

Julho e Agosto de 2001

VOL. XLVIII | Nº 278

Viçosa – Minas Gerais

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

**MICROPROPAGAÇÃO DA MANDIOCA:
INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE
NITRATO DE AMÔNIO COM E SEM BAP¹**

Aurora Yoshiko Sato²
José Maria³
Tocio Sedyama²
Aluizio Borém²
Paulo Roberto Cecon³
Cristina Salgado Junqueira²

RESUMO

Estudou-se o efeito das diversas concentrações de nitrato de amônio, com e sem BAP, na micropropagação da mandioca. Foram utilizados explantes de um cm de comprimento, com uma gema da mandioca do cultivar Urubu já estabelecida *in vitro*. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com 14 tratamentos, dispostos no esquema fatorial 2 x 7 (presença e ausência de BAP x sete concentrações de nitrato de amônio) e 20 repetições. Nos tratamentos com BAP, não houve formação de raízes, porém este induziu a formação de pequenas brotações. Nas concentrações de nitrato de amônio acima da ½ da concentração utilizada normalmente no meio MS, essas brotações apresentaram-se vitrificadas. Os explantes dos tratamentos sem BAP nas diversas concentrações de nitrato de amônio enraizaram, mas não formaram brotações. Esses explantes apresentaram em torno de seis gemas foliares nas diversas concentrações, e não

¹ Parte da tese de doutorado apresentada pelo primeiro autor à Universidade Federal de Viçosa. Aceito para publicação em 21.05.2001.

² Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal de Viçosa. Av. P.H. Rolfs, s/n, 36571-000 Viçosa, MG.

³ Departamento de Informática, Universidade Federal de Viçosa. Av. P. H. Rolfs, s/n, 36571-000 Viçosa, MG.

apresentaram vitrificação em nenhuma das concentrações. Recomenda-se a diminuição da concentração do nitrato de amônio no meio de cultura para fins de otimização e evitar desordens morfológicas e anatômicas.

Palavras-chaves: *Manihot esculenta*, explantes, meio de cultura.

ABSTRAT

CASSAVA MICROPAGATION: AMMONIUM NITRATE CONCENTRATIONS WITH AND WITHOUT BAP

The objective of this work was to study the effect of different concentrations of ammonium nitrate with and without BAP on cassava micropropagation. A completely randomized design was used with 14 treatments in a 2 x 7 factorial and 20 replications. The treatment with BAP did not take root but induced little shoots. When ammonium concentrations were over half of the concentration normally used in MS medium, these shoots exhibited vitrification. The treatments without BAP promoted rooting of cassava explants, but did not induce shoot formation. The explants presented about six leaf buds under the several ammonium nitrate concentrations and no vitrification. Decreasing ammonium nitrate concentration is recommended for optimization of the culture medium and prevention of morphological and anatomical disorders.

Key words: *Manihot esculenta*, explants, culture medium.

INTRODUÇÃO

O meio básico normalmente utilizado na fase de multiplicação na cultura de tecidos é o de Murashige e Skoog (MS) (4); entretanto, vários trabalhos têm mostrado ser este um meio muito rico em sais, causando até toxidez e outros distúrbios fisiológicos. O nitrogênio é algumas vezes absorvido pelas plantas na forma orgânica, mas, geralmente, é suplementado na forma de íons NH_4^+ e NO_3^- . Além da importância do nitrogênio nas formas NO_3^- e NH_4^+ no crescimento das plântulas, muitos autores têm abordado o fenômeno de hiper-hidricidade ou vitrificação, que são desordens morfológicas e anatômicas. A maioria das plantas absorve preferencialmente NO_3^- em relação ao NH_4^+ e, em alguns casos, ocorre o oposto; é necessário encontrar o balanço certo de $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ para um ótimo crescimento e desenvolvimento *in vitro*.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Testes de Progênes de Hortaliças do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Viçosa. Foram utilizados explantes de um cm de comprimento, com uma gema de mandioca do cultivar Urubu já estabelecida *in vitro*. Os explantes foram mantidos em sala de crescimento a 26 ± 2 °C, em fotoperíodo de 16

horas e intensidade luminosa mínima de 2.000 lux ($36 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) durante seis semanas. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, com 14 tratamentos dispostos no esquema fatorial 2×7 (presença e ausência de BAP (2 mg/L) x sete concentrações de nitrato de amônio) em meio MS, e 20 repetições (Quadro 1).

