EFEITO DA NUTRIÇÃO NITROGENADA NO CRESCIMENTO E DIFERENCIAÇÃO DE CALOS DE CANA-DE-AÇÚCAR (SACCHARUM SPP, VAR. IAC 48-65)

CHRISTINA HELENA RUPP PAIVA GONÇALVES

Orientador: Prof. Dr. OTTO JESU CROCOMO

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Agronomia. Área de concentração: Solos e Nutrição de Plantas.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Junho, 1984

Dedico

a meus pais, Sylvio e Martha
e a Silvio, Sérgio e Marcello, meus irmãos

Ofereço

ao Madeira, à Carolina
e a quem mais chegar

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Otto Jesu Crocomo, pela orientação firme e segura, pelo estímulo e apoio decisivos para a realização deste trabalho.

Aos Drs. Neftali Ochoa Alejo e A. N. Gonçalves, pela amizade, pelas sugestões e discussões.

Ao Engº Agrº Osni Bacchi, Supervisor da Seção de Fisiologia e Matologia, Planalsucar, pelo apoio e incentivo.

À Engª Agrª Esther M.C.F. Cavalcanti, Seplav Planalsucar (Araras, SP), pela amizade e pelo auxílio nas análises estatísticas.

Ao Técnico Celso do Amaral e à Biológa Silvana Perissato, às auxíliares D. Nega e Marilú, do Laboratório de Cultura de Tecidos de Cana-de-açúcar, Planalsucar (Araras, SP) pela amizade e pelo auxílio técnico prestado na realização deste trabalho.

Ao Técnico Enio T. de Oliveira (CENA, Piracicaba, SP) pela colaboração e amizade.

Aos meus colegas e amigos da Seção de Bioquímica de Plantas, do CENA e do Planalsucar, pela amizade e colaboração.

Aos Arquitetos Egídio Simoni e Renata Toledo Leme, pela elaboração de gráficos e figuras.

À Sra. Angela Monnerat, pelos serviços de datilografia.

Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura (Piracicaba, SP) e ao Planalsucar (Araras. SP), pelas facilidades técnicas.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa de estudos.

Ao meu marido e companheiro, Madeira, cujo apoio tornou este trabalho possível.

A todos que direta ou indiretamente, contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

ÍNDICE

Resumo xi
Summary xii
1. INTRODUÇÃO 01
2. REVISÃO DA LITERATURA 05
2.1. Nitrogênio no metabolismo de plantas . . . 05
3. MATERIAL E MÉTODOS 14
3.1. Cultivo de plantas de cana-de-açúcar . . . 14
3.2. Obtenção de explantes e calos 14
3.3. Transferência dos calos para meio contendo diferentes níveis de nitrogênio inorgânico . 15
3.4. Meios de cultura 15
3.4.1. Meio indutor de calo 15
3.4.2. Meio contendo diferentes níveis de nitrogênio inorgânico 15
3.5. Avaliação qualitativa do crescimento celular 15
3.6. Determinação de peso fresco e peso seco . . 18
3.7. Determinações bioquímicas 18
3.7.1. Preparação do extrato alcoólico . . . 18
3.7.2. Preparo do extrato alcalino 18
3.7.3. Proteína 19
3.7.3.a. Soluções 19
3.7.3.b. Procedimento 19
3.7.4. Nitrogênio solúvel em álcool . . . 19
3.7.4.a. Soluções 19
3.7.4.b. Procedimento 19
3.7.5. Determinação de amônio 20
3.7.5.a. Soluções 20
3.7.5.b. Procedimento 20
3.7.6. Determinação de açúcares redutores totais solúveis em álcool 20
3.7.6.a. Soluções 20
3.7.6.b. Procedimento 20

3.7.7. Determinação de açúcares redutores solúveis em álcool 21
3.7.7.a. Soluções 21
3.7.7.b. Procedimento 21
3.8. Análise estatística 22
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 23
4.1. Crescimento e diferenciação de calos de cana-de-açúcar, variedade IAC 48-65 23
4.1.1. O papel dos reguladores de crescimento 23
4.1.2. O modelo de crescimento observado . . 25
4.2. Alguns aspectos do metabolismo de células de cana-de-açúcar 36
4.2.1. Influência de diferentes níveis de nitrogênio inorgânico e variações na razão amônio/nitrato no metabolismo do nitrogênio 36
4.2.2. Influência de níveis de nitrogênio no metabolismo de carboidratos em calos de cana-de-açúcar 46
5. CONCLUSÕES 52
6. LITERATURA CITADA 54
7. APÊNDICE 64

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Assimilação de nitrato 06
Figura 2 - Via glutamato desidrogenase 07
Figura 3 - Via GS/GOGAT 08
Figura 4 - Influência de diferentes concentrações de nitrogênio e da razão amônio/nitrato em células de calos de cana-de-açúcar (var. IAC 48-65) 29
Figura 5 - Índice de crescimento (IC) de calos de cana-de-açúcar, var. IAC 48-65, cultivados em meio de cultura contendo diferentes níveis de nitrogênio inorgânico . . 31
Figura 6 - Matéria fresca, matéria seca e matéria seca/matéria fresca x 100 de calos de cana-de-açúcar, var. IAC 48-65, cultivados em meio de cultura contendo concentrações crescentes de nitrogênio inorgânico 34
Figura 7 - Teores de proteína em calos de cana-de-açúcar, var. IAC 48-65, cultivados em meio de cultura contendo diferentes níveis de nitrogênio inorgânico 38
Figura 8 - Variação nos níveis de nitrogênio solúvel e amônio livre em calos de cana-de-açúcar, var. IAC 48-65, cultivados em meio de cultura contendo diferentes níveis de nitrogênio inorgânico 43
Figura 9 - Influência de diferentes concentrações de nitrogênio inorgânico nos teores de açúcares solúveis (AR) e açúcares solúveis totais (ART) 48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Influência do tempo de cultivo em meio indutor de calos na capacidade organogênica de células não diferenciadas de três variedades de cana-de-açúcar . . . 04
Tabela 2 - Composição do meio indutor de calo . . 16
Tabela 3 - Razão amônio/nitrato e total de nitrogênio inorgânico nos diferentes meios de cultura estudados 17
Tabela 4 - Comparação entre a composição do meio de WHITE e o meio indutor de calo de MURASHIGE e SKOOG 26
Tabela 5 - Composição do meio indutor de parte aérea 27
Tabela 6 - Índice de crescimento de calos de cana-de-açúcar 32
Tabela 7 - Influência de diferentes concentrações de nitrogênio inorgânico sobre matéria fresca, matéria seca e matéria seca/matéria fresca x 100 de calos de cana-de-açúcar, var. IAC 48-65 35
Tabela 8 - Influência de diferentes concentrações de nitrogênio inorgânico sobre o teor de proteína em calos de cana-de-açúcar var. IAC 48-65 39
Tabela 9 - Influência de diferentes concentrações de nitrogênio inorgânico sobre o teor de nitrogênio solúvel em calos de cana-de-açúcar, var. IAC 48-65 44
Tabela 10- Influência de diferentes concentrações de nitrogênio inorgânico sobre o teor de amônio livre em calos de cana-de-açúcar var. IAC 48-65 45
Tabela 11- Influência de diferentes concentrações de nitrogênio inorgânico sobre o teor de

açúcares redutores (AR) em calos de cana-de-açúcar, var. IAC 48-65 49

Tabela 12- Influência de diferentes concentrações de nitrogênio inorgânico sobre o teor de açúcares redutores totais (ART) em calos de cana-de-açúcar, var. IAC 48-65 . . . 50

LISTA DE FIGURAS DO APÊNDICE

Figura I - Calo cultivado em meio de cultura contendo 100mM de nitrogênio inorgânico (NH_4^+/NO_3^- - 1:4,00) 65
Figura II - Calo Cultivado em meio de cultura contendo 80mM de nitrogênio inorgânico (NH_4^+/NO_3^- - 1:3,00) 66
Figura III - Calo cultivado em meio de cultura contendo 75mM de nitrogênio inorgânico (NH_4^+/NO_3^- - 1:2,75) 67
Figura IV - Calo cultivado em meio de cultura contendo 70mM de nitrogênio inorgânico (NH_4^+/NO_3^- - 1:2,50) 68
Figura V - Calo cultivado em meio de cultura contendo 65mM de nitrogênio inorgânico (NH_4^+/NO_3^- - 1:2,25) 69
Figura VI - Calo cultivado em meio de cultura contendo 60mM de nitrogênio inorgânico (NH_4^+/NO_3^- - 1:2,00) 70
Figura VII - Calo cultivado em meio de cultura contendo 55mM de nitrogênio inorgânico (NH_4^+/NO_3^- - 1:1,75) 71
Figura VIII - Calo cultivado em meio de cultura contendo 50mM de nitrogênio inorgânico (NH_4^+/NO_3^- - 1:1,50) 72
Figura IX - Calo cultivado em meio de cultura contendo 45mM de nitrogênio inorgânico (NH_4^+/NO_3^- - 1:1,25) 73
Figura X - Calo cultivado em meio de cultura contendo 40mM de nitrogênio inorgânico (NH_4^+/NO_3^- - 1: 1,00) 74
Figura XI - Calo cultivado em meio de cultura sem nitrogênio inorgânico (controle) . . 75

ABREVIATURAS

2,4D - ácido 2,4 diclorofenoxiacético
AR - açúcares redutores
ART - açúcares redutores totais
ADP - adenosina difosfato
ATP - adenosina trifosfato
atm - atmosferas
GDH - glutamato desidrogenase
GOGAT - glutamato sintase
GS - glutamato sintetase
IC - índice de crescimento
MC - meio indutor de calo
mM - milimolar
m.s. - matéria seca
N - normal
NAA - ácido naftaleno acético
NAD - nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADH - nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida
NADP - nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NADPH - nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
NiR - nitrito redutase
NR - nitrato redutase
N - nitrogênio
UV - ultra violeta
W - watts

EFEITO DA NUTRIÇÃO NITROGENADA NO CRESCIMENTO E DIFERENCIAÇÃO DE CALOS DE CANA-DE-AÇÚCAR (*Saccharum* spp., variedade IAC 48-65).

Christina H. R. de Paiva Gonçalves

Prof. Dr. Otto Jesu Crocomo
Orientador

RESUMO

Calos de cana-de-açúcar obtidos a partir de explantes da variedade IAC 48-65, foram cultivados em meio de cultura contendo concentrações crescentes de nitrogênio inorgânico e razão amônio/nitrato, no qual a concentração de amônio foi mantida, enquanto que a concentração de nitrato foi aumentada gradativamente.

Nos calos de cana-de-açúcar cultivados em meio de cultura contendo entre 50mM e 65mM de nitrogênio inorgânico e razão amônio/nitrato próxima de 1:2, observou-se um maior desenvolvimento de primórdios foliares e parte aérea. O crescimento, em termos de peso fresco, também foi maior nestes meios de cultura.

Os calos em processo de diferenciação não diferiram dos calos nos quais este processo não ocorreu, quanto à matéria seca, matéria fresca / matéria seca x 100 e níveis de proteína celular.

São discutidas as variações nos teores celulares de nitrogênio solúvel, amônio, açúcares solúveis e

açúcares solúveis totais e a correlação destes com a capacidade morfogenética de calos de cana-de-açúcar.

EFFECT OF NITROGEN NUTRITION IN GROWTH AND DIFFERENTIATION OF SUGARCANE (*Saccharum* spp., var. IAC 48-65) CALLI

Christina H. R. de Paiva Gonçalves

Prof. Dr. Otto Jesu Crocomo
Advisor

SUMMARY

Sugarcane calli were obtained from a brazilian commercial variety, IAC 48-65. The calli were cultivated in a basic medium containing different concentration of inorganic nitrogen. The amonium/nitrate ratios were different in each medium.

