

Uréia como fonte alternativa de nitrogênio na micropropagação de abacaxizeiro cv. Pérola

Maria Aparecida Moreira¹, Chrystiane Borges Fráguas^{2*}, Janice Guedes de Carvalho³ e Moacir Pasqual⁴

¹Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, Sergipe, Brasil. ²Programa de Pós-graduação em Horticultura, Departamento de Química e Bioquímica, Universidade Estadual Paulista, Cx. Postal 510, 18618-000, Botucatu, São Paulo, Brasil.

³Departamento Ciências do Solo, Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brasil. ⁴Departamento de Agricultura, Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brasil. *Autor para correspondência. E-mail: chrysbf@ig.com.br

RESUMO. Objetivou-se estudar a viabilidade da substituição parcial ou total do nitrato de amônio por uréia como fonte de nitrogênio no meio de cultura para o cultivo *in vitro* do abacaxizeiro cv. Pérola. Plantas oriundas das gemas da coroa do fruto com massa fresca em torno de 80 mg foram inoculadas em meio MS (líquido e sólido) substituindo-se 100, 80, 60, 40, 20 e 0% do nitrato de amônio por uréia. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com quatro repetições e três plantas/repetição. Após 60 dias, observou-se a possibilidade da substituição parcial de 40% de nitrato de amônio por uréia para as variáveis analisadas e melhor desenvolvimento das plantas em meio de cultura sólido.

Palavras-chave: *Ananas comosus*, nitrato, cultura de tecidos.

ABSTRACT. Micropropagation of pineapple cv. Pérola with urea as nitrogen source. The partial or total substitution viability of the ammonium nitrate for urea, as source of nitrogen in the culture medium for the *in vitro* culture of pineapple cv. Pérola was studied. Plants originating from fruit crown buds with fresh weight matter around 80 mg was inoculated on MS medium (liquid and solid) with substitution of 100, 80, 60, 40, 20 and 0% of the ammonium nitrate for urea. These treatments were arranged in a completely randomized design, with four replications and three plants/replications. After 60 days, the possibility of 40% ammonium nitrate for urea partial substitution was observed for the analyzed variables. In addition, better plant development in solid culture medium was observed as well.

Key words: *Ananas comosus*, nitrate, tissue culture.

Introdução

A produção brasileira de abacaxi apresenta tendência crescente tanto na área plantada quanto na produtividade. O grande problema da cultura no Brasil é a fusariose, doença que provoca grandes perdas na produção que se dissemina por meio de mudas contaminadas. Assim, pode-se afirmar que o primeiro passo para o sucesso da cultura é a obtenção de mudas sadias. Nesse contexto, a produção de milhares de mudas a partir de uma única gema é possível por meio da cultura de tecidos.

Os meios nutritivos utilizados para a cultura de células, de tecidos e de órgãos de plantas fornecem substâncias essenciais para o crescimento e controlam, em grande parte, o padrão de desenvolvimento *in vitro*. Os meios nutritivos se baseiam nas exigências minerais das plantas com algumas modificações, a fim de atender às necessidades *in vitro* de cada espécie e para que as

vias bioquímicas e metabólicas básicas que funcionam nas plantas sejam conservadas em células cultivadas (Caldas *et al.*, 1998).

Tanto o crescimento como a morfogênese e a totipotência celular em culturas *in vitro* são sensivelmente influenciados pela disponibilidade de nitrogênio e pela forma como é fornecido (Kirby *et al.*, 1987), diferindo dos demais macronutrientes pelo fato de apresentar-se na forma de cátion (NH_4^+) e ânion (NO_3^-).

Além das formas inorgânicas de nitrogênio, podem ser também fornecidas as orgânicas, as quais são prontamente assimiláveis pelas células vegetais. As formas específicas de nitrogênio orgânico incluem uréia, aminoácidos, poliaminas e ureídeos (Grothge, 1992), bem como misturas complexas de compostos nitrogenados, tais como extrato de levedura e caseína hidrolisada (Yatazawa e Furuhashi, 1968).

Poucos são os trabalhos envolvendo o estudo de diferentes fontes de nitrogênio na cultura de tecidos e na micropropagação do abacaxizeiro, além da divergência de resultados observada de acordo com cada espécie.

Endres e Mercier (2001) estudaram o amônio e a uréia como fonte de nitrogênio no crescimento *in vitro* do abacaxizeiro 'Pérola' e da bromélia *Vriesea gigantea* e verificaram que a bromélia é mais adaptada a absorver e assimilar nitrogênio orgânico, tal como a uréia, enquanto *A. comosus* é melhor adaptada a formas inorgânicas de nitrogênio, como amônio. O conteúdo de clorofila e aminoácidos aumentou mais rapidamente quando as plantas de abacaxizeiro foram cultivadas em meio contendo amônio.

Fráguas et al. (2003) concluíram que concentrações superiores a 20 mg L⁻¹ de uréia são tóxicas ao cultivo *in vitro* de gloxínia devido, possivelmente a um efeito inibitório da citocinina BAP (benzilaminopurina) pela uréia, adicionada ao meio de cultura.

Majerowicz et al. (2000) verificaram que a glutamina como fonte de nitrogênio aumentou a massa seca das plântulas, o comprimento das brotações e as raízes de *Catsetum fimbriatum*. Tsai e Saunders (1999) encontrou efeitos positivos da utilização de uréia na taxa de multiplicação de beterraba (81%), aumento na massa fresca (54%), indução de calos (100%) quando comparada à mistura de fontes de nitrogênio existente no meio MS. Conforme Marques et al. (1998), a presença de uréia no meio de cultura incrementou o desenvolvimento de raízes de crisântemo, principalmente quando utilizada em adição com o nitrato (teor de nitrogênio total 60 mM), proporcionando um sistema radicular bastante denso.

Roy et al. (1996) obtiveram aumento de 10 para 60 brotações por subcultura de *Syzygium cumini* L., utilizando 100 mg L⁻¹ de uréia no meio de cultura. Polacco (1976 e 1977) verificou o crescimento de células de soja em suspensão quando forneceu uréia ao meio juntamente com adição de níquel. Todavia, segundo Kirby et al. (1987), culturas que foram estabelecidas em meio contendo uréia como única fonte de nitrogênio cresceram mais lentamente do que as células mantidas em meio de cultura contendo nitrato e amônio.

Novas formulações nutritivas estão sendo desenvolvidas com o objetivo de adequar os suprimentos orgânicos e minerais, permitindo o desenvolvimento *in vitro* de várias espécies. Além do elevado custo, a dificuldade na aquisição do nitrato de amônio tem levado à realização de inúmeros trabalhos buscando uma alternativa para a substituição parcial ou total dessa fonte de

nitrogênio. Assim, este estudo objetivou estudar a viabilidade da substituição do nitrato de amônio por uréia como fonte de nitrogênio no meio de cultura para o cultivo *in vitro* de abacaxizeiro cv. Pérola.

Material e métodos

Plantas oriundas de gemas retiradas da coroa do fruto do abacaxizeiro cv. Pérola e preestabelecidas *in vitro* foram utilizadas como explantes. As gemas foram desinfetadas com hipoclorito de sódio a 2% por 20 minutos; em seguida foram lavadas em água destilada.

O meio de cultura utilizado foi o MS (Murashige e Skoog, 1962) sem reguladores vegetais, substituindo-se 100, 80, 60, 40, 20 e 0% do nitrato de amônio por uréia, não alterando a concentração do nitrato de potássio, sendo que a concentração final de nitrogênio no meio de cultura não foi alterado. Todos os tratamentos foram testados em meio líquido e sólido (7 g L⁻¹ de ágar). O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial de 6 x 2, totalizando 12 tratamentos com 4 repetições e 3 plantas/parcela. As brotações foram padronizadas com aproximadamente 80 mg de matéria fresca. O pH foi ajustado para 5,8 e, após o preparo, autoclavado à pressão de 1,5 atm e à temperatura de 120°C durante 20 minutos.

Após a inoculação dos explantes, os tubos de ensaio foram levados para a sala de crescimento, com luminosidade de 32 µmol m⁻² s⁻¹, temperatura de 27± 2°C e fotoperíodo de 16 horas de luz.

Após 60 dias, foram avaliados a altura das plantas (medida até a extremidade da folha mais alta), o número de folhas e a matéria fresca e seca da parte aérea pela análise de regressão e pelo teste de médias por meio do programa estatístico Sisvar (Ferreira, 2000).

Resultados e discussão

Pela análise de variância da altura das plantas observou-se interação significativa entre os fatores, constatando-se que seus efeitos são dependentes.

A maior altura das plantas, estimada pela equação de regressão, foi verificada com a substituição de 1,04% do nitrato de amônio por uréia no meio sólido (10,66 cm) e de 1,32% no meio líquido (9,11 cm). Observaram-se, contudo, resultados semelhantes substituindo-se 40% do nitrato de amônio por uréia, resultando na altura de 10,53 cm no meio sólido e de 9,26 cm no meio líquido (Figura 1). Na Figura 1, para ambos os meios de cultura, observa-se que no início do cultivo as plantas

apresentavam altura semelhante, sugerindo, possivelmente, que ocorreu tanto a absorção do nitrato de amônio quanto da uréia. Entretanto Endres e Mercier (2001) citam que a uréia adicionada ao meio induziu um baixo nível de amônio livre nos tecidos do abacaxizeiro 'Pérola' e da bromélia *V. gigantea*, sugerindo que a uréia só foi metabolizada e assimilada quando o nitrogênio se tornou necessário ao crescimento das plantas.

Marques *et al.* (1998) obtiveram plantas mais desenvolvidas de crisântemo nos tratamentos contendo uréia + nitrato e no tratamento contendo apenas nitrato, em que o teor de nitrogênio total foi menor. Ao contrário, quando o meio continha uréia + glutamina, apenas glutamina ou apenas íon amônio, as plantas obtidas foram nitidamente menos desenvolvidas. Majerowicz *et al.* (2000) observaram maior altura das brotações (4,2 cm) de *Catasetum fimbriatum* ao utilizar glutamina como fonte de nitrogênio quando comparada ao nitrato, ao amônio e suas combinações.

Grothge (1992) encontrou efeito benéfico da adição de uréia (100 mg L⁻¹) no meio de cultura para o crescimento e o desenvolvimento de explantes de *Eucalyptus grandis*.

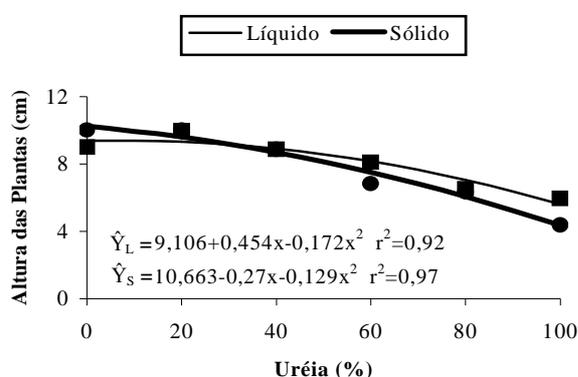


Figura 1. Altura das plantas de abacaxizeiro cv. Pérola obtida em meio de cultura MS líquido e sólido em diferentes concentrações de uréia em substituição ao nitrato de amônio.

Não houve interação significativa entre os fatores estudados para número de folhas, apenas a uréia apresentou efeito nos tratamentos.

A Figura 2 apresenta um decréscimo no número de folhas com o aumento na concentração de uréia no meio de cultura, indicando uma possível intolerância à absorção dessa fonte de nitrogênio em altas concentrações. O maior número de folhas (10,34) estimado pela equação de regressão foi obtido com a substituição de apenas 1,8% do nitrato de amônio por uréia, porém não se verificou grande redução quando utilizados 40% de uréia no meio, semelhantemente ao encontrado na altura das

plantas. Marques *et al.* (1998) verificaram maior número de folhas em crisântemo utilizando apenas nitrato ou uréia (100 mg L⁻¹) + NO₃, mas, quando utilizaram somente o íon amônio, uréia ou sua combinação com glutamina, registraram os menores valores para essa variável.

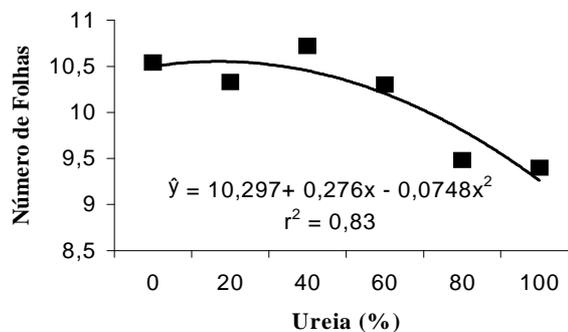


Figura 2. Número de folhas das plantas de abacaxizeiro cv. Pérola obtidas em meio de cultura MS líquido e sólido em diferentes concentrações de uréia em substituição ao nitrato de amônio.

Não houve interação entre os fatores analisados para massa fresca da parte aérea, apenas foi observada significância dos fatores estudados isoladamente, sendo que a maior massa da parte aérea (862,3 mg) foi obtida com 0,87% de uréia, estimada pela equação de regressão. Resultado semelhante foi observado com a substituição de 40% do nitrato por uréia, proporcionando 853,10 mg de massa fresca (Figura 3).

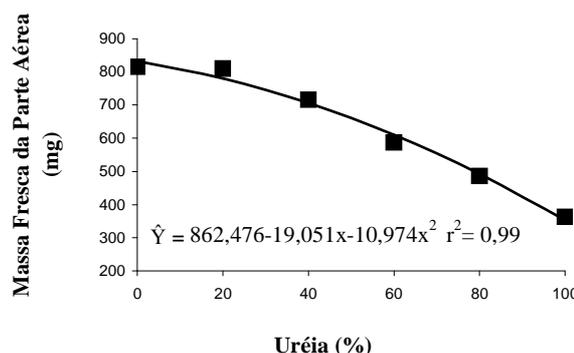


Figura 3. Massa fresca da parte aérea de abacaxizeiro cv. Pérola obtida em meio de cultura MS em diferentes concentrações de uréia em substituição ao nitrato de amônio.

Marques *et al.* (1998) encontraram maior massa fresca de plantas de crisântemo ao adicionarem ao meio MS NO₃ isoladamente, uréia (100 mg L⁻¹) + NO₃, uréia (200 mg L⁻¹) + NO₃. Fráguas *et al.* (2003) verificaram que a adição de 20% de uréia no cultivo de gloxínia reduz a massa fresca de 0,405 para 0,043 g em comparação ao meio MS básico.

Grothge (1992) obteve maior massa fresca (0,51 g) para o clone G0694 de eucalipto, utilizando 100 mg L⁻¹ de uréia. Contudo, em concentrações superiores (200 e 300 mg L⁻¹), verificou decréscimo na massa fresca (0,23 e 0,21 g, respectivamente), evidenciando que altas concentrações de uréia no meio de cultura podem tornar-se fitotóxicas.

Com relação ao meio de cultura, a maior massa fresca foi obtida em meio sólido (704,79 mg) seguido pelo meio de cultura líquido (553,91 mg) (Figura 4).

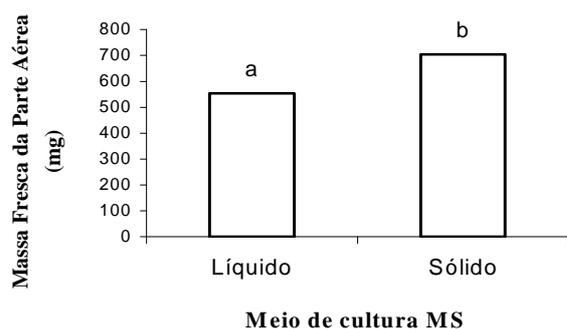


Figura 4. Massa fresca da parte aérea de abacaxizeiro cv. Pérola obtida em meio de cultura MS líquido e sólido em substituição ao nitrato de amônio.

Possivelmente, o meio líquido tenha facilitado a absorção dos nutrientes, tal como a uréia, elevando seu nível nas células, proporcionando menor crescimento e, conseqüentemente, menor massa fresca. No meio solidificado com àgar, a absorção dos nutrientes pode ser reduzida por apresentarem-se menos livres no meio de cultura, diminuindo ou retardando uma possível toxicidade.

Semelhantemente aos dados de massa fresca, não houve interação entre os fatores, e a maior massa seca da parte aérea (59,71 mg) foi obtida utilizando-se 4,6% de uréia, sendo que a substituição de 40% do nitrato proporciona massa de 58,48 mg (Figura 5).

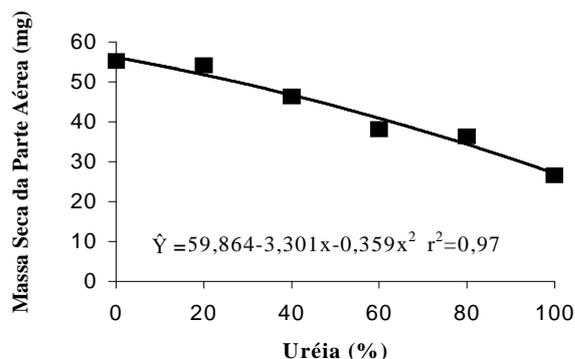


Figura 5. Massa seca da parte aérea de abacaxizeiro cv. Pérola obtida em meio de cultura MS em diferentes concentrações de uréia em substituição ao nitrato de amônio.

Grothge (1992) observou que a massa seca da parte aérea (0,054 g) do clone GO269 de eucalipto foi melhor quando cultivado em meio contendo 100 mg L⁻¹ de uréia. O mesmo clone apresentou menor massa seca da parte aérea (0,041 e 0,045 g) quando cultivado em meio contendo 200 e 300 mg L⁻¹ de uréia, respectivamente.

O meio sólido proporcionou 47,94 mg, enquanto o meio líquido resultou em 37,76 mg de massa seca da parte aérea (Figura 6).

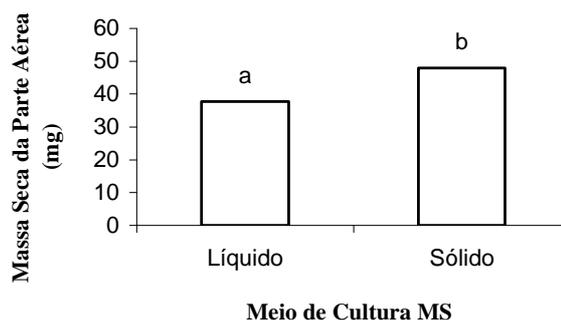


Figura 6. Massa seca da parte aérea de abacaxizeiro cv. Pérola obtida em meio de cultura MS líquido e sólido em substituição ao nitrato de amônio.

Majerowicz *et al.* (2000) verificaram maior massa seca (16,8 g) em orquídea (*C. fimbriatum*) ao utilizar a glutamina como fonte de nitrogênio em comparação ao íon amônio como única fonte (10,3 g).

À medida que se aumenta a concentração de uréia no meio de cultura líquido ou sólido diminuem a altura das plantas, o número de folhas e a massa fresca e seca da parte aérea, possivelmente devido ao efeito fitotóxico da uréia quando utilizada em maiores quantidades. Porém é possível a substituição parcial sem prejudicar o desenvolvimento da planta se comparada à ausência da uréia. Essa substituição pode ser suficiente para a redução dos custos para o cultivo *in vitro*.

Conclusão

É possível a substituição de até 40% do nitrato de amônio por uréia no meio de cultura, sendo que o meio de cultura sólido propicia melhores resultados em relação ao meio de cultura líquido para as variáveis analisadas.

Referências

- CALDAS, L.S. *et al.* Meios nutritivos. In: TORRES, A.C. *et al.* (Ed.). *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Embrapa/CNPq, 1998. v. 1, p. 87-132.
- ENDRES, L.; MERCIER, H. Ammonium and urea as nitrogen sources for bromeliads. *J. Plant Physiol.*, Lancaster, v. 158, p. 205-212, 2001.

- 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., 2000, São Carlos. *Anais...* São Carlos: UFSCar, 2000. p. 255-258.
- FRÁGUAS, C.B. *et al.* Micropropagação de gloxínia em diferentes concentrações de nitrato de amônio e uréia. *Cienc. Agrotecnol.*, Lavras, v. 27, n. 4, p. 811-815, 2003.
- GROTHGE, M.T. *Efeito de várias fontes de nitrogênio na multiplicação in vitro de clones de Eucalyptus grandis HILL ex MAIDEN.* 1992. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia)–Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 1992.
- KIRBY, E.G. *et al.* Nitrogen Nutrition. In: BONGA, J.M.; DURZAN, D.J. (Ed.). *Cell and tissue culture in forestry.* Dordrecht/Boston/Lancaster: Martinus Nijhoff Publishers, 1987. v. 1, p. 67-88.
- MAJEROWICZ, N. *et al.* Growth and nitrogen metabolism of *Catasetum fimbriatum* (orchidaceae) grown with different nitrogen sources. *Environ. Exp. Bot.*, Oxford, v. 44, p. 195-206, 2000.
- MARQUES, D.A. *et al.* Influência de fontes de nitrogênio sobre o desenvolvimento das gemas axilares de explantes caulinares de *Chrysanthemum morifolium* Ramat. cultivado *in vitro.* *Rev. Bras. Bot.*, São Paulo, v. 21, n. 2, p. 141-147, 1998.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, Danvers, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.
- POLACCO, J.C. Nitrogen metabolism in soybean tissue culture. I. Assimilation of urea. *J. Plant Physiol.*, Lancaster, v. 58, n. 3, p. 350-357, 1976.
- POLACCO, J.C. Nitrogen metabolism in soybean tissue culture. II. Urea utilization and urease synthesis require Ni^{+2} . *J. Plant Physiol.*, Lancaster, v. 59, p. 827-830, 1977.
- ROY, P.K. *et al.* Clonal propagation of *Syzygium cumini* L. through in vitro culture. *J. Bot.*, Bangladesh, v. 25, n. 2, p. 159-164, 1996.
- TSAI, C.J.; SAUNDERS, J.W. Evaluation of sole nitrogen sources for shoot and leaf disc cultures of sugarbeet. *Plant Cell, Tissue Org. Cult.*, Netherlands, v. 59, n. 1, p. 47-56, 1999.
- YATAZAWA, M.; FURUHASHI, K. Nitrogen sources for the growth of rice callus tissue. *Soil Sci. Plant Nutr.*, v. 14, p. 73-79, 1968.

Received on July 07, 2006.

Accepted on May 14, 2007.