

EFEITO DE DIFERENTES NÍVEIS DE NITROGÊNIO, EM PRESENÇA OU AUSÊNCIA DE BENZILAMINOPURINA, NA MULTIPLICAÇÃO DE GÉRBERA (*Gerbera sp.*) DE VASO

AURORA YOSHIKO SATO¹

JOSÉ EDUARDO BRASIL PEREIRA PINTO²

AUGUSTO RAMALHO DE MORAIS³

OSMAR ALVES LAMEIRA⁵

NILMAR EDUARDO ARBEX DE CASTRO⁴

RESUMO – Para testar diferentes níveis de nitrogênio no meio básico de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962), em presença e ausência de benzilaminopurina (BAP), na micropropagação da gérbera (*Gerbera sp.*), foi utilizado o clone II, uma planta de vaso. A indução de brotação em plântulas desse clone foi superior em meios

de cultivo com 39,40mM de nitrogênio suplementado com 2mg/L de BAP. Houve uma interação entre esse regulador de crescimento e a relação de nitrogênio, não ocorrendo indução de brotações sem BAP. As matérias fresca e seca aumentaram linearmente em relação à concentração de nitrogênio.

TERMOS PARA INDEXAÇÃO: BAP, multiplicação in vitro, gérbera, *Gerbera sp.*

EFFECT OF NITROGEN CONCENTRATION AND OF BENZYLAMINOPURINE ON MICROPROPAGATION OF POTTED GERBERA (*Gerbera sp.*)

ABSTRACT – A clone II was used to test nitrogen concentration on Murashige & Skoog (1962) medium – MS, supplemented or not with BAP, on micropropagation of Gerbera. The best multiple shoot formation for clone II was promoted with 2mg/L BAP

and 39.40mM of nitrogen. There was interaction between nitrogen and growth regulator on shoot multiplication. Fresh and dry weight of clone II were linearly correlated with nitrogen concentration.

INDEX TERMS: BAP, in vitro multiplication, gerbera, *Gerbera sp.*

INTRODUÇÃO

Há trabalhos com gérbera pelos quais demonstra-se a possibilidade de formação de plantas à partir de capítulos florais, gemas axilares, folhas e óvulos inférteis. Em todos esses métodos de estabelecimento e multiplicação, tem sido imprescindível o uso de citocininas. Dentre estas, a benzilaminopurina (BAP) tem sido a mais utilizada, tanto para regeneração quanto para multiplicação. Segundo Hedtrich (1979) e Sitbon (1981), o intervalo de concentração normalmente usado varia de 1 a 20 mg/L. Não só os reguladores de crescimento afetam o processo de regeneração, mas também os demais componentes do meio de cultura podem afetar a

morfogênese in vitro. Nesse contexto, os hormônios vegetais e o nitrogênio são essenciais para a diferenciação e crescimento do explante *in vitro*. As atenções têm-se voltado para o nitrogênio e, em especial, ao nitrogênio reduzido (Ammirato, 1985).

Bespalhok et al. (1993) estudaram a influência da concentração de nitrato de amônio na brotação de *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertonil in vitro e constataram que a concentração desse sal utilizado no meio MS (Murashige & Skoog, 1962) mostrou-se tóxica e obtiveram maior indução de brotações usando 1/4 da dose

1. Engenheira Agrônoma, Dra.

2. Engenheiro Agrônomo, PhD, Professor Titular, Departamento de Agricultura da UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS (UFLA), Cx. P. 37, 37200.000 - Lavras-MG. E-mail jeduardo@ufla.br

3. Engenheiro Agrônomo, Dr., Professor Adjunto, Departamento de Ciências Exatas/UFLA.

4. Engenheiro Agrônomo, Mestrando na UFLA.

5. Engenheiro Agrônomo, Dr., EMBRAPA – CPATU.

nitrito de amônio recomendado pelo meio MS. Todavia, não foi possível concluir se o aumento do número de brotos ocorreu por causa da diminuição da quantidade de nitrogênio ou em virtude do aumento da relação entre nitrito e amônio.