As amostras vegetais, após secas em estufa de ventilação forçada (temperatura de 70-75 °C), por 72 horas, foram moídas, homogeneizadas e mineralizadas por digestão nítrico-perclórica nos casos de P, K, Ca, Mg, S, Zn, Cu, Mn e Fe, e por digestão sulfúrica para N. Nos extratos foram determinados os teores de Ca, Mg, Cu, Zn, Mn e Fe, por espectrofotometria de absorção atômica; K e P por fotometria de chama (1); S por turbidimetria (2); e N-orgânico segundo Jackson (3).

Os dados do número de folhas, do comprimento da parte aérea, do peso da matéria seca da parte aérea, do peso de matéria seca de raízes e do número de brotações foram submetidos à análise de variância. Testaram-se os modelos de regressão dessas características, de acordo com as concentrações de NH_4^+ , cuja escolha se baseou no coeficiente de determinação e na significância dos coeficientes de regressão por meio do teste t, a 1% de probabilidade.

QUADRO 1 - Tratamentos utilizados na mandioca, cultivar Urubu, com as seguintes concentrações de nitrato de amônio: 0, 1/8, 1/4, 1/2, 3/4, 1 e 2 vezes a concentração original do MS, com e sem BAP (2 mg/L), e respectivas concentrações de nitrato, amônio, nitrogênio total e relação nitrato/amônio no meio					
Sem BAP	Com BAP	NO_3	NH_4^+	N total	$\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$
mM					
T1-0	T 8-0	18,8	0	18,80	-
T2-1/8	T 9-1/8	21,38	2,57	23,95	8,32
T3-1/4	T10-1/4	23,95	5,15	29,10	4,65
T4-1/2	T11-1/2	29,10	10,30	39,40	2,82
T5-3/4	T12-3/4	34,25	15,45	49,40	2,21
T6-1	T13-1	39,40	20,60	60,00	1,91
T7-2	T14-2	60,08	41,20	120,00	1,46

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As plântulas de mandioca submetidas a várias concentrações de nitrato de amônio e, conseqüentemente, a diversas concentrações de NH_4^+ , com e sem BAP, apresentaram resultados que podem ser observados no

Quadro 2 e na Figura 1. Verifica-se que houve diferença entre as diferentes concentrações de amônio. Não foi feita análise do peso da matéria seca de raízes com BAP, pois a presença deste inibiu a formação de raízes. Quanto ao número de brotações sem BAP também não foi realizada análise do peso da matéria seca, pois não houve formação de brotações.

