

Efeitos de diferentes concentrações de nitrato de amônio e nitrato de potássio na micropropagação de duas espécies de *Hypericum l.***Effects of different concentrations of ammonium nitrate and potassium nitrate on the micropropagation of two species of *Hypericum l.***

DOI:10.34117/bjdv6n11-063

Recebimento dos originais: 05/10/2020

Aceitação para publicação: 05/11/2020

Meiciane Ferreira Campelo

Doutoranda em Biodiversidade e Biotecnologia pela Rede Bionorte-PPGBionorte

Instituição: Universidade Federal do Pará (UFPA)

Endereço: Rua Augusto Corrêa, 01 – Guamá, Belém – PA, Brasil

E-mail: meicianecampelo@gmail.com

Osmar Alves Lameira

Doutor em Agronomia (Fitotecnia) pela Universidade Federal de Lavras

Instituição: Embrapa Amazônia Oriental

Endereço: Travessa Dr. Enéas Pinheiro, s/n, Marco, Belém - PA, Brasil.

E-mail: osmar.lameira@embrapa.br

Simone de Miranda Rodrigues

Doutora em Genética e Melhoramento pela Universidade Federal de Viçosa

Instituição: Embrapa Amazônia Oriental

Endereço: Travessa Dr. Enéas Pinheiro, s/n, Marco, Belém - PA, Brasil.

E-mail: simone.rodrigues@embrapa.br

Ana Caroline Batista da Silva

Graduanda em Agronomia pela Universidade Federal Rural da Amazônia

Instituição: Embrapa Amazônia Oriental

Endereço: Travessa Dr. Enéas Pinheiro, s/n, Marco, Belém - PA, Brasil.

E-mail: anacarolinebatista79@gmail.com

Mila Cristine Almeida dos Santos

Graduanda em Engenharia Florestal pela Universidade Estadual do Pará

Instituição: Embrapa Amazônia Oriental

Endereço: Travessa Dr. Enéas Pinheiro, s/n, Marco, Belém - PA, Brasil.

E-mail: milachris_almeida@yahoo.com

Ruanny Karen Vidal Pantoja Portal Moreira

Doutoranda em Biodiversidade e Biotecnologia pela Rede Bionorte-PPGBionorte

Instituição: Universidade Federal do Pará (UFPA)

Endereço: Rua Augusto Corrêa, 01 – Guamá, Belém – PA, Brasil

E-mail: ruanny_vidal@hotmail.com

Amanda Nascimento Monteiro

Graduanda em Agronomia pela Universidade Federal Rural da Amazônia
Instituição: Embrapa Amazônia Oriental
Endereço: Travessa Dr. Enéas Pinheiro, s/n, Marco, Belém - PA, Brasil.
E-mail: amandamonteiro788@gmail.com

Allan Christiam Santos Ramires

Graduando em Agronomia pela Universidade Federal Rural da Amazônia
Instituição: Embrapa Amazônia Oriental
Endereço: Travessa Dr. Enéas Pinheiro, s/n, Marco, Belém - PA, Brasil.
E-mail: allanramires15@gmail.com

RESUMO

As espécies *Hypericum cavernicola* L. B. SM e *Hypericum teretiusculum* A.St.-Hil. estão inseridas na família botânica Hypericaceae que possui distribuição cosmopolita, incluindo sete gêneros e aproximadamente 700 espécies. Essas espécies são valorizadas por apresentar uso popular medicinal. A cultura de tecido que consiste no cultivo asséptico *in vitro* de células, tecidos, órgãos ou plantas inteiras sob controle nutricional e condições ambientais possibilita a multiplicação de genótipos superiores em larga escala, o melhoramento genético e a conservação do germoplasma em meio a outras aplicabilidades. O objetivo do trabalho foi avaliar o efeito das diferentes concentrações dos compostos minerais nitrato de amônio e nitrato de potássio na micropropagação das duas espécies de *Hypericum L.*, visando à redução de custos do meio de cultura MS. O experimento consistiu em diferentes concentrações e fontes de nitratos na composição do meio MS (MS com $\frac{1}{2}$ NH_4NO_3 , MS com $\frac{1}{2}$ KNO_3 , MS com $\frac{1}{4}$ NH_4NO_3 , MS com $\frac{1}{4}$ KNO_3 e MS completo) totalizando cinco tratamentos, com quatro repetições composta por dois frascos contendo três explantes cada. Após 60 dias da inoculação avaliou peso médio de massa fresca e massa seca. Não ocorreu diferença significativa entre as diferentes concentrações e as fontes de nitrato na composição do meio de cultura MS para as variáveis avaliadas na micropropagação das espécies em estudo. O meio de cultura MS completo apresentou os maiores valores médios de peso de massa fresca e peso de massa seca. As fontes de nitratos e as diferentes concentrações não contribuíram para uma possível redução de custos do meio de cultura MS.

Palavras-chave: cultura de tecido, plantas medicinais, meio de cultura.

ABSTRACT

The species *Hypericum cavernicola* L. B. SM and *Hypericum teretiusculum* A.St.-Hil. they are inserted in the botanical family Hypericaceae, which has a cosmopolitan distribution, including seven genera and approximately 700 species. They are valued for their popular medicinal use. Tissue culture consisting of aseptic *in vitro* cultivation of cells, tissues, organs or whole plants under nutritional control and environmental conditions allows for the multiplication of superior genotype on a large scale, genetic improvement and conservation of germplasm amid other applications. The objective of the work was to evaluate the effect of the different concentrations of the mineral compounds ammonium nitrate and potassium nitrate on the micropropagation of *Hypericum L.* species, aiming to reduce the costs of the MS culture medium. The experiment consists of different concentrations and a source of nitrate in the composition of the MS medium (MS with $\frac{1}{2}$ NH_4NO_3 , MS with $\frac{1}{2}$ KNO_3 , MS with $\frac{1}{4}$ NH_4NO_3 , MS with $\frac{1}{4}$ KNO_3 and complete MS) totaling five treatments, with four replicates consisting of two vials containing three explants each. After 60 days of inoculation, the average weight of fresh and dry weight was evaluated. There was no significant difference between the different concentrations and sources of nitrate in the composition of the MS culture medium for the variables evaluated in the micropropagation of the species under study. The complete MS culture

medium showed the highest mean values of fresh weight and dry weight. The sources of nitrates and the different concentrations did not contribute to a possible cost reduction of the culture medium MS.

Keywords: tissue culture, medicinal plants, culture medium.

1 INTRODUÇÃO

A Hypericaceae no Brasil é composta por dois gêneros: *Hypericum* L. e *Vismia* Vand com 56 espécies, sendo apenas 26 espécies pertencentes ao gênero *Hypericum* L. Dentre elas encontre-se *Hypericum cavernicola* L. B. SM e *Hypericum teretiusculum* A.St.-Hil, ambas com distribuição geográfica no Sul e domínios fitogeográficos na Mata Atlântica e Pampa (FLORA DO BRASIL, 2020),

O gênero *Hypericum* L. vem despertando grande interesse por conta do potencial fitoterápico por apresentarem propriedades antiviral (TAKAHASHI et al., 1989), antifúngica (FENNER et al., 2005) e anticancerígena (SCHEMPP et al., 2002) e/ou antibacteriana (FRANÇA et al., 2009) e sem atividade mutagênica (ESPÓSITO et al., 2005).

As espécies *Hypericum cavernicola* L. B. SM e *Hypericum teretiusculum* A.St.-Hil são igualmente empregadas popularmente por comunidades nativas para fins medicinais como, cicatrizante, antiviral e anti-inflamatório, muito embora o conhecimento sobre as propriedades medicinais destas ainda não tenham comprovação científica (FRANÇA et al., 2009).

A cultura de tecidos dispõe de alternativas para uma maior produção de biomassa e para garantir a perpetuação de espécies de interesse econômico, apesar das informações científicas sobre plantas medicinais crescerem num ritmo pouco intenso no que se refere aos métodos de propagação, de manipulação *in vitro* e de produção de metabólitos de interesse (MORAIS, 2012; SOUZA, 2018).

Os meios de cultura usados para o cultivo vegetal são compostos de substâncias orgânicas e inorgânicas que possuem carboidratos, vitaminas, macro e micronutrientes. A importância que os nutrientes minerais exercem, em sua grande maioria está relacionada ao nitrogênio, visto que é o constituinte de diversos componentes celulares (aminoácidos, ácidos nucleicos e proteínas) e são limitantes no crescimento dos vegetais, sendo o nitrato (NO_3^-) e o amônio (NH_4^+) as principais formas nitrogenadas absorvidas pelas plantas (TAIZ ZEIGER, 2013). No cultivo *in vitro* o meio de cultura comumente utilizado é o MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962).

2 OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi analisar o efeito das diferentes concentrações dos compostos minerais NH_4NO_3 e KNO_3 na micropropagação de *Hypericum cavernicola* e *Hypericum teretiusculum* A.St.-Hil, visando à redução de custos do meio de cultura MS.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Recursos Genéticos e Biotecnologia Vegetal da Embrapa Amazônia Oriental situada no município de Belém-PA. Testaram-se diferentes concentrações dos compostos minerais nitrato de amônio e nitrato de potássio do meio MS sólido, com as seguintes variações: meio MS completo, MS com $\frac{1}{2}$ KNO₃, MS com $\frac{1}{4}$ KNO₃, MS com $\frac{1}{2}$ NH₄NO₃ e MS com $\frac{1}{4}$ NH₄NO₃, totalizando 5 tratamentos composto por 4 repetições com duas réplicas cada, considerando cada repetição um frasco contendo 30 ml de meio nutritivo com 3 explantes. Após inoculação em condições assépticas em câmara de fluxo laminar o material foi mantido em sala de crescimento com temperatura entre 25° a 30 °C e fotoperíodo de 16 h luz branca fria. Utilizou-se como fonte de materiais vegetais plântulas provenientes do cultivo *in vitro*

A avaliação ocorreu 60 dias após a inoculação dos explantes, e com o auxílio de balança de precisão registrou-se o peso médio de massa fresca (g) e após 72 horas de secagem do material em estufa por 36^o C obteve-se o peso médio de massa seca (g). Para cada espécie em estudo aplicou-se o delineamento inteiramente casualizado, os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância, utilizando o programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2011) e com o auxílio do software Excel foi realizada análise de regressão linear dos tratamentos para as espécies.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Conforme observado na Tabela 1, não ocorreu diferença estatística nas variáveis avaliadas entre os meios de cultura para as espécies de *Hypericum L.* em estudo. No entanto, notasse que o meio MS completo apresentou os maiores valores médio de 1,12 g para peso de massa fresca e 0,16 g para peso de massa seca para a espécie *Hypericum teretiusculum* A.St.-Hil., e 2,19 g para peso de massa fresca e 0,24 g para peso de massa seca para a espécie *Hypericum cavernicola* L. B. SM. De acordo com Silva et al. (2001) estudando fontes de nitrogênio em meio de cultura MS visando o desenvolvimento *in vitro* do porta enxerto ‘Trifoliata’, concluíram que os resultados mais promissores foram obtidos em composição dos sais da fonte KNO₃ associada a altas concentrações de NH₄NO₃ no meio de cultura.

Os menores valores foram obtidos no meio de cultura MS + $\frac{1}{4}$ KNO₃ para ambas as espécies (Tabela 1). Segundo Ribeiro & Teixeira (2008), o KNO₃ é um importante componente do meio de cultura por ter N e K e atua como regular osmótico o que está diretamente relacionado a valores finais de biomassa. Santos (2011) ressalta a importância do KNO₃ associado a outras fontes de nitrogênio, uma vez que obteve redução dos custos com o meio de cultura para o desenvolvimento de embriões somáticos de pupunheira, através da adição de KNO₃ em cultivos com NH₄Cl o que contribuiu para

que não houvesse deficiência de nitrogênio no decorrer dos cultivos tornando tais associação de fontes de nitrogênio uma alternativa vantajosa.

