

**EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE NITRATO
DE AMÔNIO NO CONTROLE DA OXIDAÇÃO *IN VITRO*
EM SEGMENTO CAULINAR DE PARICÁ
(*Schizolobium amazonicum* Huber ex Ducke)¹.**

Iracema Maria Castro Coimbra CORDEIRO²

Osmar Alves LAMEIRA³

Ilmarina Campos de MENEZES⁴

Marly Pedroso da COSTA⁵

Lana Roberta Sousa REIS⁶

RESUMO: Com objetivo de avaliar a ação das concentrações de nitrato de amônio, com adição de ácido cítrico e ácido ascórbico, segmentos nodais foram submetidos a condições de cultura *in vitro* com a finalidade de controlar a oxidação de paricá (*Schizolobium amazonicum*). O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Recursos Genéticos e Biotecnologia da Embrapa Amazônia Oriental, Belém (PA). Explantes provenientes do cultivo *in vitro* foram inoculados em tubos de ensaio contendo meio de cultura MS (Murashige e Skoog, 1962) com as concentrações de nitrato de amônio reduzidas a ½, ¼ e 0, suplementado com 3 mg.L⁻¹ de BAP (6-benzilaminopurina), 3 % de sacarose, e 0,1% das substâncias antioxidantes. Os explantes foram mantidos em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas de luz e intensidade luminosa de 25 µmol.m⁻².s⁻¹ de irradiância. Avaliou-se a intensidade de oxidação através da análise de variância e teste de regressão. Os resultados obtidos demonstraram que os tratamentos mais eficientes foram os que continham nitrato de amônio reduzido a ½ e que as duas substâncias antioxidantes influenciaram no controle da oxidação. Houve diferenças significativas em nível de 5% de probabilidade na intensidade de oxidação dos explantes de paricá. Foram observadas a formação de calos e a proliferação de brotos.

TERMOS PARA INDEXAÇÃO: *Schizolobium amazonicum*, Substâncias Antioxidantes, Reguladores de Crescimento.

¹ Aprovado para publicação em 16.06.2004

Parte da Dissertação de Mestrado apresentada pelo primeiro autor, para obtenção do grau Mestre junto a FCAP em 2002 com apoio financeiro da empresa Tramontina Belém S.A.

² Engenheira Florestal. E-mail: mgti@amazon.com.br

³ Engenheiro Agrônomo, Dr., Pesquisador da Embrapa Amazônia Oriental, Caixa Postal 48 – CEP 66095- 100- Belém (PA)

⁴ Engenheira Agrônoma, M.Sc., Técnica da Embrapa Amazônia Oriental.

⁵ Engenheira Agrônoma, Doutoranda da Universidade Federal do Ceará

⁶ Aluna do curso de Agronomia da UFRA, Bolsista CNPq/Embrapa Amazônia Oriental

EFFECT OF DIFFERENT AMMONIUM NITRATE CONCENTRATIONS IN THE CONTROL OF IN VITRO STEM SEGMENTS OXIDATION OF PARICA (*Schizolobium amazonicum* Huber ex Ducke).

ABSTRACT: Nodal segments of parica (*Schizolobium amazonicum*) were submitted to in vitro culture conditions to evaluate the action of the ammonium nitrate concentrations with addition of citric and ascorbic acid to control oxidation of explants. The research was made in the Genetic Resources and Biotechnology Laboratory of Embrapa, Oriental, Amazon, Belem (PA). Explants from the culture in vitro were inoculated in assay tubes of MS culture medium (Murashige e Skoog, 1962) with concentrations of ammonium nitrate reduced to $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{4}$ and 0 of the culture medium, supplemented with 3,0 mg.L⁻¹ of BAP (6-benzilaminopurina), 3 % of sucrose, and 0,1% of antioxidant substances. The explants were kept in growth room with a photoperiod of 16 hours of light and light intensity of 25 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ irradiance. Ammonium nitrate concentration reduced to $\frac{1}{2}$ with addition of the two antioxidant substances was the most efficient treatment decreasing ($P<0,05$) the intensity of explants oxidation. It was also observed the formation of callus and proliferation of shoots in the explants.

INDEX TERMS: *Schizolobium amazonicum*, Antioxidant Substances, Growth Regulators.

1 INTRODUÇÃO

A propagação *in vitro* vem sendo utilizada com muita frequência, constituindo-se uma prática rotineira para a produção de plantas com excelente estado sanitário, levando ao significativo incremento na produtividade de algumas espécies. Entretanto, as plantas lenhosas, como o paricá, apresentam maiores dificuldades para o estabelecimento *in vitro*, se comparada com as herbáceas. Dentre os fatores considerados mais sérios ao estabelecimento da cultura de tecidos, destaca-se a oxidação no material vegetal.

Fortes (1992) relata que o processo oxidativo em espécies lenhosas pode estar relacionado a certos eventos, como intensidade de luz, fotoperíodo, temperatura

e a concentração dos sais minerais do meio de cultura, especialmente o nitrogênio, a partir do nitrato de amônio. O nitrogênio é incluído no meio nutritivo na forma de sais inorgânicos, porém a forma e a concentração requerida varia entre as espécies, sendo necessário encontrar o balanço ideal de $\text{NH}_4^+ / \text{NO}_3^-$ para um desenvolvimento satisfatório (CALDAS; HARIDASAN; FERREIRA, 1998).

Para o controle da oxidação, medidas como: pré-tratamentos dos explantes, adição de antioxidantes ao meio de cultura, incubação inicial dos explantes no escuro e redução da concentração de sais ao meio de cultura têm sido recomendadas por Grattapaglia e Machado (1998) e Caldas, Haridasan e Ferreira (1998).

O escurecimento do tecido também tem sido atribuído à liberação de compostos fenólicos durante a excisão dos explantes, inibindo o crescimento da plântula, levando à morte. Conforme Andrade et al (2000), as plantas lenhosas acumulam polifenóis e produtos de oxidação, como melanina, suberina, lignina, cutina e calose em torno da superfície excisada, os quais modificam a composição do meio de cultivo e a absorção de metabólitos.

Para Oliveira, Mendes e Tulmann Neto, (1994), Flores et al (1998) e Torres, Caldas e Buso (1999), além do meio de cultura, fatores como luz, idade fisiológica do explante, nível endógeno de fitorreguladores e agentes gelificantes influenciam, consideravelmente, na intensidade de oxidação da espécie a ser cultivada.

No paricá (*Schizolobium amazonicum* Huber ex Ducke), a presença de oxidação tem sido constante, sendo necessário o desenvolvimento de metodologia específica para superar este entrave. Baseado nesta observação, objetivou-se estudar o efeito da concentração de nitrato de amônio na presença dos antioxidantes, ácido cítrico e ácido ascórbico, no controle da oxidação *in vitro* de segmento caulinar de paricá, com a finalidade de obter plântulas para posterior multiplicação.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Recursos Genéticos e Biotecnologia da Embrapa Amazônia Oriental, Belém (PA). Foram utilizados como explantes segmentos nodais de plântulas

obtidas *in vitro*. O delineamento experimental adotado foi inteiramente casualizado em arranjo fatorial 4 x 2 (4 concentrações de NH_4NO_3 e 2 antioxidantes) com cinco repetições, totalizando quarenta unidades experimentais, onde cada parcela constou de cinco tubos de ensaio contendo um explante por tubo.

Os tratamentos testados foram os seguintes: 1) MS + 0,1% de ácido cítrico (AC); 2) MS ($\frac{1}{2}$ NH_4NO_3) + 0,1% de AC; 3) MS ($\frac{1}{4}$ NH_4NO_3) + 0,1% de AC; 4) MS (Sem NH_4NO_3) + 0,1% de AC; 5) MS + 0,1% ácido ascórbico (AA); 6) MS ($\frac{1}{2}$ NH_4NO_3) + 0,1% de AA; 7) MS ($\frac{1}{4}$ NH_4NO_3) + 0,1% de AA e 8) MS (Sem NH_4NO_3) + 0,1% de AA. O meio de cultura básico MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) foi suplementado com 3 mg.L⁻¹ de BAP (6-benzilaminopurina), acrescido de 30 g.L⁻¹ de sacarose e solidificado com 0,6 % de agar em todos os tratamentos.