QUADRO 2 - Análise mineral de plântulas de mandioca, cultivar Urubu, sob efeito de concentrações de amônio (NH_4^+ mM/L) com e sem BAP										
NH_4^+	N	P	K	Ca	Mg	S	Mn	Cu	Zn	Fe
%						ppm				
Sem BAP										
0	2,01	0,44	3,30	0,77	0,36	0,55	406,8	3,5	158,8	106,5
2,57	2,40	0,39	3,18	0,66	0,29	0,48	335,0	1,9	140,5	128,8
5,15	2,76	0,33	2,13	0,43	0,20	0,44	209,5	1,3	141,3	240,6
10,30	3,52	0,31	3,18	0,59	0,24	0,51	315,5	1,7	147,8	202,0
15,45	4,18	0,31	2,86	0,50	0,24	0,42	255,5	1,5	150,5	212,3
20,60	4,99	0,39	2,36	0,35	0,16	0,48	159,3	2,2	144,8	267,5
41,20	6,32	0,35	3,24	0,72	0,28	0,50	331,0	1,5	157,0	167,4
Com BAP										
0	6,22	0,55	2,93	1,05	0,20	0,53	297,2	4,8	148,6	202,1
2,57	-	0,69	3,09	0,69	0,23	0,63	219,1	3,6	140,1	288,3
5,15	-	0,79	2,71	0,58	0,15	0,62	178,6	3,3	136,0	323,2
10,30	-	0,87	2,59	0,50	0,16	0,66	161,9	4,5	240,2	187,7
15,45	-	0,91	2,60	0,51	0,17	0,68	149,0	2,0	228,5	279,3
20,60	-	0,75	2,60	0,47	0,17	0,68	143,4	2,5	140,2	290,0
41,20	-	0,92	2,27	0,44	0,22	0,71	128,5	2,9	170,2	245,5

Nos tratamentos com BAP, houve formação de brotações laterais de comprimento pequeno (Figura 1B) e em número menor que quatro (Figura 1E). A multiplicação da mandioca *in vitro* é feita através de repicagens das gemas foliares, ou seja, cada folha representa uma gema e esta, uma nova plântula. O aumento nas concentrações de amônio com BAP trouxe incremento do número de folhas indicando aumento no número de gemas também. Entretanto esses explantes, nessas condições, apresentaram deformações de ordem morfológicas e anatômicas.

Não houve formação de brotações nos tratamentos sem BAP, contudo o número de folhas, ou seja, de gemas ficou em torno de seis, além de não apresentarem deformidades observadas nos tratamentos com BAP.

Observou-se que a interação BAP x concentração de amônio foi significativa ($P < 0,01$), mostrando que houve diferença nos resultados entre as concentrações de NH_4^+ , com e sem BAP.

Pela análise de variância, observou-se que o peso da matéria seca de raízes sem BAP ($P < 0,01$) e o número de brotações com BAP ($P < 0,05$) nas concentrações de NH_4^+ foram significativos, ou seja, a presença do

BAP inibiu o enraizamento porém induziu a brotação, provocando alteração no hábito de crescimento da mandioca *in vitro* que é por alongamento com enraizamento. A presença do BAP provocou indução de brotações curtas sem presença de raízes.

A análise de regressão do número de folhas sem BAP, nas diferentes concentrações de NH_4^+ , não foi significativa, e a média foi de 6,08. Com BAP, o número de folhas cresceu com o aumento da concentração de nitrato de amônio, e na concentração com 41,20 mM/L de NH_4^+ , que equivale ao dobro da concentração inicial de nitrato de amônio utilizada pelo meio MS, o número de folhas foi de 7,00 (Figura 1A).

Quanto ao comprimento da parte aérea, a concentração de amônio sem BAP, que proporcionou o valor máximo, foi de 14,15 mM/L, com comprimento da parte aérea de 19,11 cm. Com BAP, em qualquer concentração o valor do comprimento da parte aérea foi de 1,55 cm, considerado 91,9% inferior ao resultado obtido sem BAP (Figura 1B), resultado este relacionado com a mudança do hábito de crescimento provocado pela presença do BAP. Observou-se que a presença do BAP induziu a formação de um calo na base, de onde emergiram as brotações de tamanho pequeno. Estes resultados foram semelhantes aos de Sato (7), que testou concentrações de NH_4^+ , com e sem BAP, em gérbera.