Uma das razões para a importância do nitrogênio reduzido no metabolismo vegetal é a participação da amônia na rota primária de síntese de compostos orgânicos importantes (Grey et al., 1987). O nitrogênio é, algumas vezes, absorvido pelas plantas na forma orgânica, mas geralmente é suplementado na forma de íons NH_4^+ e NO_3^- . Embora a maioria das plantas prefira o NO_3^- ao NH_4^+ , em alguns casos observa-se o oposto. Portanto, é necessário encontrar o balanço adequado entre $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ para um ótimo crescimento e desenvolvimento in vitro.

Na cultura da batata, Cao & Tibbitts (1992), usando misturas de $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ (0:100%, 20:80%, 40:60%, 60:40%, 80:20% e 100:0%), perfazendo um total de 4 mM de N, constataram que os tratamentos contendo a mistura de nitrito e amônio aumentaram significativamente o peso de matéria seca e área foliar, quando comparados aos tratamentos contendo somente NO_3^- ou NH_4^+ . Na presença de NO_3^- , as plantas cresceram melhor, em relação à NH_4^+ , além de apresentarem maiores concentrações de Ca, Mg, Fe e Mn. Já as concentrações de P, S, Cl, B, Zn e Cu nas brotações diminuíram com o uso exclusivo de NO_3^- .

Com este trabalho objetivou-se avaliar a concentração do nitrogênio, na presença e ausência da citocinina BAP, na multiplicação de gérbera (*Gerbera* sp.) de pote (ou vaso) utilizando-se brotos.

MATERIAL E MÉTODOS

Utilizaram-se plântulas de gérbera de vaso (Clone II) com dois folíolos e aproximadamente 10 mm de comprimento. Os tratamentos constaram de diferentes níveis de nitrogênio no meio de cultura na presença e na ausência da citocinina benzilaminopurina (BAP). Para tal, variaram-se as concentrações de nitrito de amônio (20,60mM) da solução original do meio de cultura básico MS (Murashige & Skoog, 1962), conforme a Tabela 1. O pH da solução básica do meio MS foi ajustado para 6,0,

adicionando-se, em seguida, 6g/L de ágar (ágar-ágar DAB-6 Merck) e autoclavado por 20 minutos a uma temperatura de 121°C à pressão de 1 atm.

As plântulas foram inoculadas em câmaras de fluxo laminar horizontal em condições estéreis, em tubo de ensaio de 150x20mm, num volume de 15mL por tubo. Em seguida, as mesmas foram transferidas para a sala de crescimento com um fotoperíodo de 16/8 h (luz/escuro) e irradiância de $25\mu\text{moles}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, proporcionada por tubos fluorescentes Osram Universal 20W Luz do dia especial, temperatura de $26 \pm 1^\circ\text{C}$. Após 30 dias, avaliaram-se o número de brotos e o comprimento dos mesmos, bem como o peso fresco e seco. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com os tratamentos dispostos em um esquema fatorial 2×6 , em que os fatores foram BAP e dosagens de nitrogênio variando a concentração de nitrito de amônio, com 5 repetições e 4 plântulas por repetição.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Número de brotos

A otimização da brotação em explantes do clone II de gérbera foi dependente da presença de BAP e concentrações de nitrogênio no meio de cultura (Figura 1). Barbosa (1991) também verificou que a gérbera de corte, cultivar *appelbloesem*, requer citocinina (BAP) para regeneração de brotações adventícias; nesse caso, foram utilizados 60 mM de nitrogênio.