O pH dos meios de cultura foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem, utilizando-se NaOH (hidróxido de sódio) e/ou HCl (ácido clorídrico) em solução de 0,5 N. Tubos de ensaio de 20 x 150 mm contendo 10mL de meio de cultura foram autoclavados a 121°C por 15 minutos. Posteriormente, em câmara de fluxo laminar, previamente desinfetada com álcool etílico 70%, os explantes medindo 10mm de comprimento foram inoculados nos tubos de ensaio, os quais foram levados para sala de incubação com temperatura variando de 26°C ± 2°C, umidade relativa do ar média em torno de 70% com fotoperíodo de 16 h de luz / 8 h de escuro e irradiância de 25 µmol.m⁻².s⁻¹.

A coleta dos dados foi efetuada no décimo terceiro dia do cultivo com a contagem de presença e ausência de oxidação. Para esta variável os dados foram transformados em arco seno $\sqrt{\%Ox/100}$, onde Ox representa a oxidação, e submetidos à análise de variância. A observação visual foi o método utilizado para verificação de frequência de calos e proliferação de brotos, não sendo realizada análise estatística para essas duas variáveis.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A oxidação é um dos principais fatores que mais negativamente afeta o desenvolvimento de ensaios com espécies lenhosas. No caso em estudo, a oxidação se fez presente em todos os tratamentos, entretanto, a análise de variância indicou existir diferenças significativas somente para

concentração de nitrato de amônio. Os antioxidantes e a interação de antioxidantes e nitrato de amônio estatisticamente não apresentaram diferenças significativas (Tabela 1).

A inclusão de substâncias adsorventes ao meio de cultura tem sido relatada por muitos autores, como uma condição indispensável para o cultivo *in vitro* de espécies lenhosas. Este fato pode ser reforçado com os resultados obtidos em experimentos com quatro antioxidantes (ácido cítrico, ácido ascórbico, carvão ativado e PVP), onde segmentos nodais quando cultivados no meio MS acrescido com ácido ascórbico e ácido cítrico apresentaram menor intensidade de oxidação com 64 % e 69,04%, respectivamente (CORDEIRO, 2002).

TABELA 1 – Resumo da análise de variância para presença de oxidação em explantes de segmentos caulinar de paricá em função da concentração de nitrato de amônio e antioxidantes. Embrapa Amazônia Oriental. Belém-Pará, 2002.

Fonte de Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Antioxidantes (AO)	1	0,04151415	0,04151415	0,4548 ^{NS}
Nitrato de Amônia (NA)	3	0,62002315	0,20667438	2,2640*
AO X NA	3	0,11262915	0,03754305	0,4113 ^{NS}
Resíduo	32	2,92115442	0,09128608	
Total	39	3,69532088		
C.V.	70,24			
Média	23,66			

* Significativo; NS não significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.

Siqueira e Inoue (1991), em experimentos com *Cocos nucifera* L., conseguiram reduzir 50% da oxidação quando adicionaram estes ácidos ao meio. A utilização desses ácidos tem sido relatada como eficiente para retardar a oxidação de tecidos (MURASHIGE, 1974; EL HENNAWY; WALLY, 1980). Similaridade de resultado foi obtida por Melo et al (2001) com guarirrobeira, onde o ácido ascórbico foi o antioxidante mais eficiente no controle da oxidação. Para George (1993) e Melo et al (2001) a eficiência desses antioxidantes se deve ao fato de que eles reagem com os metais pesados do meio de cultura, evitando que os mesmos fiquem disponíveis para oxidar. Outros antioxidantes têm sido utilizados em espécies lenhosas, com resultados satisfatórios, variando de acordo com a espécie.

A alta amplitude de variação (C.V = 70,24%) ocorrida no trabalho está relacionada à variabilidade existente dentro do material utilizado, ou seja, sementes de genótipos variados. Deve-se ressaltar, ainda, que a variabilidade experimental pode estar ligada à variação no tamanho do explante e

à localização na plântula, basal ou mediana. Entretanto, à medida que as culturas vão sendo subcultivadas, o coeficiente de variação tende a diminuir, pois haverá uniformização do material.

Com relação à fonte de nitrogênio, os tratamentos mais eficientes foram aqueles em que a concentração de nitrato de amônio do meio de cultura MS foi reduzida à metade, independente do antioxidante utilizado. A curva de regressão mostra claramente que a intensidade de oxidação varia de acordo com a concentração do nitrato de amônio (Figura 1). Assim, verifica-se que reduzindo a concentração de nitrato de amônio à metade, diminui-se a oxidação. Porém, se este não for adicionado ao meio de cultura, o processo oxidativo tende a aumentar. Caldas e Caldas (1976) recomendam a redução parcial ou total dos níveis de NH_4NO_3 para combater a toxidez do cultivo *in vitro*. Por isso, os meios nutritivos se baseiam nas exigências das plantas quanto aos nutrientes minerais, com algumas modificações para atender as necessidades específicas *in vitro*.

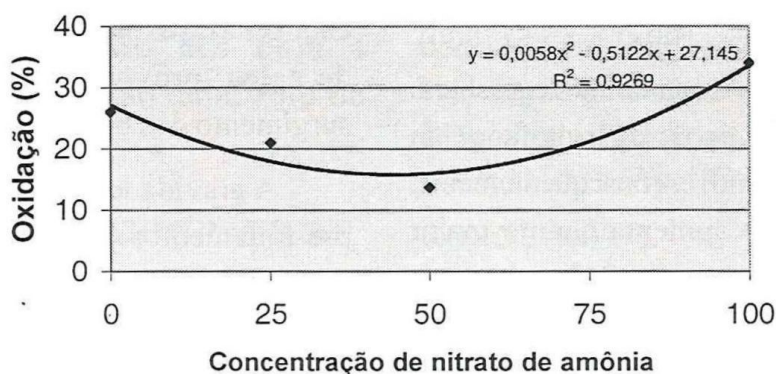


Figura 1 – Efeito de diferentes concentrações de nitrato de amônio com adição de ácido cítrico e ácido ascórbico sobre a oxidação de explantes de paricá cultivados em meio de cultura MS. Embrapa Amazônia Oriental – Belém, Pará, 2002.

Tem sido documentado que em muitas espécies o crescimento e o desenvolvimento das plântulas em condições de cultivo *in vitro* são influenciados pelas concentrações de sais minerais, especialmente o nitrogênio. Demeyer e Dejaegere (1992) e Terry e Raab (1994) relatam que a variação da oxidação pode estar relacionada ao fato do íon amônio ser imediatamente assimilado pelas plantas, provocando acidez da cultura ao redor do explante. Os mesmos autores explicam, ainda, que o pH do meio faz com que o nitrogênio exerça efeitos tóxicos nos explantes, bem como o nitrato de amônio pode diminuir a concentração de açúcar solúvel, provocando diferentes modificações nas funções metabólicas das plantas. Isso demonstra que a assimilação de elevadas concentrações de nitrato de amônio tende a ser altamente promotoras de oxidação entre as espécies lenhosas.

O nitrogênio se constitui no principal nutriente das plantas, entretanto, a concentração ótima e a forma usada podem estar diretamente relacionadas à concentração endógena de auxina no tecido vegetal. Esta assertiva está de acordo com os relatos de Zeiger (1998) e Cid (2000). Segundo esses autores, a auxina vegetal tem como precursor o aminoácido triptofano (um derivado do nitrogênio) e, conseqüentemente, a síntese da auxina aumenta quanto maior for a concentração de nitrogênio, visto que haverá maior síntese do aminoácido triptofano. Por outro lado, a redução na concentração de auxina pode levar à degradação, pois a enzima AIA oxidase

degrada a auxina AIA através do processo de oxidação (SALISBURY, 1991). Isso mostra que o processo oxidativo no paricá pode estar diretamente relacionado com a concentração de amônio, já que esta forma de nitrogênio entra na via metabólica de formação dos aminoácidos em uma das etapas mais adiantadas do processo metabólico da planta.

No caso em questão, a análise de regressão indica, ainda, que para se alcançar um mínimo de 15,83% de oxidação na cultura de paricá, a concentração ideal de nitrato de amônia deve ficar em torno de 44,15%, sugerindo-se o uso dessa concentração em trabalhos posteriores.

Quanto ao número de brotos e a frequência de calos, foi possível observar a presença destes a partir do quarto dia de incubação da cultura (Figura 2).