Quanto ao peso da matéria seca da parte aérea sem BAP nas diferentes concentrações de amônio, a concentração que forneceu o maior peso foi a de 22,98 mM/L, com peso da matéria seca de 88,63 mg. Segundo a análise de regressão, para o peso da matéria seca da parte aérea com BAP, a concentração que forneceu o menor peso foi a de 6,64 mM/L com 12,62 mg, e a que forneceu o maior peso foi a de 36,30 mM/L, com 31,01 mg (Figura 1C). Este comportamento deveu-se à presença de BAP, que, com o aumento da concentração de amônio, provocou incremento de matéria seca com posterior diminuição em virtude de uma fitotoxidez. Ao se comparar os pesos de matéria seca da parte aérea com e sem BAP, observa-se que a presença de BAP fez com que o incremento de matéria seca fosse diminuído, pois com BAP os pesos de matéria foram menores que os sem BAP. Estes resultados também estão relacionados com a mudança no hábito de crescimento da mandioca *in vitro*. O maior peso de matéria seca nas concentrações entre 20,60 e 41,20 mM de amônio deveu-se ao aumento de calos na região basal do explante. Estes calos apresentaram deformações devido às altas concentrações de amônio e sua interação com o BAP.

O peso da matéria seca de raízes sem BAP apresentou diferença significativa nas concentrações de amônio ($P < 0,01$). Apesar de haver ajuste significativo na equação de regressão (Figura 1D), a análise descritiva no caso é mais coerente com o comportamento do material vegetal. Pode-se observar então uma tendência de aumento no peso de

matéria seca das raízes, em razão das concentrações crescentes do amônio, ou seja, houve incremento de biomassa radicular.

