

## Fontes de nitrogênio no crescimento *in vitro* de plântulas de orquídea *Cattleya loddigesii* 'Tipo'.

Araújo, Aparecida Gomes de<sup>1</sup>; Pasqual, Moacir<sup>1</sup>; Rodrigues, Filipe Almendagna<sup>1</sup>; Carvalho, Janice Guedes de<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Lavras (UFLA), Departamento de Agricultura (DAG), Lavras-MG. Caixa Postal 3037, CEP: 37.200-000. email: agaraujo2003@hotmail.com, mpasqual@ufla.br; <sup>2</sup> Universidade Federal de Lavras (UFLA), Departamento de Ciências do Solo (DCS), Lavras-MG. Caixa Postal 3037, CEP: 37.200-000. email:janicegc@ufla.br

### INTRODUÇÃO

O meio de cultura utilizado na micropropagação é um fator determinante para o sucesso do cultivo *in vitro* de orquídea. A fonte de sais minerais fornecida aos explantes é extremamente importante, assim como sua concentração. O nitrogênio é um dos principais nutrientes essenciais e ativos, sendo absorvido principalmente, na forma de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) e amônio ( $\text{NH}_4^+$ ). Por ser constituinte de várias biomoléculas essenciais, como aminoácidos, ácidos nucleicos, proteínas, enzimas e outros, sua assimilação se dá em diversos processos metabólicos da planta (Sakuta, 1987).

O efeito das diferentes formas inorgânicas sobre o crescimento e o desenvolvimento em cultura de tecidos é marcante: o nitrato, como única fonte de nitrogênio, sustenta boa taxa de crescimento em muitas espécies, sendo também a melhor forma de nitrogênio para algumas culturas, tais como cenoura, roseira e várias outras espécies. No entanto, há espécies que não crescem bem com presença de nitrato no meio de cultura, como por exemplo, calos de arroz, indicando que este tecido é incapaz de utilizar o nitrato como fonte de N (Caldas et al., 1998).

Mercier & Kerbauy (1998), comparando fontes de nitrogênio (glutamina e  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) em *Tillandsia pohliana* (Bromeliaceae), verificaram que  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  induziu acréscimo nas concentrações de citocininas e, paralelamente, declínio no conteúdo de ácido indol acético (AIA). Além disso, proporcionou maiores massas fresca e seca em plântulas.

Outro elemento, o cálcio, desempenha papel importante na morfogênese, por causa da interação com substâncias reguladoras de crescimento. Parece haver associação entre o cálcio e as citocininas, principalmente nas áreas onde está ocorrendo diferenciação. O cálcio auxilia na desintoxicação de altas concentrações de outros elementos minerais na planta e exerce também função estrutural (atuando na formação da parede celular) e nos processos de divisão celular (Arruda, 2000).

Embora as orquídeas sejam objeto de muita pesquisa, existem poucos trabalhos realizados no cultivo *in vitro* dessa espécie na tentativa de se estudar fontes de nitrogênio de fácil aquisição em substituição e/ou redução ao nitrato de amônio, cuja comercialização é controlada pelo exército.

Diante do exposto, o presente trabalho teve o objetivo de otimizar o crescimento *in vitro* de plântulas de *Cattleya loddigesii* 'Tipo', avaliou-se o efeito de concentrações de nitrato de cálcio ( $\text{CaNO}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) e nitrato de amônio ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) adicionadas ao meio Wood Plant Medium (WPM).

### MATERIAL E MÉTODOS

Plântulas de *Cattleya loddigesii* 'Tipo', oriundas de sementes germinadas *in vitro*, com 1,0 cm de comprimento e com raízes, foram inoculadas em frascos com capacidade para 250 cm<sup>3</sup>, contendo 60 mL de meio de cultura. Após um ensaio prévio, determinou-se o melhor meio para essa espécie como sendo o Wood Plant Medium (WPM) de Lloyd & McCown (1980).

Os tratamentos consistiram de concentrações de nitrato de cálcio (0, 278, 556, 834 e 1112 mg L<sup>-1</sup>) e de nitrato de amônio (0, 200, 400, 600 e 800 mg L<sup>-1</sup>) em todas as combinações possíveis. O meio foi acrescido de 2% de sacarose, 15% de polpa de banana

'Nanica' madura, 0,2% de carvão ativado, solidificado com 0,6% de ágar e pH ajustado para  $5,7 \pm 0,1$ , antes da autoclavagem, a  $121^\circ\text{C}$  e  $1,5 \text{ atm}$ , por 20 minutos.

Após a inoculação, os explantes foram transferidos para sala de crescimento a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , fotoperíodo de 16 horas e  $35 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  de intensidade luminosa, onde permaneceram por 90 dias. Os parâmetros analisados foram: número de folhas, número de raízes, número de brotos, comprimento da parte aérea (cm), comprimento de raiz (cm) e massa seca de plântulas (g).

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial  $5 \times 5$ , com cinco repetições de 5 plântulas cada. Os dados foram submetidos à análise de variância e comparados por regressão polinomial, com auxílio do programa Sisvar (Ferreira, 2000).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os parâmetros avaliados número de folhas, de brotos e de raízes apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos. A interação foi significativa para número de folhas e raízes, enquanto o fator nitrato de amônio foi significativo apenas para número de brotos. As demais variáveis não apresentaram diferenças entre os tratamentos.

Para número de folhas, houve significância da interação. Apenas a concentração de  $400 \text{ mg L}^{-1}$  de nitrato de amônio combinada com concentrações de nitrato de cálcio influenciaram essa variável. Melhores resultados foram observados com a utilização de  $400 \text{ mg L}^{-1}$  ( $5 \text{ mM L}^{-1}$ ) de nitrato de amônio, na ausência de nitrato de cálcio (Figura 1), ocorrendo a formação média de 9,14 folhas por explante. Essa concentração de nitrato de amônio corresponde à concentração original do meio WPM.

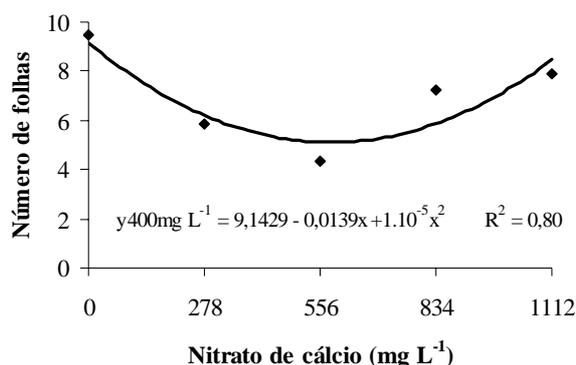


Figura 1 Número de folhas em plântulas de *Cattleya loddigesii* 'Tipo' cultivadas em meio WPM contendo diferentes concentrações de nitrato de cálcio e  $400 \text{ mg L}^{-1}$  de nitrato de amônio.

Observou-se que não há necessidade da utilização de nitrato de cálcio no meio WPM para estimular emissão de folhas. Contudo, o meio WPM contém uma outra fonte de cálcio, o cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ). No entanto, Kanashiro (2005) recomenda a utilização de  $9,38 \text{ mM L}^{-1}$  de nitrato de cálcio [ $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ] como fonte de cálcio a ser adicionada ao meio líquido MS modificado em vez de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , para crescimento *in vitro* de *Aechmea blanchetiana* (Bromeliaceae).

À medida que houve incremento nas doses de nitrato de cálcio, registrou-se redução no número de folhas até a concentração de  $695 \text{ mg L}^{-1}$ , a partir da qual verificou-se aumento crescente do número de folhas (6,05) até a dose máxima utilizada ( $1112 \text{ mg L}^{-1}$ ).

A interação foi significativa, sendo que, apenas a dose de  $600 \text{ mg L}^{-1}$  de nitrato de amônio em combinação com as concentrações de nitrato de cálcio tiveram influência para essa variável. Maior número de raízes (4,3) foi verificado com  $600 \text{ mg L}^{-1}$  ( $7,5 \text{ mM L}^{-1}$ ) de nitrato de amônio (1,5 vez a concentração original do meio WPM) e  $278 \text{ mg L}^{-1}$  ( $1,18 \text{ mM L}^{-1}$ )

de nitrato de cálcio, que corresponde à metade da concentração original do meio WPM (Figura 2). A partir desse ponto, houve decréscimo no número de raízes. Essa tendência, provavelmente, indica que, para essa variável, uma menor relação  $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$  é necessária, para se obter melhores resultados.

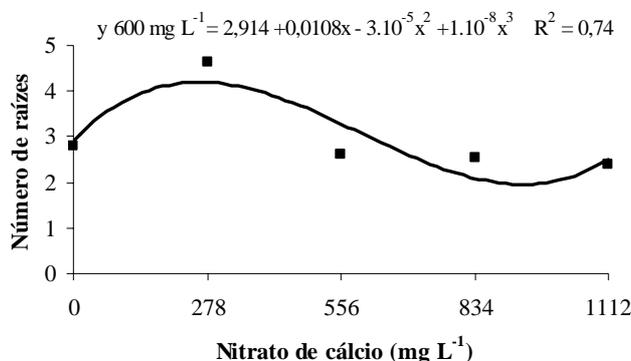


Figura 2 Número de raízes em plântulas de *Cattleya loddigesii* 'Tipo' cultivadas em meio WPM contendo diferentes concentrações de nitrato de cálcio e 600 mg L<sup>-1</sup> de nitrato de amônio.

Araújo et al. (2005) e Mercier & Kerbauy (1998) verificaram que concentrações crescentes de amônio favoreceram aumento no número de raízes em orquídea e aumento no número de raízes em *Pitcairnia flammea* e *Vriesia philippocoburgii*, respectivamente. Segundo Pasqual (2001), a emissão de novas raízes é favorecida pelos nutrientes cálcio e boro.

