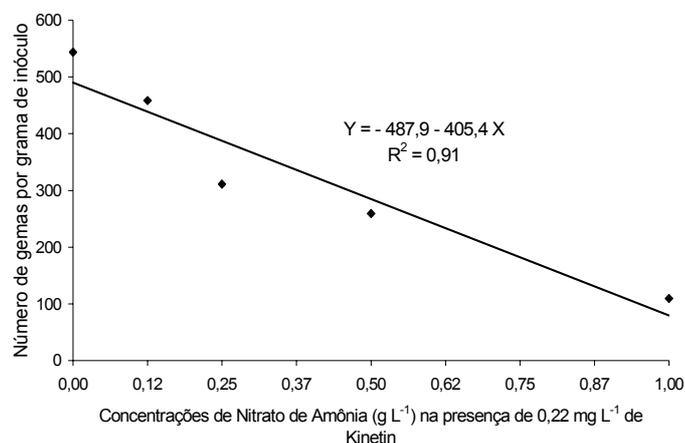


Figura 2 - Efeitos do Nitrato de Amônia no número de gemas por grama de inóculo em *D. maritima* após 40 dias de cultivo.

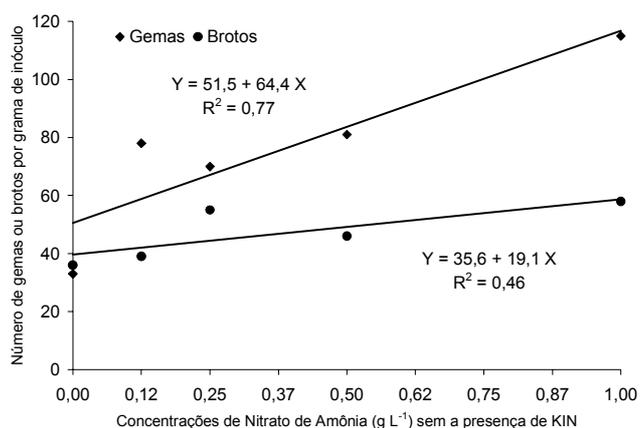


Figura 3 - Efeitos do Nitrato de Amônia no aumento do número de gemas laterais de *D. maritima* após 40 dias de cultivo.

ABSTRACT

Lateral shoots of bromeliads have been used in several protocols for *in vitro* cloning. Clusters of lateral shoots of *Dyckia maritima* Baker was obtained by direct organogenesis and used as explants to investigate the effects of the ammonium nitrate (NH_4NO_3) on the multiplication and regeneration. Concentrations of 0; 0.1; 0.25; 0.5 and 1.0 $g L^{-1}$ of NH_4NO_3 combined or not with 0.22 $mg L^{-1}$ of 6-furfurilammonopurine (KIN) were tested. After 40 days of cultivation the number of shoots and of sprouts per inocule (quotient of the number of final shoots and sprouts per final fresh matter) were evaluated. The data were submitted for the variance analysis and regression. In presence of KIN, the increase of the concentration of NH_4NO_3 in the culture medium reduced the number of shoots per gram inocule and it inhibited the sprouts. In the absence of KIN, the data presented positive lineal regressions for both the number of sprouts and shoots per gram inocule. The ammonium nitrate can be used in the culture medium in substitution of the growth regulator (KIN), during the multiplication phase and of regeneration of the clusters of shoots, consequently reducing the cost for the propagation massal of this species.

Key words : Nitrogen sources, bromeliads, pitcairnioidea, *in vitro* cloning.

REFERÊNCIAS

- CALDAS, L. S. RARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos, In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: ABCTP/EMBRAPA CNPH,1999. v. 1, p. 87-132.
- CRUZ, C. D. **Programa Genes** : versão Windows; aplicativo computacional em genética e estatística. Viçosa, MG: UFV, Imprensa Universitária,2001. 648p.
- MERCER, H.; KERBAUY, G. B. *In vitro* multiplication of *Vriesia fosteriana*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, V.30, p. 247-249, 1992.
- MERCIER, H.; KERBAUY, G. B. Endogenous IAA and Cytokinin levels in bromeliad shoots as influenced by glutamine and ammonium nitrate treatments. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Brasília, v.10, n. 3, p.225-228, 1998.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, p.473-497, 1962.
- PESCADOR, R.; KOLLER, O. C. Propagação "in vitro" do abacaxizeiro (*Ananas comosus* (L.) Merrill) cv. Pérola, **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v.14, n.2, p.1-4, 1992.
- PODDAR, K.; VISHNOI, R.K; KOTHARI, S.L. Plant regeneration from embryogenic callus of finger millet *Eleusine coracana* (L.) Gaertn, on higher concentrations of NH_4NO_3 as a replacement of NAA in the medium. **Plant Science**, Limerick, v. 129, p.101-106, 1997.
- POMPELLI, M. F. **Morfogênese in vitro, métodos de micropropagação e conservação de germoplasma de *Dyckia distachia* Hassler**. 2002 93f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Curso de Pós Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- PREECE, J. E. Can nutrient salts partially substitute for plant growth regulators ?. **Plant Tissue Culture and Biotechnology**, Rehovot, v. 1, p. 26-37, 1995.
- SILVA, A. L. L. **Micropropagação de *Dyckia maritima* Baker – Bromeliaceae**. 2005 44f. Monografia (Especialização em Biologia) – Programa de Pós-Graduação em Biologia, Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul.