

KNO₃ E NH₄NO₃ NO CULTIVO *in vitro* DE ORQUÍDEA (*Cattleya loddigesii* 'TIPO')

KNO₃ AND NH₄NO₃ ON THE *in vitro* CULTURE OF ORCHID (*Cattleya loddigesii* 'TIPO')

FILIPPE ALMENDAGNA RODRIGUES^{1*}, JOYCE DÓRIA RODRIGUES SOARES²,
DALILHIA NAZARÉ DOS SANTOS², MOACIR PASQUAL³

¹Pós-doutorando em Agronomia/Fitotecnia – Universidade Federal de Lavras/UFLA – e-mail: filipealmendagna@yahoo.com.br

²Pós-doutoranda em Agronomia/Fitotecnia – Universidade Federal de Lavras/UFLA – e-mail: joycerodrigues01@yahoo.com.br; dalilhians@gmail.com

³Professor Titular – Universidade Federal de Lavras – Caixa Postal 3037 – CEP 37.200-000 – Lavras, MG – e-mail: mpasqual@dag.ufla.br. *Autor para correspondência.

RESUMO

Objetivou-se, com este trabalho, encontrar a melhor concentração de KNO₃ e NH₄NO₃ no cultivo *in vitro* de orquídea. Plântulas da espécie *Cattleya loddigesii* 'Tipo', com, aproximadamente, 1 cm de comprimento, foram inoculadas em meio BDS. Os tratamentos consistiram da interação de concentrações 0, 25, 50 e 100% de NH₄NO₃ e KNO₃, suplementado de 20 g L⁻¹ de sacarose, 2 g L⁻¹ de carvão ativado, solidificado com 5,5 g L⁻¹ de ágar e pH ajustado para 5,7±0,1, antes da autoclavagem à pressão de 1 atm e à temperatura de 121° C, durante 20 minutos. Após a inoculação, os frascos, contendo os explantes (cinco plântulas por frasco), foram mantidos em sala de crescimento com temperatura de 25±2° C, fotoperíodo de 16 horas e irradiância de 42 W m⁻² fornecida por lâmpadas fluorescentes do tipo luz do dia especial (marca OSRAM 20W). O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 4x4, com cinco repetições, cada repetição constituiu-se de quatro frascos. Após 120 dias da instalação do experimento, foram avaliados comprimento da parte aérea, número de brotos e massa fresca de plântulas. Melhores resultados para comprimento da parte aérea, número de brotos e massa fresca de plântulas foram, respectivamente, 4,8 cm, 1,5 brotos e 0,61g. O cultivo *in vitro* de *Cattleya loddigesii* 'Tipo' ocorre em meio BDS contendo 53-100% de KNO₃ e 0-50% de NH₄NO₃.

Termos para indexação: Orchidaceae, cultura de tecidos, fontes de nitrogênio.

ABSTRACT

The objective of this work was to find the best concentration of KNO₃ and NH₄NO₃ in orchid cultivation *in vitro*. Plantlets of species *Cattleya loddigesii* 'Tipo', with approximately 1 cm long were inoculated in BDS medium. The treatments consisted of the interaction of concentrations 0, 25, 50 and 100% of NH₄NO₃ and KNO₃, supplemented by 20 g L⁻¹ sucrose, 2 g L⁻¹ of activated charcoal, solidified with 5.5 g L⁻¹ agar and pH adjusted to 5.7±0.1 before autoclaving at a pressure of 1 atm and temperature of 121° C for 20 minutes. After inoculation, the flasks containing the explants (5 plantlets per flask) were

kept in a growth room with temperature of 25±2° C, photoperiod of 16 hours and irradiance 42 W m⁻² provided by fluorescent lamps of the type of light special day (brand OSRAM 20W). The experimental design was completely randomized in factorial scheme 4x4, with five replicates, each replicate consisted of 4 vials. After 120 days of the installation of the experiment, it was evaluated length of shoot, number of shoots and fresh weight of seedlings. Best results for shoot length, number of shoots and fresh weight of seedlings were respectively 4.8 cm, 1.5 shoots and 0.61 g. The cultivation *in vitro* of *Cattleya loddigesii* 'Tipo' is reached in BDS medium containing 53-100% of KNO₃ and 0-50% of NH₄NO₃.

Index Terms: Orchidaceae, tissue culture, sources of nitrogen.

INTRODUÇÃO

As orquídeas estão entre as plantas ornamentais mais apreciadas e de maior valor comercial. No Brasil, já foram identificadas mais de 3.500 espécies de orquídeas, mas muitas estão correndo o risco de extinção, em decorrência da destruição de seu *habitat* e das coletas predatórias.

A cultura de tecidos é frequentemente utilizada para a propagação clonal em massa de híbridos e espécies de orquídeas, possibilitando a obtenção de plantas de alta qualidade fitossanitária em curto período de tempo (ARDITTI; ERNST, 1993).

A micropropagação ou propagação *in vitro* tem sido utilizada no Brasil há pouco mais de 25 anos, com finalidade de produção de mudas de alta qualidade genética e, consequentemente reduzir o seu custo. Além disso, tem contribuído para impedir a extinção de muitas espécies de orquídeas (STANCATO et al., 2001).

(Recebido em 3 de setembro de 2009 e aprovado em 17 de agosto de 2011)

O meio de cultura mais utilizado em cultura de tecidos para a propagação de várias espécies vegetais é o MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962). Contudo, a concentração de nutrientes no meio tem sido identificada como elevada, em razão, principalmente, do fornecimento de Nitrogênio (N) e, nesse sentido, modificações têm sido sugeridas objetivando maior adaptação das culturas e redução de custos.

O N é um dos elementos mais limitantes no crescimento e desenvolvimento, sendo o seu papel amplamente reconhecido. Entretanto, a forma de suprimento de nitrogênio está correlacionada com a relação cátion-ânion na planta, onde 70% dos cátions e ânions absorvidos são representados por NH_4^+ e NO_3^- . Além disso, o N é absorvido pelas plantas nas formas de amônio (NH_4^+) e/ou nitrato (NO_3^-), sendo esse último preferencial para grande parte das culturas (CRAWFORD, 1995).

Assim, objetivou-se, com este trabalho, encontrar a melhor concentração de KNO_3 e NH_4NO_3 no crescimento *in vitro* de orquídea.

MATERIAL E MÉTODOS

Plântulas da espécie *Cattleya loddigesii* 'Tipo', com aproximadamente 1 cm de comprimento oriundas da germinação *in vitro* e pertencente ao 1º subcultivo, foram utilizadas como fonte de explantes e inoculadas em meio BDS (DUNSTAN; SHORT, 1977), contendo 320 mg L^{-1} de NH_4NO_3 e 2530 mg L^{-1} de KNO_3 . Os tratamentos consistiram da interação de concentrações 0, 25, 50 e 100% de NH_4NO_3 e KNO_3 , suplementado de 20 g L^{-1} de sacarose, 2 g L^{-1} de carvão ativado, solidificado com $5,5 \text{ g L}^{-1}$ de ágar e pH ajustado para $5,7 \pm 0,1$.

A parcela experimental foi constituída de recipientes (frascos) de vidro com capacidade para 250 cm^3 , contendo 60 mL de meio de cultura. Os frascos foram vedados com tampas plásticas translúcidas e autoclavados à pressão de 1 atm e à temperatura de 121° C , durante 20 minutos. Após a inoculação, cada parcela contendo os explantes (cinco plântulas por frasco) foi mantida em sala de crescimento com temperatura de $25 \pm 2^\circ \text{ C}$, fotoperíodo de

16 horas e irradiância de 42 W m^{-2} fornecida por lâmpadas fluorescentes do tipo luz do dia especial (marca OSRAM 20W).

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 4×4 , com cinco repetições (com quatro frascos/repetição) e cinco plantas em cada frasco. Decorridos 120 dias da instalação do experimento, avaliaram-se comprimento da parte aérea (cm), número de brotos e massa fresca de plântulas (g). Os dados foram analisados empregando-se o programa SISVAR, por meio de regressão polinomial ou pelo teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade (FERREIRA, 2000).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A interação entre os fatores analisados foi observada somente para a variável número de brotos. Em relação às variáveis, comprimento da parte aérea e massa fresca de plântulas, observou-se diferença significativa somente para as concentrações de KNO_3 . Para a variável comprimento da parte aérea, foi observado maior resultado (4,8 cm), com a utilização de 53% de KNO_3 acrescido ao meio de cultura BDS, sendo que, a partir desse ponto, houve um decréscimo de forma quadrática no comprimento das plântulas (Figura 1).

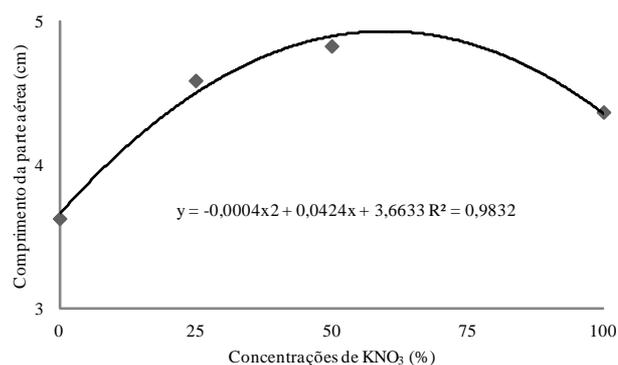


FIGURA 1 – Comprimento da parte aérea (cm) de plântulas da espécie *Cattleya loddigesii* 'Tipo' sob diferentes concentrações de KNO_3 .

O nitrato, como única fonte de N, sustenta uma satisfatória taxa de crescimento em muitas espécies, sendo,

também, a melhor forma de suprimento de N para algumas culturas (CALDAS et al., 1998). Embora haja relatos de que, quando o N é fornecido somente na forma de sais inorgânicos de amônio, as células *in vitro* apresentam sintomas de toxidez, e no presente trabalho, não foi verificado esse comportamento no crescimento de parte aérea.

Esse comportamento também é observado em outras culturas como o café, onde o nitrato como única fonte de nitrogênio, é responsável por uma taxa de crescimento razoável (RIBEIRO et al., 2002). No entanto, há espécies de orquídeas como *Cattleya loddigesii*, que não crescem bem na presença apenas do nitrato como fonte de nitrogênio (ARAUJO et al., 2009).

Em relação à variável número de brotos em plântulas de orquídea, verifica-se que houve interação entre as concentrações de KNO₃ e NH₄NO₃. O maior número de brotos (1,5) foi observado na concentração de 50% NH₄NO₃ e de 67% de KNO₃, onde, a partir dessa concentração, houve decréscimo de forma quadrática (Figura 2).

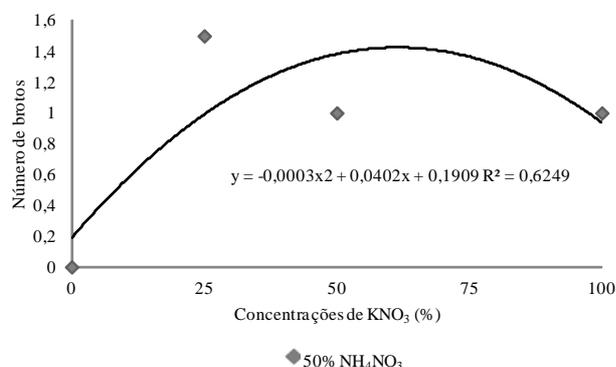


FIGURA 2 – Número de brotos em plântulas da espécie *Cattleya loddigesii* ‘Tipo’ sob diferentes concentrações de KNO₃ em função de NH₄NO₃.

Essa redução pode ter sido causada por toxidez, à medida que se acrescentou o nitrato de potássio ao meio de cultivo, concordando assim com os resultados obtidos por Araujo (2009), que obtiveram maior número de

brotações com a utilização de 59,3 e 44,5% de KNO₃ e NH₄NO₃, respectivamente.

Analizando somente o KNO₃, como fonte de N, o número total de brotos foi mínimo. Quando o N é fornecido somente na forma de nitrato, a quantidade desse nutriente no meio de cultura é abundante no início do estabelecimento do explante. Entretanto, com o crescimento do explante, o meio de cultura começa a apresentar deficiência desse nutriente. Quando o N é fornecido nas formas de nitrato e amônio, inicialmente o N na forma nítrica é consumido mais rapidamente e, posteriormente, o N na forma amoniacal torna-se disponível para ser consumido pelo explante. Em trabalho realizado com *Cycas revoluta* (RINALDI, 1999), não se obteve indução de brotações quando esta foi cultivada em meio contendo nitrato como única fonte de N. Dessa forma, fica evidenciada a essencialidade da combinação de ambas as fontes no cultivo *in vitro* (RIBEIRO et al., 2002).

Em estudos realizados com *Eleusine coracana*, foram observados que concentrações de NH₄NO₃, duas a seis vezes maiores que a utilizada no meio MS, podem favorecer a regeneração de brotos. Já, em concentrações superiores, o meio de cultura tornou-se tóxico para a espécie estudada (PODDAR et al., 1997). De acordo com o mesmo autor, o nitrato pode funcionar como regulador de crescimento, estimulando brotações. Dessa forma, em *Cattleya loddigesii* as fontes de nitrato estimularam brotações até 67% de KNO₃ tornando-se tóxicas, a partir do mesmo, com o aumento das concentrações.

A concentração de 100% de KNO₃ promoveu acréscimo significativo na massa fresca de plântulas (0,61g). Pode-se concluir que apenas essa fonte de nitrato é suficiente para o aumento em massa de *Cattleya loddigesii* (Figura 3).

De acordo com George e Sherrington (1984), o desenvolvimento e morfogênese em cultura de tecidos são acentuadamente influenciadas pela disponibilidade de nitrogênio e pela forma como o mesmo é fornecido. Assim sendo, no presente trabalho, a referida fonte de

nitrito foi suficiente para promover maior crescimento, conseqüentemente, maior massa de plântulas dessa orchidaceae.

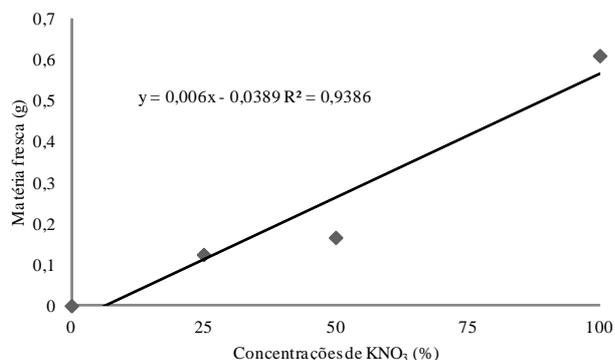


FIGURA 3 – Massa fresca de plântulas (g) da espécie *Cattleya loddigesii* ‘Tipo’ sob diferentes concentrações de KNO₃.

Silva et al. (2001), estudando fontes de nitrogênio no desenvolvimento *in vitro* do porta-enxerto ‘Trifoliata’, concluíram que melhores resultados são obtidos com 75% da fonte KNO₃ associada com altas concentrações de NH₄NO₃ para altura e massa das brotações dos explantes. Essa diferença de resultados poderia ser explicada pelo fato de que o crescimento de plantas, órgãos, tecidos e células *in vitro* depende do desenvolvimento de meios de cultura otimizados para cada espécie e da perfeita interação de componentes essenciais como fonte de nutrientes minerais.

Segundo Sakuta (1987), altas concentrações de amônio (NH₄⁺) e nitrito (NO₃⁻) podem ser críticas no processo de morfogênese e crescimento dos explantes. Provavelmente, esses resultados podem estar relacionados com a própria função metabólica do nitrogênio como constituinte de aminoácidos, enzimas e proteínas.

CONCLUSÕES

Em comparação à proporção original de soluções de KNO₃ e NH₄NO₃ utilizadas no meio BDS, para a espécie *Cattleya loddigesii* ‘Tipo’, conclui-se que a parte aérea tem melhor crescimento em 53% de KNO₃ na ausência de

NH₄NO₃, o maior número de brotos ocorre em 67% de KNO₃ e 50% de NH₄NO₃ e a massa fresca tem maior incremento em 100% de KNO₃ e na ausência de NH₄NO₃.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAUJO, A. G. et al. Fontes de nitrogênio no crescimento *in vitro* de plântulas de *Cattleya loddigesii* Lindl. (Orchidaceae). *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, v. 31, n. 1, p. 35-39, 2009.

ARDITTI, J.; ERNST, R. *Micropropagation of orchids*. New York: J. Wiley, 1993. 682p.

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

CRAWFORD, N. M. Nitrate: nutrient and signal for plant growth. *The Plant Cell*, v. 7 p.859-868, 1995.

DUNSTAN, D. I.; SHORT, K. C. Improved growth of tissue cultures of the onion, *Allium cepa*. *Physiologia Plantarum*, v. 41, p. 70-72, 1977.

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. *Anais*. São Carlos: UFSCAR, p. 225-258, 2000.

GEORGE, E. F.; SHERRINGTON, P. D. *Plant propagation by tissue culture*. Eversley: Exegetics, 1984. 709 p.

MURASHIGE, T; SKOOG, F. A. Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, v. 15, p. 473-497, 1962.

PODDAR, K.; VISHNOI, R. K.; KOTHARI, S. L. Plant regeneration from embryogenic callus of finger millet *Eleusine coracana* (L.) Gaertn. on higher concentrations of NH₄NO₃ as a replacement of NAA in the medium. *Plant-Science*, v. 129, n. 1, p. 101-106, 1997.

RINALDI, L.M.R. Factors affecting shoot regeneration from zygotic embryo and seedling explants of *Cycas revolute* Thunb. *In Vitro Cellular and Development Biology Plant*, v. 35, p. 25-28, 1999.

RIBEIRO, L. S. et al. Fontes de nitrogênio na micropropagação de *Coffea arabica*. **Scientia Agraria**, v. 3, n. 1-2, p. 107-112, 2002.

SAKUTA, M.; KOMAMINE, A. Cell grow and accumulation of secondary. In: CONSTABEL, F.; VASIL, I.K. (eds.), **Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants: Cell Culture in Phytochemistry**. San Diego: Academic Press, 1987. v. 4, cap. 5, p. 97-114.

SILVA, A. B. et al. Influência das fontes de nitrogênio NH₄NO₃ e KNO₃ no desenvolvimento *in vitro* do porta-enxerto 'Trifoliata'. **Revista Científica Rural**, v. 6, n. 2, p. 147-152, 2001.

STANCATO, G. C. et al. Produção de mudas de orquídea a partir de sementes de *in vitro* e sua viabilidade econômica: estudo de caso. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v. 7, n. 1, p. 25-33, 2001.