The sugarcane calli grown in medium containing between 50mM and 65mM of inorganic nitrogen and an amonium/nitrate ratio around 1:2 presented shoot--forming capacity. The growth of shoot forming calli was higher in these media.

Shoot forming calli did not differ from non shoot forming calli in dry matter, dry matter/fresh matter x 100 and in protein levels.

The variations in the cellular level of soluble nitrogen, amonium, soluble sugars and total soluble sugars and it's correlation with the morphogenetic process are discussed.

1. INTRODUÇÃO

A cultura de células, tecidos e orgãos de plantas é uma técnica que explora a totipotência de células vegetais. A possibilidade de se obter uma plântula completa a partir de uma única célula em meio de cultura, foi demonstrada pela primeira vez por BRAUN, em 1959.

O fenômeno da totipotência permite o cultivo de células vegetais não diferenciadas e a sua diferenciação em plântula completa, através da alteração dos componentes do meio de cultura. Assim, esta técnica tornou-se uma poderosa ferramenta no estudo das exigências nutricionais, do metabolismo e da fisiologia de células vegetais.

Além de ser um sistema excelente para o estudo dos fenômenos de morfogênese e diferenciação, o cultivo de células vegetais *in vitro* tem um potencial muito grande do ponto de vista aplicado, como a obtenção e extração de produtos do metabolismo secundário de determinadas culturas, e a manipulação genética do genoma, visando o melhoramento.

Na área de melhoramento de plantas,as formas de abordagem são amplas, envolvendo a simples exploração da variabilidade genética natural presente na planta doadora, exposição de células não diferenciadas a agentes mutagênicos e seleção de células *in vitro* através de cultivo

em meio contendo agentes agressivos como herbicidas, toxinas de patógenos, etc. (CROCOMO e OCHOA ALEJO, 1983 e CHALEFF, 1983). Além disso, podem ser utilizadas técnicas sofisticadas, como fusão de protoplastos e introdução de material genético "estranho" (cloroplastos, mitocôndrias, plasmídeos). (BARTON e BRILL, 1983, SHEPARD *et alii*, 1980 e SHEPARD *et alii*, 1983).

Para que estas técnicas atinjam o objetivo final, ou seja, uma planta geneticamente superior à planta doadora, é necessário que as células vegetais não diferenciadas apresentem capacidade de regenerar plantas intactas, com alto rendimento. Este processo de regeneração de parte aérea e raízes, além de envolver um equilíbrio na concentração dos fitohormônios, requer uma dosagem ideal dos nutrientes presentes no meio de cultura. Dos nutrientes necessários para dar início e manter o processo de diferenciação, o nitrogênio inorgânico parece ter um papel fundamental, tanto na síntese proteica como na síntese de hormônios específicos.

O cultivo *in vitro* de células de cana-de-açúcar originadas de explantes obtidos de variedades comerciais utilizadas no Brasil, como IAC 48-65, NA 56-79 e CB 41-76, permitiu algumas observações quanto à influência do genoma e do meio de cultura na capacidade de regeneração de parte aérea. Calos de IAC 48-65 apresentam capacidade organogênica alta, mesmo após seguidas transferências em meio indutor de calos (MC). Calos obtidos a partir de explantes da variedade NA 56-79 apresentam redução no número de plântulas por calos e na frequência de regeneração, quando transferidas mais de uma vez para meio contendo ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4D). Os calos obtidos de explantes de variedade CB 41-76 só podem ser transferidos uma única vez, já que perdem totalmente a capacidade organogenética se expostos por mais de 30 dias ao 2,4D. A presença de plântulas albinas pode, por sua vez, indicar a sensibilidade destas variedades à ação mutagênica da auxina sinté

tica (tabela 1 - Dados não publicados, Seção de Bioquímica de Plantas, CENA, Piracicaba, SP e Planalsucar, Araras, SP 1981).

A otimização na obtenção de plântulas de cana de açúcar *in vitro* e a possibilidade de se desenvolver um meio de cultura que permitisse transferências seguidas de células, sem que estas perdessem a capacidade de regenerar plântulas, é um dos objetivos fundamentais a serem atingidos em projetos que envolvem o melhoramento através desta técnica. Neste sentido, iniciou-se um estudo sobre a influência de diferentes níveis de nitrogênio inorgânico e da razão amônio/nitrato no crescimento e na diferenciação celular de calos de cana-de-açúcar.

Tabela 1. Influência do Tempo de Cultivo em Meio Indutor de Calos (MC) na capacidade Organogênica de Células Não Diferenciadas de Três Variedades de Cana-de-açúcar (CENA e Planalsucar, 1981, Dados não Publicados)

Variedade	Transferências para MC[a]	Nº de calos transferidos	% de calos com regeneração de parte aérea	Média de plântulas por calos (touceira)	% de frascos com plantas albinas
CB 41-76	1x	125	46	2,5	60
NA 56-79	1x	31	23	3,6	3,2
NA 56-79	2x - 3x	178	14	1,6	16
IAC 48-65	2x	87	61	6,1	26

a MC = meio indutor de calos contendo ácido 2,4 diclorofenoxiacético

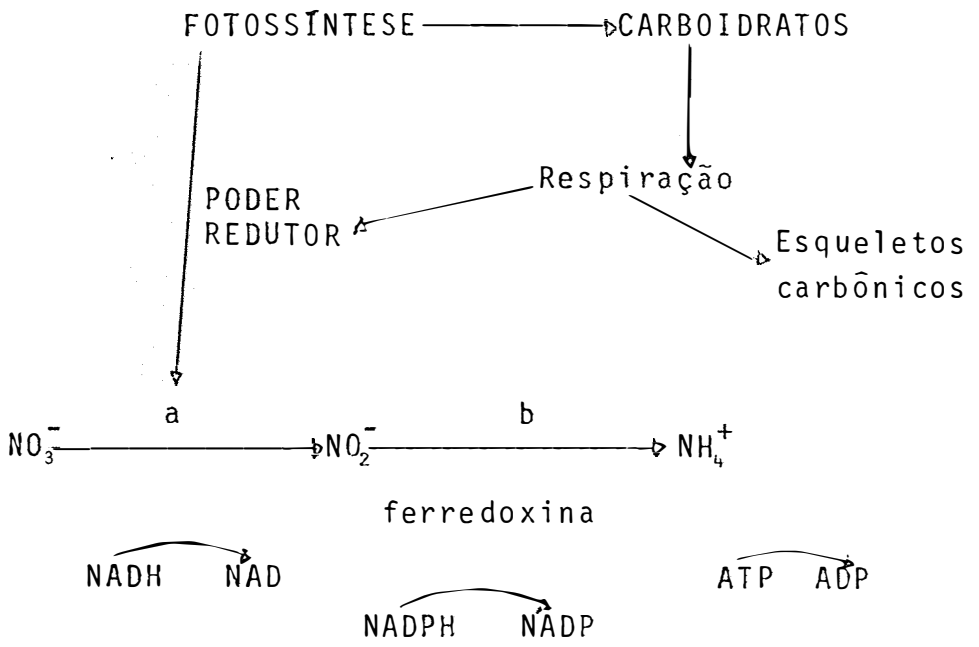
2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Nitrogênio no metabolismo de plantas

A utilização de compostos nitrogenados inorgânicos (ou orgânicos) na síntese de compostos orgânicos como aminoácidos, proteínas, purinas, pirimidinas, entre outros, é uma característica essencial do metabolismo de plantas (DOUGALL, 1980).

O nitrogênio pode ser retirado das fontes mais distintas, como o nitrogênio atmosférico (fixação biológica através de microrganismos simbiontes) ou através da absorção de formas inorgânicas presentes no solo. As formas de nitrogênio mais utilizadas são o nitrato e o amônio. (HAYNES e GOH, 1978). Estes são assimilados através de vias metabólicas distintas.

O nitrato deve ser reduzido a amônio, antes que o nitrogênio seja incorporado a moléculas orgânicas. As reações de redução são catalizadas pelas enzimas nitrato redutase e nitrito redutase (fig. 1), (BEEVERS e HAGEMAN, 1969) envolvendo gasto de energia que é fornecida por doadores de életrons e protons (NADH e NADPH, ferredoxina reduzida) e ATP, supridos pela respiração e fotossíntese.



a) nitrato redutase
b) nitrito redutase

Figura 1 - Assimilação de NO_3^-

Em geral, a atividade de nitrato redutase de organismos é alta na presença de nitrito e baixa, quando o nutriente for amônio. O padrão de atividade de nitrito redutase é semelhante. O efeito antagônico do amônio ou de algum produto do metabolismo de amônio no metabolismo de nitrato é evidente em muitos organismos (GUERRERO *et alii*, 1981). Observou-se, com raras exceções, que a absorção de nitrato de soluções contendo nitrato e amônio ocorre apenas depois que todo o amônio foi absorvido (BAYLEY *et alii*, 1972, MINOTTI *et alii*, 1969, SHEN, 1969, MOHANT e FLETCHER, 1976). A maioria dos autores acredita que, independente da inativação ou repressão da nitrato redutase em estágio mais avançado do processo, a presença de amônio provocaria a inibição na absorção de nitrato do meio (LEA e MIFLIN, 1979 citados por Guerrero, 1981). A absorção de nitrato pode ser um fator importante na regulação da utilização de nitrato, determinando a velocidade do processo mesmo quando os níveis de nitrato redutase não foram afetados. Além disto, sob condições normais, a velocidade de redução do ni-

trato *in vivo* seria função da velocidade de absorção do nitrato, ao invés de estar relacionado à quantidade de nitrato redutase presente no tecido ou célula (CHANTAROTWONG *et alii*, 1976). Em plantas superiores, nas quais a redução de nitrato ocorre predominantemente nas folhas, haveria um controle do processo através da síntese de malato nas folhas que, após translocação, inibiria a absorção de nitrato pelas raízes. (PATE, 1980).

O amônio proveniente da redução de nitrato ou da absorção do meio ambiente, é assimilado pelas plantas por duas vias metabólicas e incorporado a esqueletos carbônicos, formando amidas e aminoácidos. (CROCOMO, 1979).

A aminação redutiva de α-cetoglutarato, catalizada pela enzima glutamato desidrogenase (GDH), (fig. 2) foi por muitos anos considerada a principal via de assimilação de amônio. (LEA e MIFLIN, 1974).

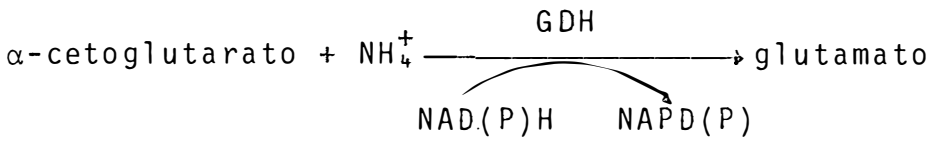


Figura 2 - Via glutamato desidrogenase

Constatou-se, entretanto, que esta via predomina em alguns organismos como Candida utilis (FOLKES e SIMS, 1974) ou em organismos submetidos a meio contendo amônio em excesso. Na maioria dos organismos, inclusive em plantas superiores, o principal mecanismo de assimilação de nitrogênio amoniacal envolve as enzimas glutamina sintetase (GS) e glutamato sintase (GOGAT). O glutamato seria o primeiro aceptor da molécula de nitrogênio. A seguir, a glutamina resultante desta reação perderia o nitrogênio, que seria incorporado à α-cetoglutarato através da catálise enzimática de GOGAT-ferredoxina dependente. Pela ação de transaminases, o nitrogênio seria incorporado à α-cetoácidos, o

riginando aminoácidos (MIFLIN e LEA, 1976).