O crescimento e a morfogênese foi marcadamente influenciados pela disponibilidade e pela forma na qual o nitrogênio foi fornecido ao explante. Nos tratamentos com ausência de BAP não houve brotação, mesmo variando as dosagens de nitrogênio. Os dados indicam que há uma possível interação do nitrogênio com o BAP para maior formação de brotos em plântulas do clone II de gérbera. A dosagem de 39,40 mM de nitrogênio total na presença de BAP, que corresponde à metade da concentração de nitrito de amônio do meio MS (10,3 mM NH_4NO_3) e a uma relação $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ de 2,82, induziu maior número de brotações. Em um trabalho preliminar, utilizando como genótipos os clones III e 800X de gérbera de vaso, as respostas em relação ao número de brotações foram diferentes. Para o clone III, a dosagem de 29,10 mM de nitrogênio total na presença de BAP corresponde a 1/4 da concentração de nitrito de amônio do meio MS (5,15 NH_4NO_3) e a uma relação

NO_3/NH_4 de 4,65, induzindo maior número de brotações. total, correspondendo a 1/8 da concentra-
Para o clone 800X, a dosagem de 23,94 mM de nitrogênio

TABELA 1 - Concentração de NH_4NO_3 , NO_3^- , NH_4^+ , N total e relação NO_3/NH_4 , com ou sem 2 mg/L da citocinina BAP, para gérbera Clone II.

Tratamentos		NH_4NO_3 (mM)	NO_3^- (mM)	NH_4^+ (mM)	N Total	Relação
Sem BAP	Com BAP					$\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$
T ₁	T ₇	0	18,80	0	18,80	-
T ₂	T ₈	2,57	21,37	2,57	23,94	8,32
T ₃	T ₉	5,15	23,90	5,15	29,05	4,65
T ₄	T ₁₀	10,30	29,10	10,30	39,40	2,82
T ₅	T ₁₁	15,45	34,25	15,45	49,70	2,21
T ₆	T ₁₂	20,60	39,40	20,60	60,00	1,91

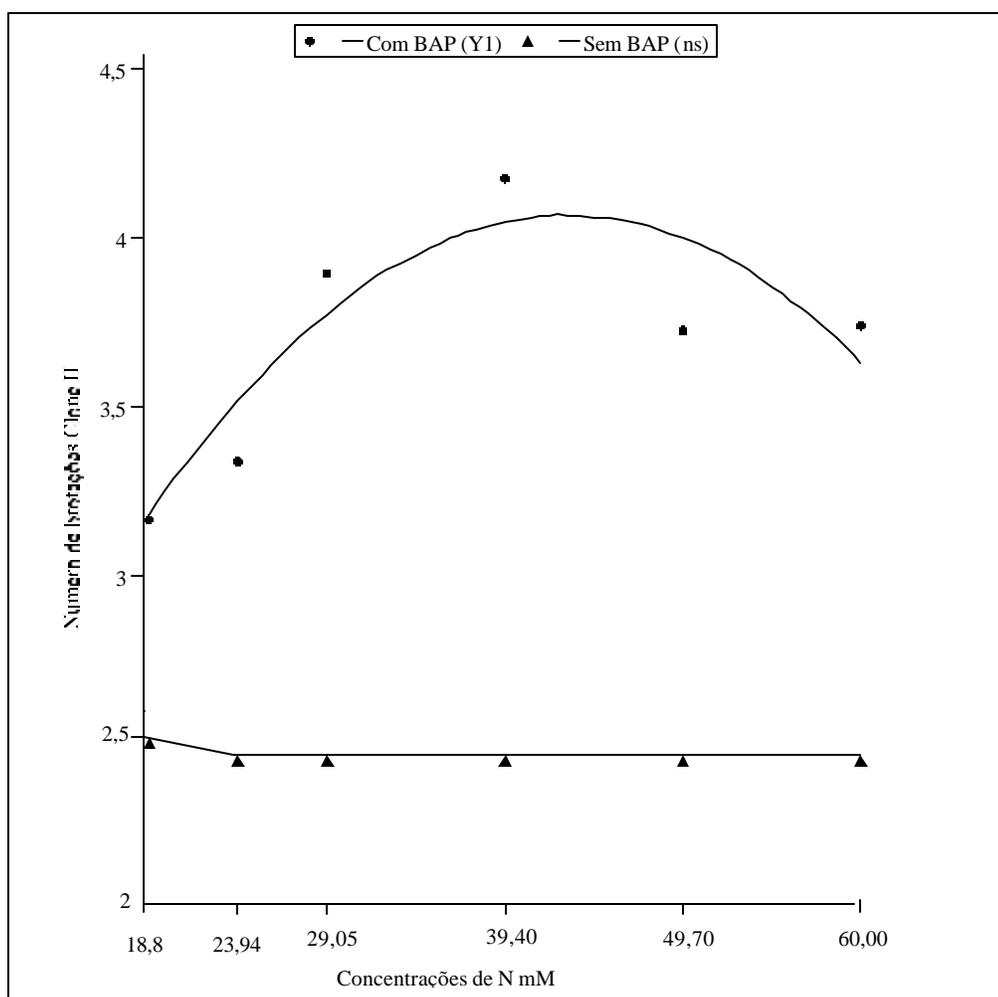


FIGURA 1 - Efeito das concentrações de N na forma de NH_4NO_3 sobre o número de brotações de gérbera de vaso Clone II, com e sem BAP no meio de cultura.

ção de nitrato de amônio do meio MS ($2,57 \text{ NH}_4\text{NO}_3$) e a uma relação NO_3/NH_4 de 8,32, induziu maior número de brotações, na presença de BAP. Os resultados mostraram uma inibição da brotação na concentração de NH_4NO_3 do meio MS, sendo a formação de brotos melhorada em presença de uma boa relação entre NO_3 e NH_4 . Apartir de determinados níveis de nitrogênio, o número de brotações diminuiu, mostrando que a concentração de N no meio de MS foi tóxico, inibindo a indução de brotações (Figura 2).

Conforme Bepalhok et al. (1993), o nitrogênio também foi tóxico para formação de brotos em explantes de *Stevia rebaudiana*. Segundo os autores, foi importante a diminuição de NH_4NO_3 do MS para 5,15 mM para otimizar a indução de brotações. Pelos resultados, verifica-se a necessidade de reduzir a concentração de NH_4NO_3 de 20,6 mM para 10,3 mM (clone II), 5,15 mM (clone III) e 2,5 mM (clone 800X) para induzir maior número de brotação. Esse resultado é confirmado em várias espécies de ornamentais, como *Heliconia* spp. (Nannetti et al., 1994) e cravo (Cuzzuol et al., 1993).

Pelos resultados obtidos, infere-se que a interação entre o BAP e o nitrogênio são importantes

para induzir brotos adventícios. Entretanto, não se pode afirmar que esse aumento do número de brotos seja devido à concentração do nitrogênio, ou devido à relação nitrato e amônio. Esses resultados mostram que a concentração de nitrogênio reduziu de 60 mM para 39,40 mM (clone II), 20,10 mM (Clone III) e 23,95 mM (clone 800X) e a relação de nitrato e amônio aumentou de 1,91 para 2,82 (clone II). Os dados mostram ainda que há uma diferença de respostas para número de brotações em relação ao nitrogênio e à relação NO_3/NH_4 . O Clone 800X responde melhor do que o clone II em menores concentrações de nitrogênio. Entretanto, a relação NO_3/NH_4 é aumentada entre os clones de 2,82 (clone II) para 8,32 (clone 800X). A redução de nitrogênio do clone II para o clone 800X é de 1,5x (39,40 mM para 23,95 mM); em compensação, a relação NO_3/NH_4 é aumentada em três vezes (2,82 para 8,32). Outros trabalhos mostraram um aumento da indução em brotos com a redução na concentração de nitrogênio (Welandar, 1979; Wainwright & Flegmann, 1985; Geir, 1986; Gertsson, 1988; Bepalhok et al., 1993), sobretudo quando se aumentou a relação nitrato/amônia (Zens & Zimmer, 1986).

N TOTAL	18,80	23,94	29,05	39,40	49,70	60,00
NH_4NO_3 (mM)	0	2,57	5,15	10,30	15,45	20,60
- BAP (0mg/L)						
+ BAP (2,0mg/L)						
$\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$	-	8,32	4,62	2,82	2,21	1,91

FIGURA 2 - Efeito das concentrações de N e de NH_4NO_3 sobre o número de brotações de gérbera de vaso Clone II, com e sem BAP no meio de cultura.

Isso implica que a taxa entre os dois íons NO_3 e NH_4 necessitam ser ajustados para cada espécie ou mesmo variedade e que a concentração de nitrogênio é muito importante em determinar o crescimento e a morfogênese *in vitro*.

Matéria fresca e seca da parte aérea

A matéria fresca e seca do clone II apresentou-

se significativamente maior quando se adicionou BAP ao meio de cultivo. Na presença desse regulador de crescimento, os pesos da matéria fresca e da matéria seca foram respectivamente 3 e 2,3 vezes superiores, se comparados com os tratamentos com ausência de BAP (Tabela 2). Quanto aos efeitos dos níveis de nitrato de amônio sobre a matéria fresca e seca, houve um aumento linear ao se elevar as dosagens desse sal (Figura 3).

TABELA 2 - Valores médios de matérias fresca e seca da parte aérea de gérbera de pote, Clone II em função da ausência e presença de BAP (2 mg/L).

Tratamentos	Matéria Fresca PA (mg)	Matéria Seca PA (mg)
Com BAP	391,8 a*	130,5 a*
Sem BAP	130,3 b	57,7 b

* significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

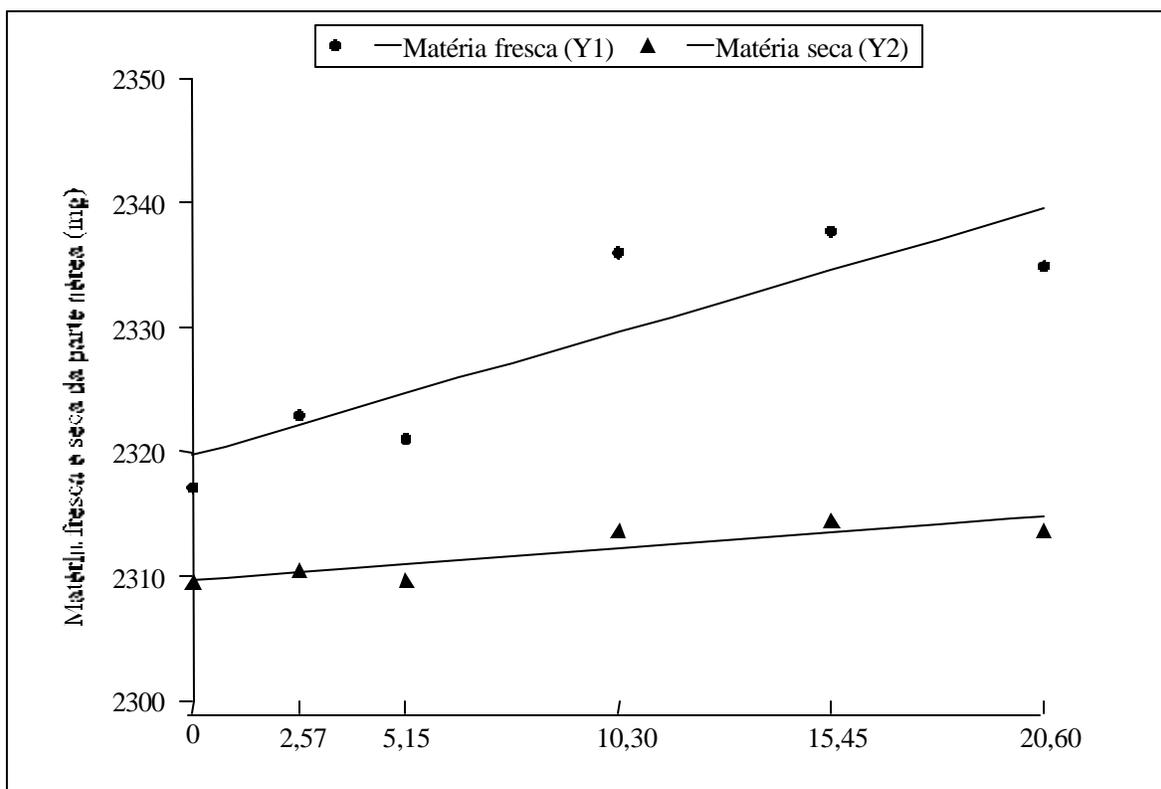


FIGURA 3 - Efeito das concentrações de N na forma de NH_4NO_3 sobre os pesos das matérias fresca e seca da parte aérea de gérbera de vaso Clone II.

Conforme Esashi & Leopold (1969), as citocininas são importantes no incremento de matéria fresca na cultura de tecidos de tabaco e cotilédones e *Xanthium pensylvanium* Wallr.. A mesma conclusão foi obtida para o clone II, em que o BAP foi determinante no incremento de matéria fresca e seca, não só por aumentar o número de brotações, mas também por induzir o intumescimento na base dos brotos. Rayle et al. (1982) verificaram que a citocinina estimulou o crescimento de cotilédones de abóbora, provocando aumento na matéria fresca e seca. Tepfer & Fosket (1978), estudando células de soja cultivadas com citocininas, provaram, pela análise de poliribossomos, que a citocinina regula a síntese protéica, provocando um incremento de massa vegetal.

A adição de nitrogênio provocou incremento de matéria fresca e seca para o clone II, em que os máximos se aproximaram das dosagens com maior e menor número de brotos. O aumento no peso fresco com menor número de brotos deveu-se à presença de

entumescimento na base do explante, indicando o início da calogênese.

Comprimento da parte aérea

Com respeito a esse caráter, os tratamentos com ausência de BAP aumentaram de modo marcado o tamanho dos brotos, se comparados com os tratamentos que apresentam essa citocinina (Tabela 3). Isso se deve ao efeito inibitório do BAP no crescimento e desenvolvimento da plântula, induzindo maior número de brotos, mas com tamanho pequeno. Arello (1991) também observou que, na ausência de BAP, a *Kielmeyera coriacea* Mart. apresentou maior comprimento das brotações. Foi observada a indução de raiz apenas no tratamento sem citocininas, mostrando o seu efeito inibitório neste processo.

A concentração de nitrogênio total e a concentração de NH_4NO_3 no meio de cultura não foram significativas ao comprimento da parte aérea de gérbera de vaso (Tabela 3).

TABELA 3 - Comprimento de gérbera de pote, com e sem BAP, em função das dosagens de nitrogênio, para o Clone II.

NH_4NO_3 (mM)	N Total (mM)	Comprimento de Parte Aérea (mm)	
		Com BAP	Sem BAP
0,00	18,80	15,6	27,7
2,57	23,95	14,6	31,2
5,15	29,10	12,5	25,2
10,30	39,40	16,1	27,9
15,45	49,70	18,0	31,2
20,60	60,00	16,7	27,6
Média		15,6 b*	28,4 a*

* significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

CONCLUSÕES

- a) Houve diferenças de resposta quanto ao número de brotações entre as concentrações de nitrogênio.
- b) A concentração de 60 mM de nitrogênio inibiu a brotação.
- c) A melhor concentração de nitrogênio para formação de brotos no clone II foi de 39,40 mM.
- d) A melhor relação NO_3/NH_4 para o clone II foi de 2,82.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMMIRATO, P. V. Patterns of development in culture. In: HENKE, R. R.; HUGHES, K. W.; CONSTANTIN, M. J.; HOLLAENDER, A. (Ed.). **Tissue culture in forestry and agriculture**. New York: Plenum Press, 1985. p. 9-29.
- ARELLO, E. F. **Aspectos gerais do comportamento in vitro de *Kielmeyera coriacea* Martins (Guttiferae): produção e enraizamento de brotações**. 1991. 148 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras.
- BARBOSA, M. H. P. **Propagação in vitro de *Gerbera jamesonii* Bolus ex Hook através de capítulos jovens**. 1991. 48 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras.
- BESPALHOK, J. C. B. F.; VIEIRA, L. G. E.; HASHIMOTO, J. M. Fatores influenciando a micropropagação in vitro de gemas axilares de *Stevia rebaudiana* (Bert) Bertonil. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Brasília, v. 4, n. 1, p. 59-61, jul. 1993.
- CAO, W.; TIBBITTS, T. W. NH_4/NO_3 . Mixtures enhance growth in potatoes. **HortScience**, Alexandria, v. 27, n. 6, p. 177, May 1992.
- CUZZUOL, G. R. F.; GALLO, L. A.; CROCOMO, O. J. Nitrogênio, cálcio e atividade da peroxidase na vitrificação do cravo (*Dianthus caryophyllus*) in vitro. In: ENCONTRO BRASILEIRO DE BIOTECNOLOGIA VEGETAL, 1., 1993, Brasília. **Programa e resumos...** Brasília: EMBRAPA, 1993. p. 35.
- ESASHI, T.; LEOPOLD, A. C. Cotyledon expansion as a bioassay for cytokinins. **Plant Physiology**, Washington, v. 44, n. 4, p. 618-620, Apr. 1969.
- GEIR, T. Factors affecting plant regeneration from leaf segments of *Anthyrium scherzerianum* Shoot (Araceae) culture in vitro. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v. 6, p. 115-125, July 1986.
- GERTSSON, O. E. Influence of macronutrient composition, TIBA, and dark treatment on shoot formation and nitrogen content in petiole explants of senecio x hybrid. **Journal of Horticultural Science**, London, v. 63, n. 1, p. 497-502, May 1988.
- GREY, D.; STEPAN-SARKISSIAN, B.; POWCER, M. N. Biochemistry of forest tree species in culture. In: BONGA, J. M.; DURZAN, D. J. (Ed.). **Cell and tissue culture in forestry**. Dordredt: Cluwer Academic, 1987. v. 2, p. 31-60.
- HEDTRICH, C. M. Production of shoots from leaves and production of *Gerbera jamesonii*. **Gartenbauwissenschaft Weihenstephan**, Berlin, v. 44, n. 1, p. 1-3, Jule 1979.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 1, p. 473-497, Sept. 1962.
- NANNETTI, D. C.; SATO, A. Y.; PINTO, J. E. B. P. Efeito de diferentes níveis de nitrogênio e cálcio, combinados com BAP e TDZ no desenvolvimento de *Heliconia* spp. in vitro. In: CONGRESSO DE PÓS-GRADUAÇÃO DA ESAL, 7., 1994, Lavras-MG. **Anais...** Lavras: ESAL, 1994. p. 165.
- RAYLE, D. L.; ROSS, C. W.; ROBINSON, N. Estimation of osmotic parameter, accompanying zeatin-induced growth of detached cucumber cotyledons. **Plant**

Physiology, Washington, v. 70, n. 1, p. 1634-1636, Aug. 1982.

SITBON, M. Production of haploid *Gerbera jamesonii* plants by in vitro culture of unfertilized ovules. **Agronomie**, Angers, v. 1, n. 9, p. 807-812, Oct. 1981.

TEPFER, D. A.; FOSKET, D. E. Hormone-mediated translation control of protein synthesis in cultured cells of *Glycine max*. **Developmental Biology**, New York, v. 62, n. 1, p. 486-497, Dec. 1978.

WAINWRIGHT, H.; FLEGMANN, A. W. The micropropagation of *Gooseberry* spp. in vitro

proliferation and in vivo establishment. **Journal of Horticultural Science**, Wageningen, v. 60, n. 1, p. 485-491, Nov. 1985.

WELANDER, T. Influence of medium compositions on organ formation in explants of *Begoniaxhimalis* in vitro. **Physiology Plantarum**, Copenhagen, v. 43, n. 1, p. 136-141, Jan. 1979.

ZENS, A.; ZIMMER, K. In vitro vermehrung von *Anthurium Scherzerianum*. **Gartenbauwissenschaft Weihenstephan**, Berlin, v. 51, n. 1, p. 26-31, Dez. 1986.