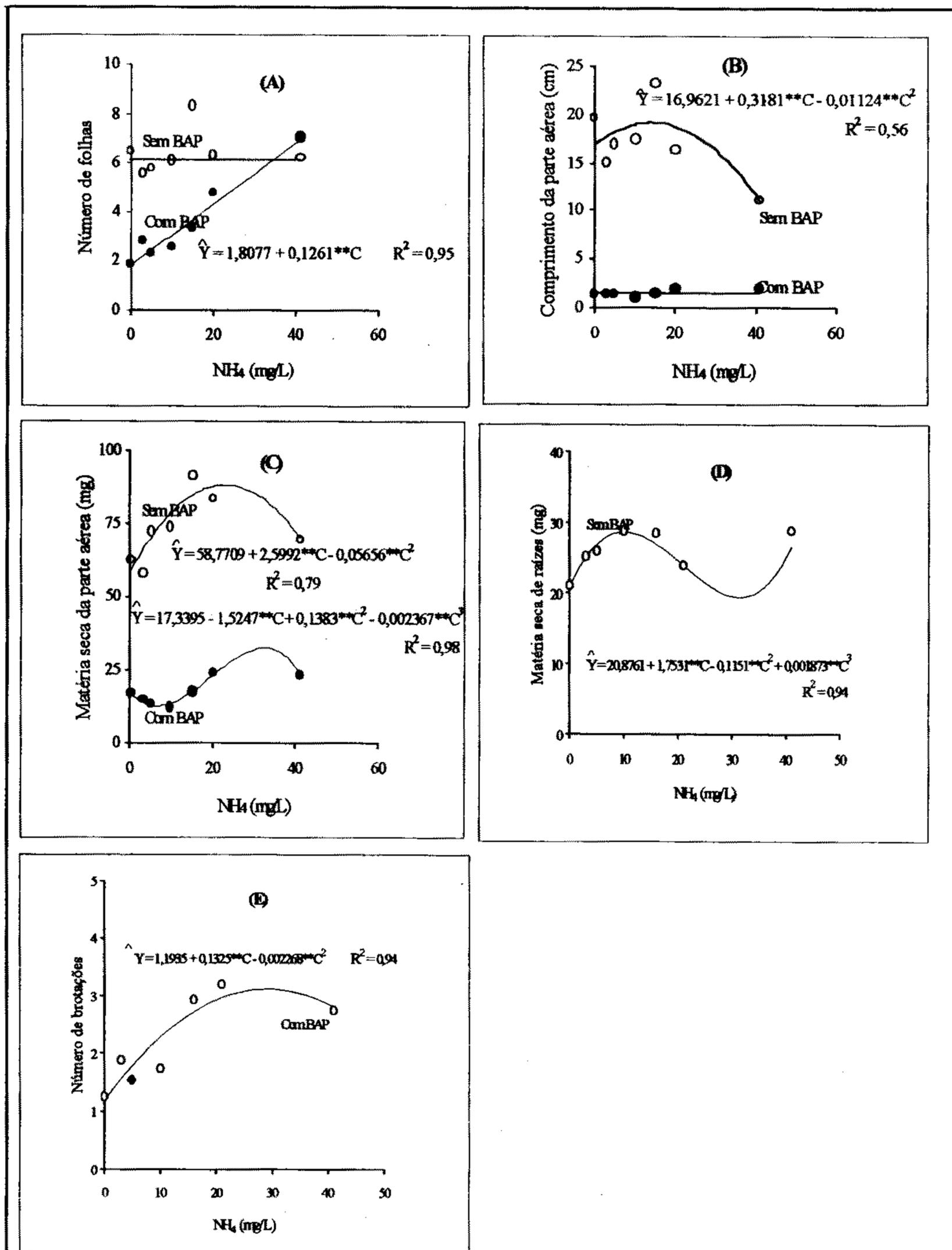


FIGURA 1 - Estimativa do número de folhas (A), do comprimento (B) e do peso da matéria seca da parte aérea (C), do peso da matéria seca de raízes (D) e do número de brotações (E) de plântulas de mandioca, cultivar Urubu, em função de concentrações de NH₄⁺, na presença e ausência de BAP.

A concentração de amônio que produziu maior número de brotações foi a de 29,21 mM, com 3,12 brotações/explante (Figura 1 E).

Poddar et al. (5) estudaram altas concentrações de nitrato de amônio, como substituto do ANA, em *Eleusine coracana*, e observaram que estas concentrações, de duas a seis vezes maiores do que a utilizada no meio MS, podem favorecer a regeneração de brotos na ausência do regulador de crescimento. Em presença de altas concentrações de nitrato de amônio com o ANA, o meio de cultura tornou-se tóxico para *Eleusine coracana*. Esses resultados coincidem com os deste trabalho quanto à grande interação entre o nitrato de amônio e o regulador de crescimento, seja ele uma auxina (ANA), seja citocinina (BAP).

Quanto à análise mineral sem BAP, o teor de nitrogênio cresceu. À proporção que a concentração de nitrato de amônio no meio com BAP aumentou, houve diminuição do teor de Ca e Mn e elevação nos valores de P e S. Por falta de material vegetal, não foi possível fazer a análise mineral de nitrogênio com BAP apenas na testemunha; o interessante é que, sem nitrato de amônio, a porcentagem de N foi de 6,2 (Quadro 2).

Segundo Reuter e Robinson (6), os valores nutricionais adequados na mandioca cultivada no campo são: N 5,0-6,0%; P 0,3-0,5%; K 1,2-2,0%; S 0,3-0,4%; Ca 0,6-1,5%; Mg 0,25-0,5%; Cu 7-15 ppm; Zn 40-100 ppm; Mn 50 ppm (crítico); e Fe 60-200 ppm. Não se podem comparar os resultados da análise mineral de plantas cultivadas no campo com as cultivadas *in vitro*, mas é possível fazer algumas inferências. Pelos resultados obtidos na análise mineral (Quadro 2), no caso de N, somente os tratamentos sem BAP e com 20,60 e 41,20 mM/L de NH_4^+ estavam no nível adequado; no caso de P, todos se encontravam no nível adequado; quanto ao Ca, as concentrações de 5,15, 15,45 e 20,60 mM/L de amônio apresentaram resultados inferiores aos do trabalho dos autores citados; quanto ao Mg, nas concentrações de 5,15 e 20,60 mM/L, os valores apresentados são inferiores aos do referido trabalho; no caso de Cu, todas as concentrações apresentaram-se abaixo; quanto ao Zn, todas as concentrações estavam acima e no nível tóxico; em relação ao Fe, somente a concentração de 20,60 mM/L sem BAP foi tóxica; e o Mn, somente as concentrações de 5,15 e 20,60 mM/L de NH_4^+ não atingiram o nível tóxico. Nos tratamentos com BAP, ocorreu o seguinte: P, os tratamentos 0,0, 2,57 e 5,15 mM/L de amônio estavam acima do nível adequado; S, todos os tratamentos estavam abaixo do nível adequado; Ca, todos também estavam abaixo do nível adequado; Mg, todos os tratamentos estavam acima do nível adequado; Cu, todos os tratamentos estavam abaixo do nível adequado; Zn, todos os tratamentos estavam acima do nível adequado e, ainda, segundo os referidos autores, tóxicos; Mn, apenas o tratamento com 0,0 mM/L de amônio era tóxico; Fe, apenas os tratamentos 0,0, 10,30 e 41,20 mM/L não eram tóxicos.