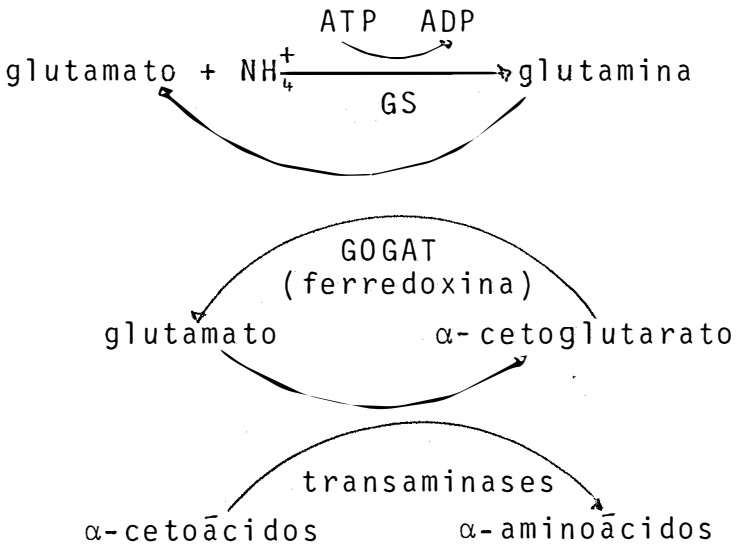


Figura 3 - Via GS/GOGAT (adaptado de LEA e MIFLIN, 1976)

Em Klebsiella aerogenes, a atividade das enzimas GS/GOGAT aumenta na presença de baixos níveis de amônio; ao contrário, a enzima GDH é mais ativa quando o amônio está presente em altas concentrações (MEERS *et alii*, 1970).

Da mesma forma, em plantas superiores, como soja, os níveis de GDH - NAD dependente são maiores na presença de nitrogênio amoniacal do que em meio contendo nitrato, enquanto que o inverso ocorre com GDH - NADP dependente e GS. (WEISSMAN, 1972). O mesmo fenômeno foi observado em raízes de girassol e de arroz (KANAMORI *et alii*, 1972).

Os níveis de GS em células da planta aquática Lemna gibba parecem ser dependentes do nível do pool interno de glutamina. A variação nas atividades de GS e GDH são inversas e as alterações nos níveis da GOGAT são independentes das variações das outras enzimas (RHODES *et alii*, 1976).

A influência dos níveis e da forma de nitrogênio inorgânico no crescimento e diferenciação de células vegetais foi constatada por diversos autores (GAMBORG,1970; WETHERELL e DOUGALL, 1976; GAMBORG e SHYLUK, 1970, HALPERIN e WETHERELL, 1965). Existem grandes diferenças neste aspecto, tanto quanto à forma de nitrogênio inorgânico utilizada como quanto à concentração deste no meio, para células de diferentes culturas. As células de tabaco, cenoura, tomate, soja e trigo apresentam capacidade de crescimento em meio contendo nitrato como única fonte de nitrogênio - (DOUGALL, 1980). Enquanto que células de outras culturas , como cana-de-açúcar (HEINZ *et alii*, 1977), arroz (YATAZAWA e FURUHASHI, 1968), entre outras, não crescem ou crescem muito mal em meio contendo apenas nitrogênio nítrico na composição do meio de cultura.

Em geral, as células vegetais apresentam um crescimento considerado ótimo em meio contendo amônio e nitrato, sendo que a concentração ideal de nitrogênio total varia de cultura para cultura.

GAMBORG (1970), estudando células de soja em cultura líquida, observou que a concentração e as quantidades relativas de amônio e nitrato podem ser fatores críticos para o crescimento e morfogênese destas, concluindo que há uma grande influência do amônio na utilização de nitrato e que isto se reflete na taxa de crescimento celular. Por outro lado, o crescimento de soja em meio contendo apenas amônio é lento, sendo inibitório em concentrações muito altas (GAMBORG e SHYLUK, 1970). BAYLEY *et alii* (1972a , 1972b) demonstraram que as células de soja, em cultura líquida, só utilizam nitrato na presença de amônio (na forma orgânica ou inorgânica). A síntese protéica atingiu níveis máximos nas primeiras horas de incubação e observou-se a síntese de um fator que eliminava o requerimento de nitrogênio reduzido, sugerindo que o amônio poderia ter sido utilizado na síntese de purinas, inclusive de citocininas ,

ativando o crescimento celular.

O efeito do nitrogênio na embriogenese de células de cenouras foi estudada por WETHERELL e DOUGALL(1976). Estes autores observaram que o crescimento das células foi muito pobre em meio contendo diversas concentrações de nitrato de potássio (entre 5mM e 95mM) e um índice de embriogênese muito baixo. A adição de cloreto de amônio ao meio de cultura contendo nitrato aumentou o índice de embriogênese das células de cenoura, sendo que a concentração ideal foi de 10mM de cloreto de amônio e 12 a 40mM de nitrato de potássio.

Diferentes fontes de nitrogênio foram estudadas quanto ao efeito no crescimento de calos de arroz. O crescimento dos calos foi semelhante em meio contendo sais de nitrato (de potássio ou sódio) ou sulfato de amônio. A necrose observada em meio contendo sais de nitrato foi explicada como sendo causada por acúmulo de nitrito em concentrações acima de 50ppm, enquanto que o meio contendo sais de sulfato de amônio apresentou pH muito ácido.O efeito de nitrato de amônio e citrato de amônio no crescimento de calos de arroz foi semelhante e estes foram melhores do que os sais de nitrato e sulfato de amônio (YATASAWA e FURUHASHI, 1968).

Tecidos de cana-de-açúcar tem sido cultivados *in vitro* desde 1960 (NICKELL, 1964). A partir de então, a composição do meio de cultura e variações nutricionais e hormonais que permitissem um bom crescimento da massa celular não diferenciada (calos) e indução de formação de parte aérea e de raízes, vêm sendo estudadas por diversos autores (BARBA e NICKELL, 1969, HEINZ e MEE, 1969 e SCHENK e HILDEBRANDT, 1972). Plântulas de cana-de-açúcar obtidas a partir de explantes de variedades comerciais ou clones,cultivados em meios que apresentavam modificações quanto a níveis e composições hormonais e teores nutricionais, foram descritos em Taiwan (LIU e CHEN, 1974, 1976), Fiji (KRISH-

NAMURTHI e TLASKAL, 1976), Austrália (LARKIN, 1981) e Brasil (CROCOMO *et alii*, 1979).

Em cana-de-açúcar, HEINZ *et alii* (1977) observaram que as células crescem mal em meio contendo amônio e não crescem na presença de nitrato, como única fonte de nitrogênio inorgânico. Este fato também foi constatado por CHEN e LIU (1982), que demonstraram um consumo inicial do amônio presente no meio. O nitrato só começa a ser utilizado gradualmente após 2 dias de incubação e mais de 58% do nitrato presente no meio não foi utilizado até a fase estacionária de crescimento. O pH caiu para 3,8 nos dois primeiros dias e aumentou gradualmente até atingir 5,6 na fase estacionária do ciclo celular.

No meio de WHITE (1963), que contém baixos níveis de nitrogênio inorgânico na forma de NO_3^- (3,2mM de N), suplementado com extrato de leveduras, as células de cana-de-açúcar crescem melhor do que no meio de MURASHIGE e SKOOG (1962) e que contém 60mM de nitrogênio inorgânico nas formas de sais de amônio e nitrato (amônio/nitrato 1:2). No entanto, se as células forem mantidas em meio de WHITE por um tempo muito prolongado, perderão a capacidade de regenerar plântulas. Este fenômeno não é observado em células de cana-de-açúcar cultivadas em meio de MURASHIGE e SKOOG no mesmo período. Células cultivadas por períodos muito longos no meio de WHITE e no meio de MURASHIGE e SKOOG (mais de um ano), perdem totalmente a capacidade de regeneração de plântulas (BARBA e NICKELL, 1969, HEINZ *et alii*, 1977).

O nitrogênio orgânico tem um papel importante no crescimento de células de cana-de-açúcar. Alguns aminoácidos como arginina, ácido aspártico e ácido glutâmico, quando adicionados ao meio de cultura, estimulam o crescimento celular (NICKELL e MARETZKI, 1969, HEINZ *et alii*, 1977).

O efeito da arginina no crescimento de célu-

las de cana-de-açúcar foi estudado em detalhes, pois foi observado um aumento significativo tanto no crescimento das células cultivadas *in vitro* (NICKELL e MARETZKI, 1969), como em plantas intactas (NICKELL e KORTSCHAK, 1964).

GLENN (1981) estudou o efeito da arginina no crescimento e no metabolismo de células de cana-de-açúcar em fase estacionária e em células em divisão. Este autor observou que este aminoácido é importante para células que já atingiram a fase estacionária e que é rapidamente metabolizado em células na fase de divisão celular.

A suplementação do meio de cultura com misturas complexas contendo todos os aminoácidos, como extrato de leveduras, malte e água de côco, tem influência no crescimento, sendo que o extrato de levedura é muito superior ao malte (NICKELL e MARETZKI, 1969) e é equivalente ao meio de MURASHIGE e SKOOG suplementado com 60mg/ℓ de arginina (LIU e CHEN, 1973). Ainda segundo LIU e CHEN (1973), o extrato de leveduras é apenas necessário quando se utiliza meio contendo baixos níveis de nitrogênio inorgânico, como o meio de WHITE.

Os efeitos da concentração total de nitrogênio e da razão NH_4^+/NO_3^- na indução de parte aérea em calos de cana-de-açúcar, foram estudados por LARKIN (1981). Neste experimento, células de cana-de-açúcar em meio de cultura contendo apenas sais de amônio, alta razão amônio/nitrato , ou níveis baixos de nitrogênio inorgânico total (menos de 20mM) apresentaram pequena capacidade para regeneração de parte aérea. Em meio contendo a razão NH_4^+/NO_3^- baixa e níveis de nitrogênio inorgânico total acima de 20mM, observou-se grande número de primórdios foliares.

MALFATTI *et alii* (1983), estudando a diferenciação de raízes e caules em calos de Nicotiana tabacum cv. xanthi, observaram que diferentes aminas foram sintetizadas nos meios que induziam formação de caule (contendo ácido in

dol acético e citocinina) e formação de raiz (contendo ácido indol acético). No meio contendo citocinina, os calos apresentaram apenas 2 aminas: putrescina e fenetilamina. No meio contendo ácido indol acético havia grandes quantidades de asparagina, glutamina, prolina, ácido glutâmico e histidina e uma amina aromática, tiramina. Estes autores demonstraram que o aumento de aminoácidos foi induzido por nutrientes do meio de cultura nos primeiros dias de cultivo e que o acúmulo de aminas foi transitório, havendo diminuição destas após o desenvolvimento dos orgãos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Cultivo de plantas de cana-de-açúcar

Toletes de cana-de-açúcar da variedade comercial IAC 48-65, com 10 meses de idade, foram plantados em vermiculita esterilizada (autoclavada a 120°C, 1 atm por 1 hora) e germinados em sala de crescimento a 28°C, fotoperíodo de 12 horas (lâmpadas Sylvânia GRO-LUX F-20 e lâmpadas incandescentes de 15W). O experimento foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos, Estação Experimental do Planalsucar, Araras, SP, no período entre janeiro e maio de 1982.

3.2. Obtenção de explantes e calos

Plântulas de cana-de-açúcar, com cerca de 15 dias de idade, foram colhidas e lavadas em solução de hipoclorito de sódio comercial (Q-Boa) diluída e enxaguadas por 1 hora em água corrente.

As folhas jovens, enroladas, foram esterilizadas em solução de hipoclorito de sódio comercial a 20% (v/v) sob agitação por 30 minutos. Todas as operações descritas a seguir foram realizadas em ambiente asséptico (fluxo laminar VECO, lâmpada UV-254nm).

Após a esterilização, o material foi enxaguado por 2-3 vezes em água deionizada estéril e uma vez em cisteína 0,1%.

As folhas jovens, enroladas, foram cortadas em pedaços de 1-2cm (explantes) e inoculadas em meio indutor de calo (massa celular não diferenciada). Após um mes em meio indutor de calo (MC), estes foram novamente transferidos para meio fresco, para multiplicação da massa celular necessária para o inóculo.

3.3. Transferência dos calos para meio contendo diferentes níveis de nitrogênio inorgânico

Os calos de cana-de-açúcar obtidos em MC foram transferidos, ao acaso, em pedaços de 0,5-1cm,para meio de cultura contendo diferentes níveis de nitrogênio inorgânico e variação na razão NH_4^+/NO_3^- (ver item 3.4.2).

3.4. Meios de cultura

3.4.1. Meio indutor de calo

A composição do meio indutor de calo (MC) encontra-se na tabela 2 e se baseia no meio de MURASHIGE e SKOOG (1962), modificado (CROCOMO *et alii*, 1979).

3.4.2. Meio contendo diferentes níveis de nitrogênio inorgânico

Ao meio básico, em cuja composição não havia formas nitrogenadas inorgânicas, foram adicionadas diferentes concentrações de nitrato de potássio e nitrato de amônio. Desta forma, prepararam-se 11 meios que apresentavam variação no teor total de nitrogênio inorgânico e na razão NH_4^+/NO_3^- (tabela 3). Para cada tratamento foram feitas três repetições.

3.5. Avaliação qualitativa do crescimento celular

O crescimento e desenvolvimento dos calos nos diferentes meios de cultura foram avaliados semanalmente. Esta

Tabela 2. Meio Indutor de Calo - MC (CROCOMO *et alii*, 1979)

Componente	Concentração
Macronutrientes (mg/ℓ)	
NH_4NO_3	1650
KNO_3	1900
$CaC\ell_2 2H_2O$	440
$MgSO_4 7H_2O$	370
KH_2PO_4	170
Na_2EDTA	37,3
$FeSO_4 4H_2O$	27,8
Micronutrientes (mg/ℓ)	
H_3BO_3	6,2
$MnSO_4 4H_2O$	22,3
$ZnSO_4 4H_2O$	8,6
KI	0,83
$NO_2M_0O_4 2H_2O$	0,25
$CuSO_4 5H_2O$	0,025
$CoC\ell_2 6H_2O$	0,025
Vitaminas (mg/ℓ)	
Tiamina	1,0
Mio-inositol	100,0
Aditivos	
Arginina (mg/ℓ)	60,0
Água de côco (mℓ)	100,00
Hormônio	
ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4)(mg/ℓ)	3,0
sacarose (g/ℓ)	20,0
agar (g/ℓ)	8
pH	5,8

Tabela 3. Razão NH_4^+/NO_3^- e Total de Nitrogênio Inorgânico nos Diferentes Meios de Cultura

Meio [a/] nº	Razão NH_4^+/NO_3^-	Total de nitrogênio inorgânico (mM)
1	1:4,00	100
2	1:3,00	80
3	1:2,75	75
4	1:2,50	70
5	1:2,25	65
6	1:2,00	60
7	1:1,75	55
8	1:1,50	50
9	1:1,25	45
10	1:1	40
11	0	0

a/ A composição básica de todos os meios de cultura é idêntica ao do meio MC.

avaliação consistiu na comparação de cada calo de um determinado tratamento, com padrões de calo que receberam notas de 1 a 5. O cálculo de índice de crescimento (IC) foi feito aplicando-se a seguinte fórmula:

$$IC = \frac{\text{soma das notas dos frascos de um tratamento}}{\text{número de frascos do tratamento}}$$

e obteve-se uma nota média para cada tratamento.

3.6. Determinação de peso fresco e peso seco

Após 30 dias em meio de cultura, determinou-se o peso fresco de grupos de 3 a 5 calos de um mesmo tratamento. Os calos foram liofilizados (liofilizador TRILAB LB 500, vácuo a 10^{-1} thorr, -76 °C) por 40 horas, até peso constante. Após a determinação de peso seco, os calos foram mantidos em dessecador sob vácuo.

3.7. Determinações bioquímicas

3.7.1. Preparação do extrato alcoólico

Os calos foram pulverizados em tubo de poliuretano, após congelamento em nitrogênio líquido, e submetido à extração alcoólica. Amostras de 100mg de material seco foram submetidas à extração com etanol 80% a quente, por 3 vezes. O volume do extrato foi completado a 10mℓ com etanol a 80%.

3.7.2. Preparo do extrato alcalino

O precipitado resultante da extração alcoólica foi submetido à extração com hidróxido de sódio 1N. O volume do extrato foi completado a 10mℓ, em balão volumétrico.

3.7.3. Proteína

3.7.3.a. Soluções

- reativo A:
- solução 1: carbonato de sódio 2% em solução de hidróxido de sódio 0,1*N*
- solução 2: sulfato de cobre 0,5%
- solução 3: tartarato de sódio e potássio 4%

O reativo A deve ser preparado no momento em que for utilizado, na proporção 100:1:1.

- reativo de Folin-ciocalteus 1*N* (Merck)

3.7.3.b. Procedimento

A determinação de proteína foi feita de acordo com LOWRY *et alii* (1951). A 0,5mℓ do extrato alcalino diluído foi adicionado 5,0mℓ de reativo A. A mistura foi incubada por 10 minutos a 25°C; após este tempo, adicionou-se 0,5mℓ de reativo Folin- ciocalteus 1*N*. A leitura foi feita em espectrofotômetro (Beckman) a 660nm, utilizando-se como padrão, albumina de soro bovino.

3.7.4. Nitrogênio solúvel em álcool

3.7.4.a. Soluções

- solução de ninhidrina: 200 mg de ninhidrina foram dissolvidas em 15mℓ de metilcelosolve (etileno monometil eter), 5mℓ de tampão acetato 4M pH5,5 e 0,5mℓ de cianeto de potássio 0,01M.

3.7.4.b. Procedimento

O método utilizado para determinação de nitrogênio solúvel foi descrito por KABAT e MAYER (1967). A alíquotas de 0,2mℓ de extrato alcoólico diluído, adicionou-se 0,4mℓ de solução de ninhidrina. A mistura foi incubada a 85°C

por 5 minutos. Após resfriamento, adicionou-se 2mℓ de etanol 50%. A seguir, foi feita leitura a 570nm em espectrofotômetro contra branco. A densidade ótica obtida foi comparada com curva padrão de nitrogênio, preparada utilizando-se glicina.

3.7.5. Determinação de amônio

3.7.5.a. Soluções

- solução fenólica: 5g de fenol e 25g de nitroprussiato de sódio dissolvidos em 500mℓ de água destilada.
- solução alcalina de hipoclorito de sódio: 4,2mℓ de hipoclorito de sódio comercial (Q-Boa) e 2,5g de hidróxido de sódio em 500mℓ de água destilada.

3.7.5.b. Procedimento

WEATHERBURN (1967) descreveu o método de quantificação de amônio utilizado. A 0,4mℓ de extrato alcoólico foi adicionado 2,5mℓ de solução fenólica. Após agitação, adicionou-se 2,5mℓ de solução alcalina de hipoclorito de sódio. A mistura foi incubada a 37°C por 20 minutos. A absorbância foi medida em espectrofotômetro a 625nm, utilizando-se como padrão, solução de sulfato de amônio.

3.7.6. Determinação de açúcares redutores totais solúveis em álcool

3.7.6.a. Soluções e reagentes

- solução fenólica a 5%
- ácido sulfúrico concentrado

3.7.6.b. Procedimento

A determinação de açúcares redutores totais (DUBOIS *et alii*, 1956) foi feita da seguinte forma: adicio-

nou-se a 0,1mℓ de extrato alcoólico diluído, 0,5mℓ de água destilada. Em seguida, adicionou-se 0,5mℓ de solução fenólica a 5%, com agitação e 2,5mℓ de ácido sulfúrico concentrado. Após incubação à temperatura ambiente por 10 minutos, a mistura foi agitada. A leitura foi feita após 10 minutos, em espectrofotômetro Beckman mod. DB-G a 490nm. Uma solução de glicose foi utilizada para a determinação de curva padrão.

3.7.7. Determinação de açúcares redutores solúveis em álcool

3.7.7.a. Soluções

- reagente de Somogyi
- solução A: 25g de carbonato de sódio anidro, 25g de tartarato de sódio e potássio, 20g de bicarbonato de sódio e 200g de sulfato de sódio foram dissolvidos em 1 litro de água.
- solução B: sulfato de cobre a 15%

O reagente de Somogyi foi preparado no momento de uso, misturando-se 24 volumes da solução A e 1 volume da solução B.

- reagente de Nelson: 25g de molibdato de amônio, 21mℓ de ácido sulfúrico concentrado e 3g de arseniato de sódio ($Na_2A_sO_4 7H_2O$), dissolvido em 500mℓ de água. O reagente foi mantido a 37°C por 24-48 horas, antes de ser usado.

3.7.7.b. Procedimento

O método descrito por NELSON (1944), para determinações de açúcares redutores, foi utilizado. A 0,2mℓ de extrato alcoólico, adicionou-se 0,8mℓ de água destilada. A esta solução adicionou-se 1mℓ de reagente de Somogyi, agitou-se e colocou-se a mistura em banho maria a 85°C por 10 minutos. Os tubos foram esfriados em água corrente e adicionou-se 1mℓ de reagente de Nelson e 4mℓ de água destilada. A leitura foi feita a 530nm, em espectrofotômetro Beckman. Uma solução de glicose foi utilizada como padrão

3.8. Análise estatística

O delineamento estatístico foi inteiramente casualizado, com 3 repetições para cada tratamento.

Foram aplicados, o teste F a níveis de probabilidade 5% e 1% e teste de Tuckey, a 5%, para comparação das médias, ambos com perda de parcelas.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Crescimento e diferenciação de calos de cana-de-açúcar, variedade IAC 48-65

4.1.1. O papel dos reguladores de crescimento

A diferenciação de células vegetais pode ocorrer de duas maneiras: via embriogênese ou via organogênese. MASCARENHAS (1981) define embriogênese como sendo um processo no qual células vegetais, em meio apropriado, sofrem uma sequência de divisões organizadas, dando origem a um grupo de células, formando embriões somáticos. Organogênese, segundo o mesmo autor, é o resultado da interação entre auxinas e citocininas do meio de cultura, levando a um desenvolvimento organizado das células do calo, originando orgãos.

O processo de diferenciação de células de cana-de-açúcar, via organogênese, depende de muitos fatores, tais como a natureza e o genótipo do material doador, a composição do meio de cultura e do número de transferências para novos meios de cultura (LIU e CHEN, 1974).

HEINZ *et alii* (1977) observaram que a variabilidade genética em calos de cana-de-açúcar é alta, e que esta poderia ser devido à variabilidade inerente ao material doador, como aneuploidia, poliploidia e mosaicos cromossômi

cos. Células de cana-de-açúcar cultivadas *in vitro* por seis anos, apresentaram alterações cromossômicas (HEINZ *et alii*, 1969), sendo comum a presença de mosaicos cromossômicos neste tipo de material (KRISNAMURTHI e TLASKAL, 1974).

A variação do número de cromossomos em células vegetais cultivadas *in vitro* pode ser provocada pela ação de substâncias mutagênicas no meio de cultura, como o ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4D). O 2,4D que é utilizado como regulador de crescimento, é uma auxina sintética que impede a formação do fuso mitótico e acredita-se que possa provocar desorganização cromossômica, impedindo o processo de diferenciação (BAYLISS, 1973, DEAMBROGIO e DALE, 1980).

TORREY (1967) avaliou o efeito de 2,4D na constituição cromossômica de células de calo de Pisum sativum L., cultivada por oito anos em meio de cultura complexo, contendo extrato de leveduras. Este autor observou que, após um longo período de cultivo *in vitro*, há uma perda progressiva da capacidade morfogenética destes tecidos e um aumento de anormalidades cromossômicas. A poliploidização observada nos tecidos, segundo o autor, não seria necessariamente a causa de perda de capacidade de organização, pois houve regeneração de raízes tetraplóides. No entanto, níveis altos de ploidia e aneuploidia poderiam provocar alterações genéticas que impediriam o início ou o desenvolvimento do processo morfogenético.

Por outro lado, morfogênese de calos haploides e diploides de Datura inoxia foram induzidos em meio contendo cinetina, após vários pré-cultivos em meio suplementado com 2,4D, demonstrando-se que as diferenças na capacidade de diferenciação entre estes tecidos não foram devido ao nível de ploidia, mas a variações fisiológicas das diferentes linhagens estudadas (FORSHE *et alii*, 1981).

O metabolismo de 2,4D foi estudado em dois sistemas: células de cenoura e células de soja. No primeiro

caso, sabe-se que a remoção de 2,4D do meio, permite a embriogênese de células de cenoura (HALPERIN, 1965), enquanto que as células de soja não se diferenciam, mesmo na ausência de 2,4D. MONTAGUE *et alii*(1981) demonstraram que as células de soja transformam o 2,4D em aminoácidos, enquanto que nas células de cenoura, esta auxina permanece livre, sendo liberada quando as células são transferidas para meio embriogênico (sem 2,4D).

Em meio de MURASHIGE e SKOOG (1962) suplementado com 2,4D, celulas de cana-de-açúcar, em geral, não formam orgãos e, após algumas transferências, perdem a capacidade de regenerar parte aérea (LIU e CHEN, 1974). No meio de WHITE (1943, citado por GAUTHERET, 1955) suplementado com extrato de leveduras e 2,4D, as células de cana-de-açúcar perdem a totipotência em período mais curto (BARBA e NICKELL, 1969).

Se as células de cana-de-açúcar forem transferidas para meio de cultura complexo, contendo ácido naftaleno acético, cinetina e hidrolizado de caseína (meio indutor de planta, tabela 4), pode-se observar em curto período, a formação de primórdios foliares (CROCOMO *et alii*, 1979).

Uma das diferenças entre o meio de WHITE e o meio de MURASHIGE e SKOOG é a concentração e composição do nitrogênio inorgânico (tabela 5). O meio de WHITE favorece o crescimento e o meio de MURASHIGE e SKOOG permite a diferenciação (BARBA e NICKELL, 1969). Assim, o efeito dos nutrientes que compõem o meio de cultura é um dos fatores que interferem no processo de diferenciação de células vegetais, juntamente com efeitos de reguladores de crescimento e do genoma da planta (VASIL e HILDEBRANDT, 1965, REINERT e BACKS, 1968).

4.1.2. O modelo de crescimento observado

A influência da forma química e da razão amô-

Tabela 4. Composição do Meio Indutor de Parte Aérea (CROCOMO *et alii*, 1979)

	Concentração
Sacarose	20g/ℓ
Tiamina	1mg/ℓ
Inositol	100mg/ℓ
Cinetina	1mg/ℓ
NAA	1mg/ℓ
Água de côco	100mℓ/ℓ
Caseína hidrolisada	400mg/ℓ
Agar	8g/ℓ
pH	5,8

Os macronutrientes e micronutrientes são os constantes do meio de MURASHIGE e SKOOG (1962).

Tabela 5. Composição de Macronutrientes e Micronutrientes do Meio de White (citado por GAUTHERET, 1955) e do Meio de Murashige e Skoog Modificado (CROCOMO *et alii*, 1979).

Componentes	Meio de White	Meio de MS
	mg/ℓ	mg/ℓ
$KC\ell$	65	-
KNO_3	80	1900
NH_4NO_3	-	1650
$MgSO_4{}^7H_2O$	720	370
Na_2SO_4	200	-
$NaH_2PO_4H_2O$	165	-
KH_2PO_4	-	170
$Ca(NO_3)_2{}^4H_2O$	300	-
$CaC\ell_2{}^2H_2O$	-	440
Na_2EDTA	-	37,3
$Fe_2(SO_4)_3$	2,5	-
$FeSO_4{}^7H_2O$	-	27,8
$MnSO_4{}^4H_2O$	7	22,3
KI	0,75	0,83
$CuSO_4{}^5H_2O$	0,001	-
M_0O_3	0,0001	-
$ZnSO_4{}^7H_2O$	3	-
H_3BO_3	1,5	6,2
$Na_2M_0O_4{}^2H_2O$	-	0,25
$C_0C\ell_2{}^6H_2O$	-	0,025
$ZnSO_4{}^4H_2O$	-	8,6

nio/nitrato na diferenciação de células de cana-de-açúcar, variedade IAC 48-65, pode ser observada na figura 4. Níveis intermediários de nitrogênio inorgânico total (entre 55mM e 65mM) e relação $NH_4^+:NO_3^-$ entre 1:1,75 e 1:2,25, permitiram a formação de folhas vigorosas e em grande número, mesmo em meio contendo 2,4D, ou seja, meio não formador de orgãos. Em calos crescidos em meio de cultura contendo acima de 70mM de nitrogênio inorgânico e altas concentrações de nitrato com relação aos níveis de amônio, não foram observados primórdios foliares. Excesso de nitrogênio (100mM) provocou crescimento lento e necrose do tecido, abaixo de 50mM de nitrogênio inorgânico e razão amônio/nitrato entre 1:1,50 e 1:1; observou-se apenas pequeno número de primórdios foliares e um desenvolvimento mais lento (ver detalhes no apêndice, figuras I a XI).

Estes resultados estão de acordo com aqueles observados por LARKIN (1981) em calos de cana-de-açúcar e por REINERT *et alii* (1967) e WETHERELL e DOUGALL (1976), em estudos de embriogênese de células de cenoura. Após adição de nitrato ao meio contendo apenas amônio, observou-se que uma suspensão de células de fumo apresentava alteração de cor, passando de amarelo para verde e um crescimento maior. (YOSHIDA e KOHNO, 1982).

Para evitar a interferência de diferentes ions no crescimento e diferenciação dos calos de cana-de-açúcar, utilizou-se, no presente trabalho, apenas duas fontes de amônio e nitrato: nitrato de amônio e nitrato de potássio.

O efeito provocado pelos sais de amônio dos ácidos provenientes do ciclo de Krebs no crescimento de células de soja (GAMBORG e SHYLUK, 1970) e de outros sais como nitrato de sódio, sulfato de potássio, citrato de amônio e outras fontes de nitrogênio orgânico, no crescimento de calos de arroz (YATASAWA e FURUHASHI, 1968), são evidentes. RAGHAVAN e TORREY (1964) mostraram os efeitos de diferentes

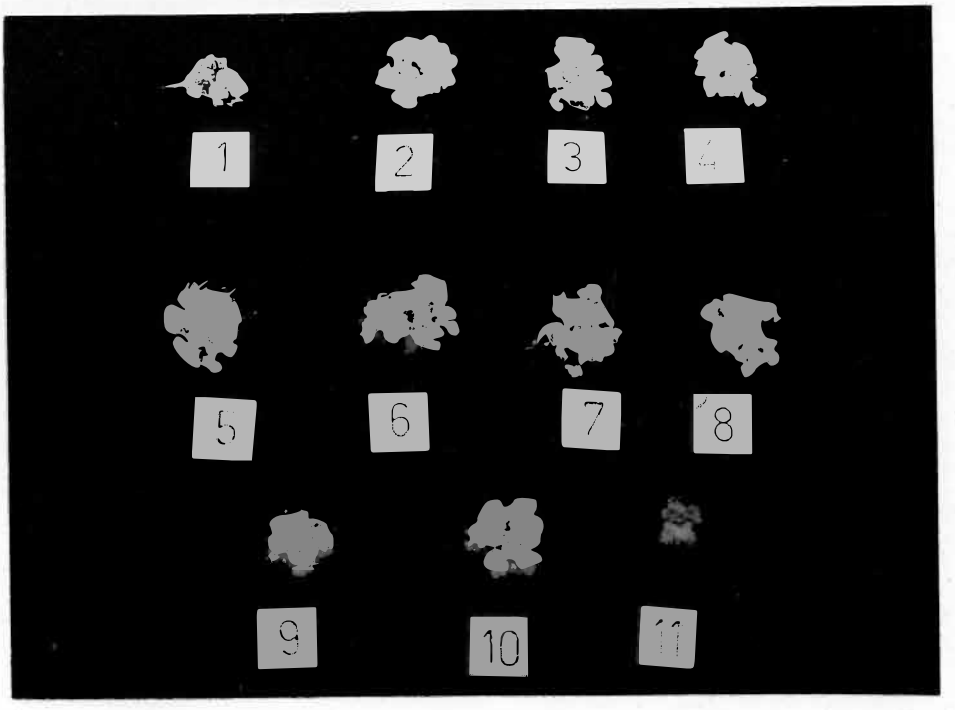


Figura 4. Influência de diferentes concentrações de nitrogênio e da razão amônio/nitrato em células de calos de cana-de-açúcar (var. IAC 48-65)

Legenda: concentração de nitrogênio inorgânico no meio
1- 100mM; 2- 80mM; 3- 75mM; 4- 70mM;
5- 65mM; 6- 60mM; 7- 55mM; 8- 50mM;
9- 45mM; 10- 40mM; 11- controle sem nitrogênio inorgânico.

Ver descrição dos calos no apêndice.

formas de nitrogênio inorgânico no desenvolvimento e crescimento de plântulas de orquideas. O efeito de sais de amônio como sulfato, cloreto, monofostato, acetato e oxalato foi semelhante ao efeito positivo de nitrato de amônio, enquanto que nitrato de potássio, nitrato de sódio, nitrato de cálcio, nitrito de potássio e nitrito de sódio, inibiram o crescimento das plântulas.

O crescimento dos calos pode ser avaliado através do índice de crescimento (IC) (tabela 6). A figura 5 mostra o índice de crescimento médio obtido após avaliações semanais. Observa-se que entre 0mM e 60mM há um aumento do crescimento dos calos. Entre 65 e 100mM, este crescimento diminui.

As células de cana-de-açúcar cresceram rapidamente na primeira semana, como pode ser constatado na figura 5. Após este período, ocorreu uma estabilização do crescimento. As células em meio de cultura, no qual a fonte de nitrogênio inorgânico foi suprimida, e contendo entre 40 e 50mM de N, pararam de crescer após 7 dias. No período subsequente, o índice de crescimento caiu a níveis baixos, indicando que os calos, nestes meios, não acompanharam o crescimento dos calos em meios que continham nitrogênio. O IC dos calos que foram mantidos em meio de cultura contendo entre 55 e 70mM de nitrogênio, aumentaram até a 3a. semana, decrescendo na 4a. semana.

Nos meios contendo entre 75 e 100mM de nitrogênio, observou-se uma estabilização do IC após o 7º dia de cultivo.

O aumento de matéria fresca e matéria seca acompanhou o aumento de nitrogênio no meio, nas concentrações entre 40mM e 60mM, decrescendo gradativamente em concentrações de nitrogênio acima de 60mM. O controle (sem nitrogênio inorgânico) e o tratamento contendo excesso de nitrogênio

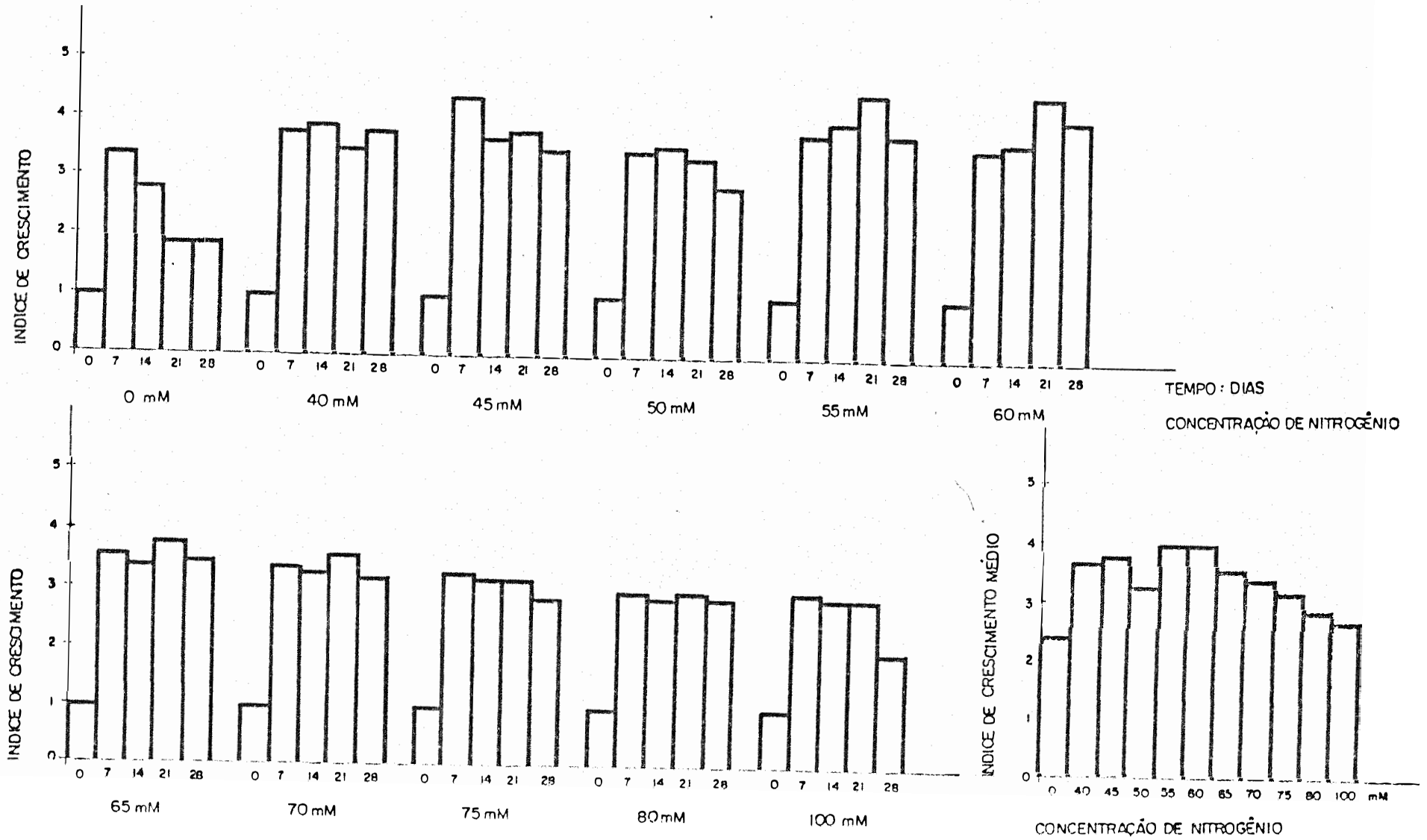


Figura 5. Índice de crescimento (IC) de calos de cana-de-açúcar, var. IAC 48-65, cultivados em meio de cultura contendo diferentes níveis de nitrogênio inorgânico

Tabela 6. Índice de Crescimento (IC) de Calos de Cana-de--açúcar, var. IAC 48-65, Crescidos em Meios de Cultura Contendo Diferentes Níveis de Nitrogênio Inorgânico.

Nº do Meio	Nitrogênio no Meio de Cultura(mM)	Dias de Cultivo 7	14	21	28	Média
11	0	3,35	2,78	1,85	1,88	2,47
10	40	3,75	3,86	3,47	3,78	3,72
9	45	4,44	3,68	3,75	3,50	3,84
8	50	3,50	3,62	3,44	2,94	3,34
7	55	3,78	4,00	4,50	3,78	4,02
6	60	3,56	3,69	4,47	4,09	3,95
5	65	3,62	3,35	3,84	3,50	3,58
4	70	3,35	3,34	3,57	3,20	3,37
3	75	3,32	3,17	3,21	2,92	3,16
2	80	2,97	2,90	3,00	2,85	2,93
1	100	2,97	2,92	2,85	2,06	2,70

(100mM) apresentaram os valores mais baixos de matéria fresca e matéria seca, diferindo estatisticamente do tratamento no qual se obteve matérias fresca e seca mais elevadas - (60mM) (figura 6, tabela 7).

O teor de umidade expresso como matéria seca/ matéria fresca x 100, não variou significativamente durante o processo de secagem. Entretanto, o gráfico representativo do fenômeno apresenta dois picos, os quais se referem a células crescidas em meio sem nitrogênio e células crescidas em meio contendo 60mM de nitrogênio. Nestes tratamentos houve um pequeno aumento de matéria seca com relação à matéria fresca (figura 6, tabela 7).

O meio de MURASHIGE e SKOOG (1962) contendo 60mM de nitrogênio (NH_4^+/NO_3^-.1:2) permitiu um crescimento - maior das células de cana-de-açúcar. A importância da razão amônio/nitrato está evidente, uma vez que pequenas variações nos níveis de nitrato , com relação aos níveis de amônio, comprometeram o crescimento celular e a organogênese destas células.

CALDAS e CALDAS (1976) confirmam a influência da razão NH_4^+/NO_3^- na matéria fresca e no teor de proteínas de calos de rosa de Paul Scarlet (Paul's Scarlet Rose). Experimentos realizados com outras fontes de nitrogênio reduzido, suplementando nitrato de potássio, mostraram que, apesar de algumas formas químicas proporcionarem um bom crescimento e embriogênese de células de cenoura, estas não superaram o cloreto amônio (WETHERELL e DOUGALL, 1976). GONÇALVES (1975) observou que diferentes concentrações e razões NH_4^+/NO_3^-, na forma de $NH_4C\ell$ e $NaNO_3$, no crescimento de calos de *Eucalyptus grandis* provocaram um aumento na matéria fresca. Neste experimento, não ocorreu morfogênese, provavelmente devido à presença de sódio (entre 6,5mM e 50mM de $NaNO_3$) que, nesta concentração, inibiu a embriogênese de células de cenoura . (WETHERELL e DOUGALL, 1976).

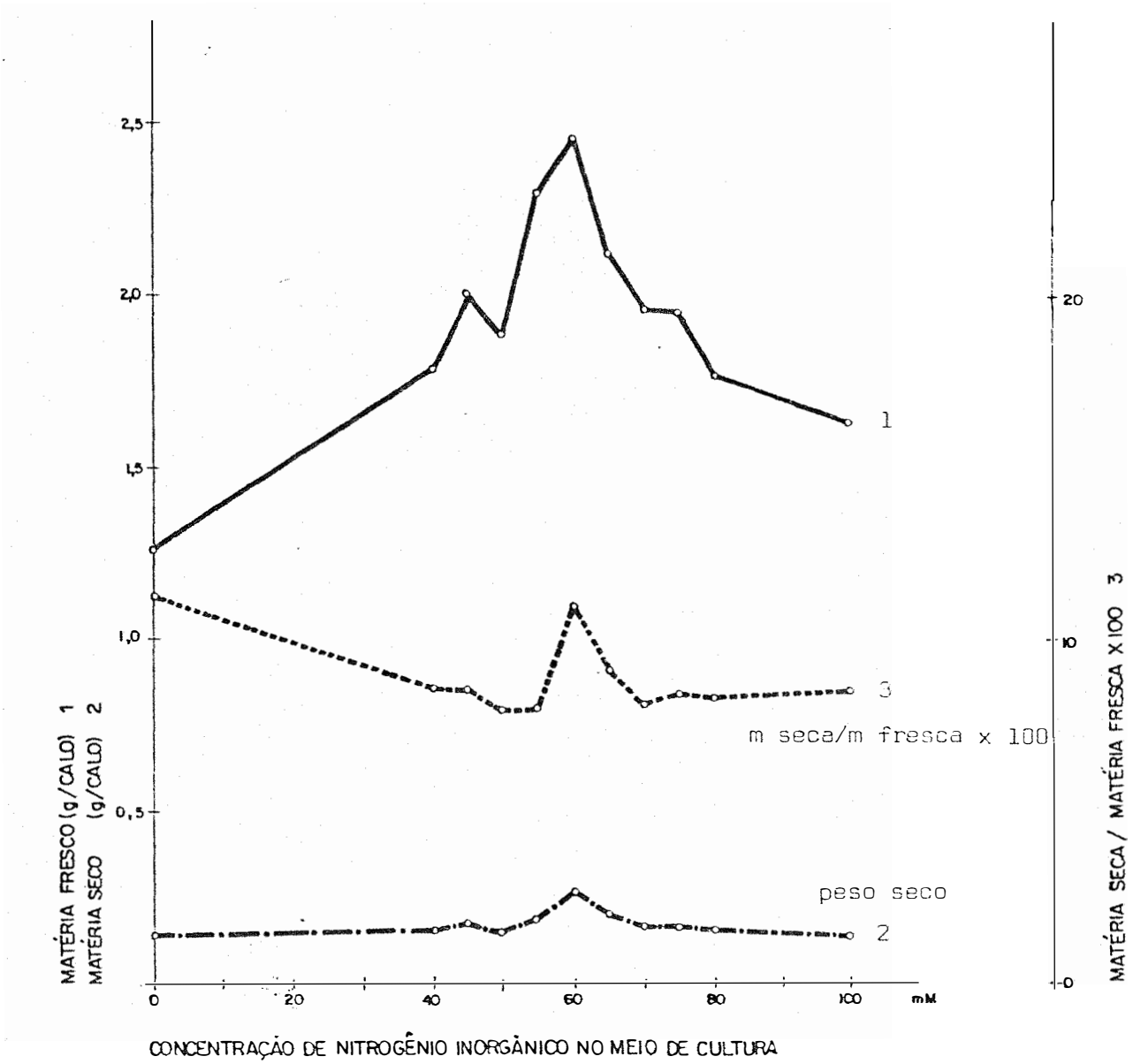


Figura 6. Matéria fresca, matéria seca e matéria seca/matéria fresca x 100 de calos de cana-de-açúcar, var. IAC 48-65, cultivados em meio de cultura contendo concentrações crescentes de nitrogênio inorgânico

Tabela 7. Influência de Diferentes Concentrações de Nitrogênio Inorgânico sobre Peso Fresco e Peso Seco de Calos de Cana-de-açúcar - Variedade IAC 48-65.

Concentração de Nitrogênio (mM)	Relação NH_4^+/NO_3^-	Peso Fresco (g/calo)	Peso Seco (g/calo)	$\frac{\text{Peso Seco}}{\text{Peso Fresco}} \times 100$
0	controle	1,2608[ab]	0,1405[a]	11,14
40*	1:1	1,7781	0,1512[a]	8,50
45*	1:1,25	2,0084	0,1712	8,53
50	1:1,5	1,8877	0,1469[a]	7,85
55	1:1,75	2,2892[b]	0,1826	8,04
60*	1:2,00	2,4467[a]	0,2590[a]	10,84
65	1:2,25	2,1149	0,1911	9,00
70	1:2,50	1,9469	0,1569[a]	8,07
75	1:2,75	1,9472	0,1632[a]	8,40
80	1:3,00	1,7604	0,1457[a]	8,34
100	1:4,00	1,6258	0,1331[a]	8,49
*médias incompletas				
F=		0,27671165**	0,00282656*	3,2589
CV=		14,82%	17,50%	17,81%
Teste de Tuckey a 5%				
Δ_1		1,0226	0,0855	4,64
Δ_2		0,8349	0,1047	5,69
Δ_3		0,9335	0,0956	5,19

** Teste F significativo a nível de 1%

* Teste F significativo a nível de 5%

Δ_1 Diferença mínima significativa entre 2 médias completas

Δ_2 Diferença mínima significativa entre 2 médias incompletas.

Δ_3 Diferença mínima significativa entre 1 média incompleta e 1 média completa.

VELICKY e ROSE (1973) mostraram a importância da razão amônio/nitrato e a consequente variação do pH do meio, resultante do equilíbrio entre os ions que ficam no meio durante o crescimento de células de Ipomoea. O efeito do pH do meio contendo amônio e nitrato, em células de cana-de-açúcar em suspensão, também foi estudado por LIU e CHEN (1982), que afirmam que uma alteração brusca do pH do meio ocorre quando amônio (diminuição do pH) ou nitrato (elevação do pH) são utilizados como única fonte de nitrogênio, sugerindo que este fator poderia afetar o crescimento celular.

MARTIN *et alii* (1977) afirmam que o efeito do equilíbrio entre a razão amônio/nitrato poderia ser, em parte, a manutenção do pH dentro dos limites fisiológicos. Em meio contendo apenas amônio, células de Ipomoea mantiveram o crescimento quando o excesso de acidez foi neutralizado continuamente (pH-stat).

Neste experimento, cultivando células em meio semi-sólido (agar), não havia condições que permitissem o controle do pH. Presume-se, portanto, que condições ideais para o crescimento e diferenciação dos calos, em termos de pH, foram obtidas através do equilíbrio da razão amônio/nitrato.

ROSE e MARTIN (1975) observaram que células de Ipomoea, crescidas em meio líquido, contendo amônio e nitrato, sem controle de pH, não sofriam um aumento na matéria seca a não ser que se adicionasse sacarose ao meio.

4.2. Alguns aspectos do metabolismo de células de cana-de-açúcar

4.2.1. Influência de diferentes níveis de nitrogênio inorgânico e variações na razão amônio/nitrato no metabolismo do nitrogênio

Os níveis de proteína insolúvel em calos de

cana-de-açúcar crescidos em meios de cultura contendo variação na razão amônio/nitrato e de nitrogênio inorgânico, foram elevados (tabela 8).

A influência de concentrações crescentes de nitrato e de níveis de amônio constantes na diferenciação de células de cana-de-açúcar, não pode ser correlacionada com diferenças na concentração de proteína. As variações observadas nos teores protéicos de células de cana-de-açúcar em diferentes estágios do processo de diferenciação celular (figura 7) não foram estatisticamente significativos.

Estes resultados não estão de acordo com aqueles descritos na literatura.

Células de calo de Paul's Scarlet Rose apresentaram variação nos teores protéicos, quando diferentes níveis de amônio e nitrato estavam presentes no meio (CALDAS e CALDAS, 1976). WEISSMAN (1964) observou que plantas nutridas simultaneamente com amônio e nitrato, apresentam maiores níveis de proteína na parte aérea do que plantas nutridas com apenas uma das duas formas.

GLENN (1981), estudando o efeito da arginina no crescimento de células de cana-de-açúcar em meio líquido, mostrou que há uma queda nos teores de proteína celular após 2 semanas de cultivo, independente da presença ou não de arginina no meio. THOM *et alii* (1981) mostraram que os níveis protéicos em células de cana-de-açúcar cultivadas em meio líquido apresentam-se altos após 3 dias de incubação ... (7,3mg/100mg de matéria seca). Estas células utilizaram inicialmente, os aminoácidos presentes no meio. No trabalho citado anteriormente, GLENN (1981) afirma que as células de cana-de-açúcar utilizam arginina exógena quando são transferidas de um meio de cultura esgotado para um novo meio de cultura. Na ausência de arginina, ocorre uma fase lag mais acentuada e, consequentemente, um crescimento mais lento.

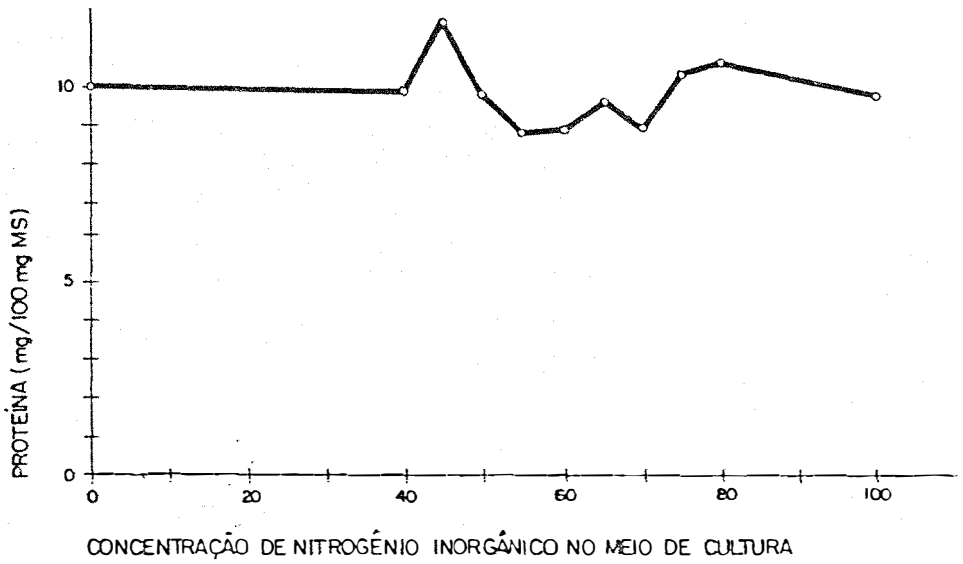


Figura 7. Teores de proteína em calos de cana-de-açúcar, var. IAC 48-65, cultivados em meio de cultura contendo diferentes níveis de nitrogênio inorgânico

Tabela 8. Influência de Diferentes Concentrações de Nitrogênio Inorgânico sobre o Teor de Proteínas em Calos de Cana-de-açúcar, variedade IAC 48-65.

Concentração de nitrogênio (mM)	Razão NH_4^+/NO_3^-	Proteína (mg/100mg m.s.)
0	controle	10,0361
40*	1:1	9,8576
45*	1:1,25	11,5719
50	1:1,5	9,7861
55	1:1,75	8,9289
60*	1:2,0	8,7861
65	1:2,25	9,6432
70	1:2,5	9,0037
75	1:2,75	10,2861
80	1:3	10,6433
100	1:4	9,5361

F= 0,54814003** CV= 17,34%

Δ_1 5,04270694

Δ_2 6,17602946

Δ_3 5,63791775

** teste F significativo a nível de 1%

* médias incompletas

Δ= ver legenda tabela 7

O nível protéico de células de soja e de trigo cultivadas em meio líquido, também sofreu um incremento nas primeiras horas de incubação. Ao atingirem a fase estacionária, estas células apresentaram uma queda de 50% no teor de proteína (BAYLEY *et alii*, 1972b). VELIKY e ROSE (1973) mostraram que células Ipomoea sp. crescidas em fermentadores, apresentam uma fase de metabolismo do nitrogênio intensa (síntese protéica e divisão celular) e outra fase, na qual ocorre um aumento no metabolismo de carboidratos (maturação), sugerindo que estas fases poderiam ser influenciadas independentemente, variando-se os nutrientes do meio.

O metabolismo do nitrogênio tem um papel importante na diferenciação de calos de fumo. Células de calo de fumo , em condições ideais para formação de parte aérea, apresentaram, nos primeiros 20 dias de incubação, níveis mais elevados de nitrogênio total, nitrogênio protéico e nitrogênio nítrico, e níveis semelhantes de nitrogênio amínico, quando comparadas a calo da mesma linhagem, em condições que não permitiam o início do processo de diferenciação (HARDY e THORPE, 1981).

Segundo THORPE (1972), os eventos bioquímicos que determinam a diferenciação ocorreriam muito antes do fenômeno ser detetado na forma de embriões ou primórdios foliares.

Calos em diferentes estágios de desenvolvimento organogenético foram observados, em meios de cultura contendo diferentes razões amônio/nitrato. O início do processo organogenético caracteriza-se pela observação de pequenos pontos diferenciados pela coloração verde ou avermelhada.Este processo teve início 12 dias após a inoculação das células e foi bem definido nos meios de cultura em que a razão amônio/nitrato estava próxima a 1:2. As células foram colhidas 28 dias após a inoculação e como mostram os histogramas de índice de crescimento (figura 5), já se encontravam na fase estacionária. É provável que a maioria dos nutrientes do meio de cultura já estivessem esgotados.

Este fato poderia explicar os níveis semelhantes de proteína insolúvel nos calos crescidos na presença de níveis crescentes de nitrogênio inorgânico, independente do estágio de desenvolvimento e/ou diferenciação, no qual os calos se encontravam quando foram retirados do meio de cultura.

Um estudo dinâmico, durante os primeiros dias de incubação de células, poderia mostrar diferenças na absorção e incorporação de nitrogênio amínico e nítrico, e sua influência no processo de diferenciação de células de cana-de-açúcar.

Segundo BROWN e THORPE (1982), as alterações bioquímicas ocorridas durante a diferenciação, dar-se-iam em apenas alguns grupos de células do calo e, por este motivo, seria muito difícil detetar variações no calo como um todo. HICKS (1980) sugere que sejam utilizadas técnicas mais sofisticadas, como o cultivo de células em camadas.

Por outro lado, a constância nos níveis de proteína celular nos calos de cana-de-açúcar, mesmo quando em avançado processo de diferenciação, poderia ser devido a um mecanismo de controle que impediria a síntese de compostos protéicos em excesso, mesmo quando grandes quantidades de compostos básicos são fornecidas.

O nível protéico de plantas intactas não apresentou alterações quando estas foram nutridas com adubos nitrogenados, enquanto que pode ser observado um aumento nos teores de nitrogênio solúvel (MENGEL e KIRBY, 1978 p.315). Em plantas de cevada, RICHTER e DIJKSHOOKN (1975) também constataram um aumento de nitrogênio solúvel, enquanto que os níveis protéicos não sofreram variação. Em plântulas de cana-de-açúcar, cultivadas em nitrato, uréia ou amônio, não ocorreram alterações nos níveis protéicos de parte aérea. Os teores de nitrogênio total, nitrogênio solúvel em álcool e de amônio livre, apresentaram-se maiores em plântulas culti

vadas em uréia e amônio (OCHOA-ALEJO e CROCOMO, 1981).

As variações nos níveis de nitrogênio solúvel e de amônio livre, em calos de cana-de-açúcar cultivados em meios de cultura contendo concentrações crescentes de nitrogênio inorgânico, podem ser analisadas na figura 8.

Em células de cana-de-açúcar cultivadas em meio que não continha nitrogênio inorgânico, os teores de nitrogênio solúvel (aminoácidos, aminas e amidas) e de amônio livre foram baixos e diferiram significativamente de todos os tratamentos. (tabelas 9 e 10).

O aumento de nitrogênio inorgânico no meio de cultura implicou em um incremento na concentração celular de nitrogênio solúvel. Entre 40 e 60mM de nitrogênio inorgânico, foram observadas pequenas variações entre os níveis de nitrogênio solúvel, não significativas a 5%, pelo teste de Tuckey. A partir de 65mM de nitrogênio inorgânico, há um aumento maior nos níveis de nitrogênio solúvel. As células de cana-de-açúcar cultivadas em meio contendo 70 e 80mM de nitrogênio inorgânico, apresentaram os níveis de nitrogênio solúvel mais altos, estatisticamente diferentes dos níveis de nitrogênio solúvel encontrados em células cultivadas em 45mM de nitrogênio inorgânico. Concentrações altas de nitrogênio inorgânico no meio de cultura (100mM) provocaram uma queda nos níveis de nitrogênio solúvel.

Os níveis de amônio livre nas células de cana-de-açúcar cultivadas em meio contendo concentrações crescentes de nitrogênio inorgânico, não diferiram entre si.(tabela 10).