Embora algumas espécies cresçam *in vitro* na presença apenas de nitrato, a maioria dos explantes derivados de plantas intactas, tecidos e órgãos, incorpora nitrogênio e cresce mais rapidamente em soluções contendo íons nitrato e amônia do que na presença de apenas uma dessas fontes (Pasqual, 2001).

Para número de brotos, não houve interação dos fatores testados, apenas para a adição de nitrato de amônio. O maior número de brotos (1,76) foi obtido com 450 mg L<sup>-1</sup> (5,6 mM L<sup>-1</sup>) de nitrato de amônio (Figura 3), concentração próxima à original (400 mg L<sup>-1</sup>) utilizada no meio WPM. Na ausência de nitrato de amônio foi registrado 1,38 broto por explante.

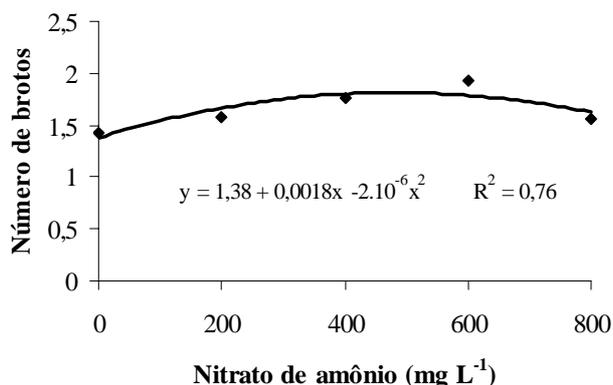


Figura 3 Número de brotos formados em plântulas de *Cattleya loddigesii* 'Tipo' sob diferentes concentrações de nitrato de amônio acrescidas ao meio WPM.

A diferença de 0,38 brotos observada entre os tratamentos com 0 e 450 mg L<sup>-1</sup> de nitrato de amônio pode ser explicada, provavelmente, pelo fato de a polpa de banana ter suprido grande parte do nitrogênio utilizado pelo explante, na ausência de nitrato de amônio.

Mercier & Kerbauy (1991) constataram que distintas fontes de nitrogênio provocam diferenças nas taxas de síntese de certas substâncias, como 2iP, zeatina e clorofila, assim como na atividade metabólica e no desenvolvimento de protocormos de orquídeas.

O estudo de diferentes concentrações de nitrato de amônio e nitrato de cálcio em meio WPM altera a razão das fontes de nitrogênio  $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ . Esta razão parece ser determinante no crescimento *in vitro*, devendo o amônio ser, no máximo, 1/3 do N total. Esse desequilíbrio de íons pode ter influenciado os resultados obtidos no presente estudo.

## CONCLUSÕES

Para o crescimento *in vitro* de plântulas de *Cattleya loddigesii* 'Tipo', recomenda-se a utilização do meio de cultura WPM em sua formulação original, sem o nitrato de cálcio. O enraizamento é favorecido com a utilização de 600 mg L<sup>-1</sup> de nitrato de amônio e 278 mg L<sup>-1</sup> de nitrato de cálcio.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq pela concessão de bolsa de estudo ao primeiro autor e à FAPEMIG pelo apoio financeiro.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO, A. G.; PASQUAL, M.; RODRIGUES, V. A.; SILVA, A. B.; SOARES, G. A. Concentração de  $\text{KNO}_3$  e  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  no crescimento *in vitro* de plântulas de orquídea. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, Lavras, MG, v. 1, n. 1, p. 31-36, 2005.

ARRUDA, S. C. C. **Efeito do cálcio na indução de embriogênese somática de *Eucalyptus urophylla***. 2000. 74 p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformações genéticas de plantas**. Brasília: EMBRAPA/CNPq, 1998. p. 87-132.

FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., São Carlos, 2000, **Anais...** São Carlos: UFSCar, 2000. p. 255-258.

KANASHIRO, S. **Nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio e o crescimento de plântulas de *Aechmea blanchatiana* (Baker) L. B. Smith *in vitro***. 2005. 187 p. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. **International Plant Propagation Society Proceedings**, Washington, v. 30, p. 421-427, 1980.

MERCIER, H.; KERBAUY, G. B. Effects of nitrogen source on growth rates and levels of endogenous cytokinins and chlorophyll in protocorms of *Epidendrum fulgens*. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 138, n. 2, p. 195-199, June 1991.

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**, Londrina, v. 10, n. 3, p. 225-228, set./dez. 1998.

PASQUAL, M. **Cultura de tecidos vegetais: meios de cultura**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2001. 74 p.

SAKUTA, M. Effects of sucrose source on betacyanin accumulation and growth in suspension cultures of *Phytolacea americana*. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 71, p. 459-463, 1987.

PALAVRAS-CHAVES: Orchidaceae, *Cattleya*, nitrato de cálcio, nitrato de amônio, micropropagação.