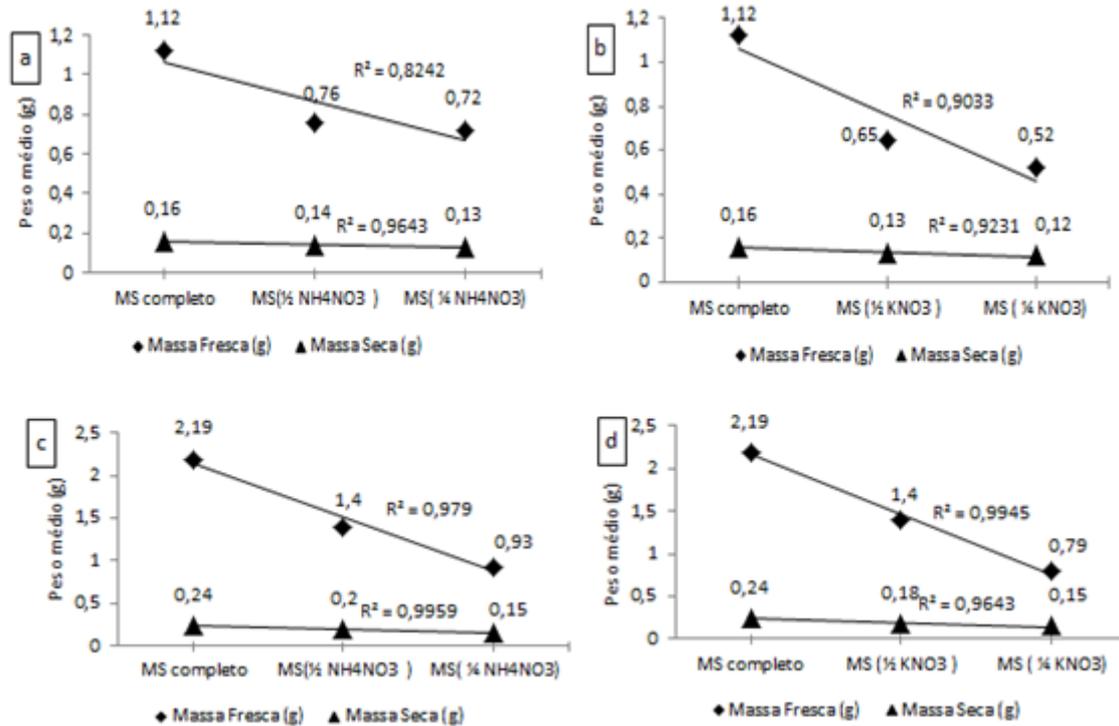
Tabela 1. Valores médios entre pesos de massa fresca e massa seca das plântulas de *Hypericum cavernicola* L. B. SM e *Hypericum teretiusculum* A.St.-Hil em meio MS com diferentes concentrações de NH_4NO_3 e KNO_3 .

Meio de Cultura	<i>Hypericum teretiusculum</i> A.St.-Hil		<i>Hypericum cavernicola</i> L. B. SM	
	Massa Fresca (g)	Massa Seca (g)	Massa Fresca (g)	Massa Seca (g)
MS completo	1.12 a	0.16 a	2.19 a	0.24 a
MS ($\frac{1}{2}$ NH_4NO_3)	0.76 a	0.14 a	1.40 a	0.20 a
MS ($\frac{1}{2}$ KNO_3)	0.65 a	0.13 a	1.40 a	0.18 a
MS ($\frac{1}{4}$ NH_4NO_3)	0.72 a	0.13 a	0.93 a	0.15 a
MS ($\frac{1}{4}$ KNO_3)	0.52 a	0.12 a	0.79 a	0.15 a

Médias seguidas com a mesma letra na vertical não diferem significativamente entre si, pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Os gráficos de regressão linear mostram que para as espécies *Hypericum teretiusculum* A.St.-Hil (Figuras 1a-b) e *Hypericum cavernicola* L. B. SM (Figuras 1c- d), as variáveis analisadas apresentaram uma diminuição no peso médio de massa fresca e seca a medida que se diminui as concentrações das fontes de nitrato, ou seja observando a linha de tendência notasse que as concentrações de NH_4NO_3 e KNO_3 são diretamente proporcional a produção de biomassa na micropropagação das espécies apresentando maiores pesos médios das variáveis no tratamento em que a concentração de nitratos da composição do meio MS esta completa. Para Capaldi (2002), a forma específica e as concentrações de nitrogênio presente no meio de cultura podem afetar o desenvolvimento vegetal *in vitro* estimulando ou inibindo.