Os explantes mostraram pequena formação de calos compactos e friáveis, sugerindo que a redução do nitrato de amônio parece ser capaz de inibir a formação destes. Elevadas concentrações de citocinina parecem reagir com a quantidade de auxina endógena do explante, o que leva à formação de calos, provocando certa inibição no surgimento dos brotos.

A gravidade da oxidação tem levado a pré-tratamentos dos explantes e à adição de substâncias ao meio de cultura. Deste modo, apesar da baixa oxidação neste meio, há necessidade de ajustes para aumentar a eficácia do cultivo *in vitro* de segmentos nodais de paricá.



Figura 2 – Aspectos da formação de calos, brotos e oxidação em segmentos nodais de paricá em meio de cultura MS, na presença de antioxidantes. Embrapa Amazônia Oriental, Belém (PA). 2002.

4 CONCLUSÃO

a) a oxidação de segmentos caulinar de paricá diminui quando a concentração de nitrato de amônia no meio MS é reduzida à metade;

b) a frequência de calos diminui na presença do meio MS com a redução na concentração de nitrato de amônia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE, M. W. de.; LUZ, J.M.Q.; LACERDA, A.S.; MELO, P.R.A. de. Micropropagação da aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All). *Ciênc. Agrotec. Lavras*, v.24, n.1, p.174-180, jan./mar. 2000.
- 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 transformação genética de plantas*. Brasília, DF: EMBRAPA-CNPq, 1998. p.87-132.
- CALDAS, R.A.; CALDAS, L.S. Nitrate, ammonium and Kinetin effects on growth and enzyme activities of Paul's Scarlet Rose callus. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v.37, n.8, p. 111-116, Feb. 1976.
- CORDEIRO, I. M. C. C. *Respostas morfogênicas in vitro de paricá (Schizolobium amazonicum Huber ex Ducke)*. 2002. 61p. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) – Faculdade de Ciências Agrárias do Pará, 2002

- DEMEYER, K; DEJAEGERE, R. Effect of the nitrogen form used in the growth medium (NO_3^- , NH_4^+) on alkaloid production in *Datura stramonium* L. *Plant and Soil*, v. 147, p. 79-86, 1992.
- EL - HENNAWY, H. M.; WALLY, A. Vegetative propagation of date palm *Phoenix dactylifera* L. by explant culture in vitro. *Egyptian Journal of Horticulture*, Cairo, v. 7, p.211-220, 1980.
- FORTES, G. R. de L. *Calogênese e organogênese in vitro de macieira (Malus spp) afetados por fatores físicos, químicos e biológicos*. 1992. 163p. Tese (Doutorado) – UFV, Viçosa (MG), 1992.
- GEORGE, E. F. *Plant propagation by tissue culture: part. 1 – The Technology*. 2nd ed. Edington: Exegetics, 1993. 574p.
- MELO, B. de.; PINTO, J.E.B.P.; LUZ, J.M.Q.; PEIXOTO, J. R.; JULIATTI, F.C. Diferentes antioxidantes no controle da oxidação, germinação e desenvolvimento das plântulas na cultura in vitro de embriões da guarirrobeira [*Syagrus oleracea* (MART.) BECC.]. *Ciênc. Agrotec.*, Lavras, v.25,n.6,p.1301-1306, 2001.
- MURASHIGE, T. Plant propagation through tissue cultures. *Annual Review of Plant Physiology*, Palo Alto, v.25, p.135-166, 1974.
- ; SKOOG, F.A. A revised medium for rapid growth and bioassays with tabaco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, v.15, p.473-497, 1962.
- OLIVEIRA, R.P.; MENDES, B.M.J.; TULMANN NETO, A. A cultura de células em suspensão de dois porta-enxertos de citrus. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, v.5, n.2, p.141-144, 1994.
- SALISBURY, F. B. *Plant physiology: cleon*. 4th ed. Belmont: W. Ross, 1991. cap. 17, p. 357-381.
- SIQUEIRA, E. R. de.; INOUE, M. T. Controle de oxidação na cultura de tecidos do coqueiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, DF, v. 26, n.7, p.949-953, 1991.
- TERRY, N.; RAAB, T. K. *Nitrogen source regulation of growth and photosynthesis in Beta vulgaris L.* Berkley: University of California, 1994. p. 1159-1166.
- ZEIGER, T. E. *Plant physiology*. Massachutts: Sinauer, 1998. p. 543-589.