Ao se comparar os resultados da análise mineral entre os valores encontrados neste trabalho com os de Reuter e Robinson (6) esperava-se que os valores da análise mineral do material cultivado *in vitro* fossem bastante superiores, já que as plantas estão teoricamente em meio de cultura com todos os nutrientes em quantidade suficiente e muitas vezes considerada até acima do necessário. No entanto, apenas o resultado da análise mineral do Mn e do Zn do material *in vitro* foi muito acima em relação ao material do campo. Apesar de ter sido realizada a análise mineral somente do tratamento sem amônio (testemunha) nos tratamentos com BAP, devido à insuficiência de material vegetal dos demais tratamentos, observou-se que o teor de N foi semelhante ao da maior concentração de amônio sem BAP (Quadro 2). Esse resultado indicou que o BAP potencializou a utilização do nitrogênio do meio de cultura, que, apesar de não ter o nitrato de amônio como fonte de nitrogênio, fornece nitrato de potássio conforme formulação do meio MS. Em concentrações maiores de amônio nos tratamentos com BAP, esta absorção de N tornou-se prejudicial aos explantes de mandioca, levando-os a apresentarem desordens morfológicas e anatômicas.

CONCLUSÕES

A concentração de nitrato de amônio e a ausência ou presença do BAP afetam a micropropagação da mandioca. Na ausência do BAP, concentrações de $\frac{1}{4}$ até 1 da concentração original do MS proporcionam o desenvolvimento adequado da plântula de mandioca. Na presença do BAP há formação de brotações pequenas sem formação de raízes; concentrações em torno de $\frac{1}{2}$ da concentração original do MS favorecem o maior número de brotações sem apresentar vitrificação. Concentrações menores de nitrato de amônio que as utilizadas normalmente no meio MS podem ser utilizadas na micropropagação da mandioca.

REFERÊNCIAS

1. BRAGA, J.M. & DEFELIPPO, B.V. Determinação espectrofotométrica de fósforo em estratos de solos e plantas. *Revista Ceres*, 21:73-85, 1974.
2. CHESNIN, L. & YIEN, C.H. Turbidimetric determination of available sulfate. *Soil Science American Proceedings*, 15:149-51, 1950.
3. JACKSON, M.L. Nitrogen determination for soil plant tissue. In: Jackson, M.L. (ed.). *Soil and chemical analysis*. Englewood Cliffs, Prentice-Hall, 1958. p.183-204.
4. MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15:473-97, 1962.
5. 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*, 129:101-6, 1997.

6. REUTER, D.J. & ROBINSON, J.B. Plant analysis: an interpretation manual. Melbourne, Sydney, Inkata, 1988. 218p.
7. SATO, A.Y. Propagação de gérbera de vaso através da cultura de tecidos. Lavras, UFLA, 1994. 95p. (Dissertação de Mestrado).