Figura 1- Médias de massa fresca (a) e de massa seca (b) provenientes da micropropagação de *Hypericum cavernicola* L. B. SM e de médias de massa fresca (c) e de massa seca (d) da micropropagação de *Hypericum teretiusculum* A.St.-Hil em meio MS com diferentes concentrações de NH_4NO_3 e KNO_3 aos 60 dias de cultivo *in vitro*.



5 CONCLUSÃO

As diferentes concentrações e fontes de nitratos não promoveram diferenças significativas entre as variáveis avaliadas. Nesse sentido, possivelmente não contribuíram para a redução de custos do meio de cultura MS.

REFERÊNCIAS

- CAPALDI, F. R. Avaliação de diferentes fontes de nitrogênio em explantes de *Cryptomeria japonica* D. DON. “Elegans” cultivados *in vitro*: análises bioquímicas e relações entre reguladores vegetais. 2002. 65 f. **Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.**
- ESPÓSITO, A. V.; PEREIRA, D. M. V.; ROCHA, L. M.; CARVALHO, J. C. T.; MAISTRO, E. L.. Evaluation of the genotoxic potential of the *Hypericum brasiliense* (Guttiferae) extract in mammalian cell system *in vivo*. **Genetics and Molecular Biology**, v.28, n.1, p.152-155, 2005.
- FENNER, R.; SORTINO, M.; RATES, S. K.; DALL’AGNOL, R.; FERRAZ, A.; BERNARDI, A. P.; ZACCHINO, S. Antifungal activity of some Brazilian *Hypericum* species. **Phytomedicine**, v. 12, n. 3, p. 236-240, 2005.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia** (UFLA), v. 35, n.6, p.1039-1042, 2011.

FRANÇA, H. S.; KUSTER, R. M.; RITO, P. D. N.; OLIVEIRA, A. P. D.; TEIXEIRA, L. A.; ROCHA, L. Atividade antibacteriana de floroglucínóis e do extrato hexânico de *Hypericum brasiliense* Choysi. **Química Nova**, v.32, n.5, p.1103-6, 2009.

MORAIS, T.P., Luz, J.M.Q.; Silva, S.M.; Resende, R.F.; Silva, A.S. Aplicações da cultura de tecidos em plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n.1, p.110-121, 2012.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays whith tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, n.3, p.473-497, 1962.

RIBEIRO, J. M.; TEIXEIRA, S. Substituição de nitrato de potássio (PA) por salitre potássico no preparo de meio de cultura de tecidos vegetais esterilizados com hipoclorito de sódio. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, n. 4, p. 1209-1213, 2008.

SANTOS, T. L. D.; ALMEIDA, C. V. D.; BRONDANI, G. E.; ALMEIDA, M. D. Nitrato de amônio e nitrato de potássio no desenvolvimento in vitro de embriões somáticos de pupunheiras. **Ciência Rural**, v.40, n.7, p.1655-1659, 2010.

SCHEMPP, C. M.; MÜLLER, K. A.; WINGHOFER, B.; SCHÖPF, E., SIMON, J. C. St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.). A plant with relevance for dermatology. **Der Hautarzt; Zeitschrift fur Dermatologie, Venerologie, und Verwandte Gebiete**, v.53, n.5, p.316-321, 2002.

SILVA, A. B.; PIO, R.; RAMOS, J. D.; MENDONÇA, V.; PASQUAL, M.; CALEGARI, M. Influência das fontes de nitrogênio NH_4NO_3 e KNO_3 no desenvolvimento in vitro do porta enxerto 'Trifoliata'. **Revista Científica Rural**, v.6, n. 2, p.147-152, 2001.

SOUZA, J. C. D.; RESCAROLLI, C. L. D. S.; NUNEZ, C. V. Produção de metabólitos secundários por meio da cultura de tecidos vegetais. **Revista Fitos**, v.12, n.3, p.269-280, 2018.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 918 p.

TAKAHASHI, I.; Nakanishi, S.; Kobayashi, E.; Nakano, H.; Suzuki, K.; Tamaoki, T. Hypericin and pseudohypericin specifically inhibit protein kinase C: possible relation to their antiretroviral activity. **Biochemistry and Biophysics Research Communication**, v.165, p.1207-12, 1989.