Com o aumento de nitrogênio inorgânico no meio de cultura, observou-se um aumento gradativo nos níveis de nitrogênio solúvel até a concentração total de nitrogênio inorgânico de 80mM. A variação nos níveis de amô-

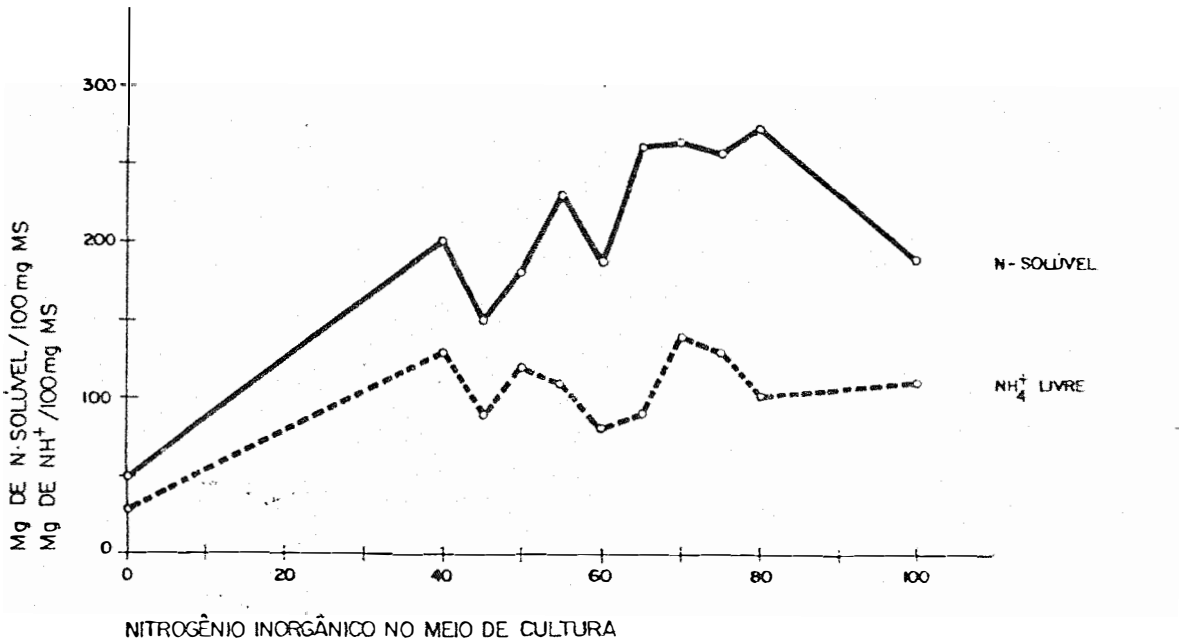


Figura 8. Variação nos níveis de nitrogênio solúvel e amônio livre em calos de cana-de-açucar, var. IAC 48-65, cultivados em meio de cultura contendo diferentes níveis de nitrogênio inorgânico

Tabela 9. Influência de Diferentes Concentrações de Nitrogênio Inorgânico sobre os Teores de Nitrogênio Solúvel em Calos de Cana-de-açúcar, variedade IAC 48-65.

Concentração de nitrogênio (mM)	Razão NH_4^+/NO_3^-	Nitrogênio Solúvel µg/100mg m.s.
0	controle	48,5740[a]
40*	1:1	200,5348
45*	1:1,25	149,7326[b]
50	1:1,5	181,8182
55	1:1,75	231,7290
60*	1:2,0	188,5027
65	1:2,25	262,9231
70	1:2,5	265,5972[b]
75	1:2,75	259,3583
80	1:3	274,5098[b]
100	1:4	190,7304

teste F = 10,97283296** CV= 16,71%

Teste de Tuckey a nível de 5%

Δ_1 101,6280

Δ_2 124,4683

Δ_3 113,6235

** teste F significativo a nível de 1%

* médias incompletas

Δ ver legenda na Tabela 7

Tabela 10. Influência de Diferentes Concentrações de Nitrogênio Inorgânico nos Teores de Amônio Livre em Calos de Cana-de-açúcar, variedade IAC 48-65.

Concentração de nitrogênio (mM)	Razão NH_4^+/NO_3^-	Amônio µg/100mg m.s.
0*	controle	26,9545[a]
40*	1:1	129,3814[a]
45*	1:1,25	92,7233[a]
50	1:1,5	120,7577[a]
55	1:1,75	109,2549[a]
60*	1:2	80,8634
65	1:2,25	89,8481[a]
70	1:2,5	141,6007[a]
75	1:2,75	132,2565[a]
80	1:3	102,0674[a]
100*	1:4	108,8960[a]

teste F= 5,2954** CV= 20,03%

teste de Tuckey a nível de 5%

Δ_1 76,1197

Δ_2 62,1511

Δ_3 69,4872

** teste F significativo a nível de 1%

* médias incompletas

Δ ver legenda na tabela 7

nio livre, nos diferentes tratamentos contendo nitrogênio, não foi significativa (teste de Tuckey a 5%). Estas observações podem indicar um mecanismo de controle da síntese de proteínas, no qual o excesso de nitrogênio presente no meio seria acumulado na forma de amidas, aminas e aminoácidos. Os níveis de amônio livre foram mantidos na faixa de ... 100 µg/mg de matéria seca, pois estes sais, na forma livre, são extremamente tóxicos à planta e portanto, são imediatamente incorporados a esqueletos carbônicos (LAWYER *et alii*, 1981).

No meio contendo 100mM de nitrogênio inorgânico total, o nível celular de nitrogênio solúvel caiu bruscamente. Este fato pode ter sido provocado pela excreção de ions nitrito para o meio de cultura, como ocorre com células de Ipomoea sp. cultivadas em condições limitantes de fonte de nitrogênio reduzido e na presença de nitrato (ZINK e VELIKY, 1977). Neste mesmo sistema celular, constatou-se que há um acúmulo de compostos nitrogenados no citoplasma, quando há um suprimento de nitrogênio amoniacal, em níveis adequados. Se o amônio tornar-se limitante, ocorre uma alteração no metabolismo e predomínio de síntese de compostos não nitrogenados, mesmo quando ions nítricos estão sendo fornecidos. (ROSE e MARTIN, 1975).

4.2.2. Influência de níveis de nitrogênio no metabolismo de carboidratos em calos de cana-de-açúcar

O nitrogênio assimilado pela planta, na forma de ions de amônio, é incorporado a esqueletos carbônicos provenientes da glicólise e do ciclo de Krebs (CROCOMO, 1979).

Na ausência de fontes de nitrogênio, ocorre acúmulo de carboidratos, que não são utilizados na síntese de aminoácidos (EPSTEIN, 1972 p.245).

Em células de calo de cana-de-açúcar cultiva-

das em meio de cultura sem nitrogênio inorgânico, os teores de açúcares solúveis e açúcares redutores totais foram significativamente diferentes dos níveis encontrados em células cultivadas em meio de cultura contendo nitrogênio inorgânico (tabelas 11 e 12).

Os níveis de açúcares solúveis atingiram valores baixos e permaneceram constantes, nas células de calos de cana-de-açúcar cultivados em meio de cultura contendo entre 40 e 80mM de nitrogênio inorgânico e aumentaram na presença de 100mM de nitrogênio, significativamente (figura 9).

As variações na concentração de açúcares solúveis totais não diferiram estatisticamente nos diferentes tratamentos contendo nitrogênio inorgânico (figura 9).

Estes baixos níveis de açúcares solúveis e açúcares redutores totais provavelmente indicam a utilização de esqueletos de carbono na síntese de compostos aminados . Este fato está de acordo com a afirmação de THOM *et alii*, (1982) de que o suprimento de açúcares do meio de cultura líquido utilizado no cultivo de células de cana-de-açúcar , permanece elevado durante todo o período de incubação. Estes autores observaram grandes aumentos de aminoácidos solúveis nos primeiros três dias. Por outro lado, a síntese de componentes estruturais da célula tem maior intensidade nos estágios finais do desenvolvimento celular (ROSE e MARTIN, 1974).

A importância do amido, açúcares de reserva e de açúcares livres na organogênese, está provavelmente ligada ao fornecimento de uma fonte de energia imediata. Tecidos em processo de diferenciação apresentam alta taxa respiratória, atividade intensa de enzimas de vias de oxidação de carboidratos e catabolismo de glicose C^{14} e variação na relação $NADPH/NADP^{+}$ (BROWN e THORPE, 1980). Um dos indícios de alta taxa respiratória seria a quebra de sacarose, para fornecer a demanda de açúcares em células em processo de diferenciação (NASH e DAVIES, 1972).

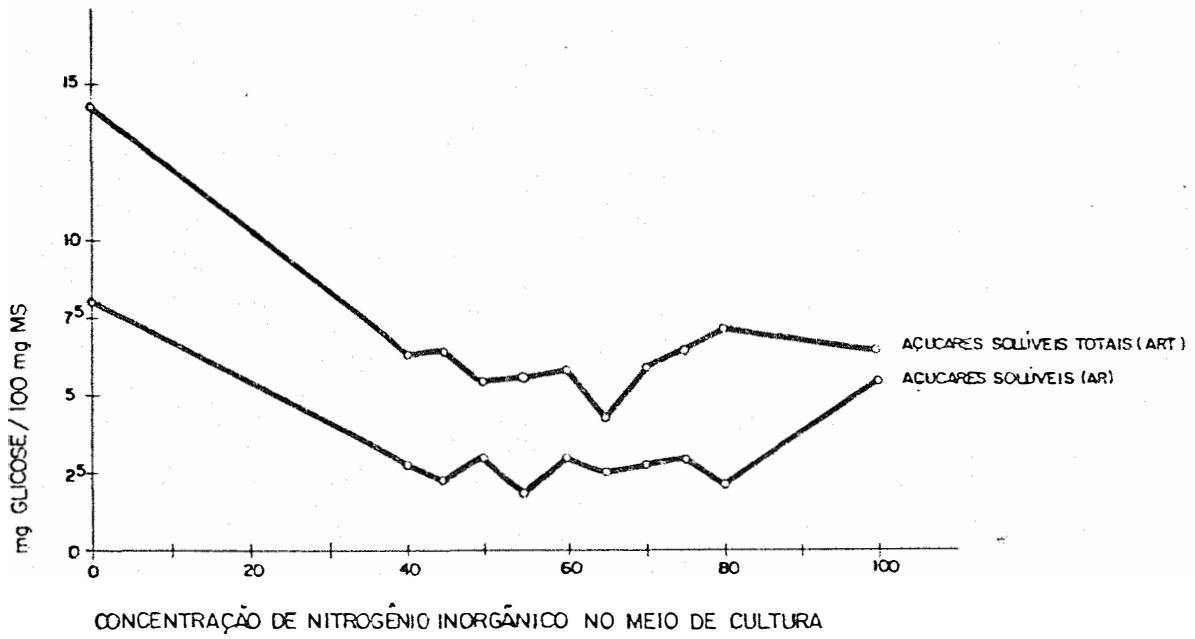


Figura 9. Influência de diferentes concentrações de nitrogênio inorgânico nos teores de açúcares solúveis (AR) e açúcares solúveis totais (ART)

Tabela 11. Influência de Diferentes Concentrações de Nitrogênio Inorgânico sobre o Teor de Açúcares Redutores em Calos de Cana-de-açúcar, variedade IAC 48-65.

Concentrações de nitrogênio (mM)	Razão NH_4^+/NO_3^-	Açúcares Redutores mg de glicose/100mg m.s.
0*	controle	8,1902[b]
40*	1:1	2,8391
45*	1:1,25	2,2713
50	1:1,5	2,9251
55	1:1,75	1,7895
60*	1:2	2,9423
65	1:2,25	2,4433
70	1:2,5	2,5465
75	1:2,75	2,9394
80	1:3	1,9959
100*	1:4	5,4028[a]

teste F= 22,5757** CV= 10,03%

teste de Tuckey a nível de 5%

Δ_1 1,7468

Δ_2 2,1398

Δ_3 1,9530

** teste significativo a nível de 1%

* médias incompletas

Δ ver legenda da tabela 7

Tabela 12. Influência de Diferentes Concentrações de Nitrogênio Inorgânico nos Teores de Açúcares Redutores Totais em Calos de Cana-de-açúcar, variedade IAC 48-65

Concentração de nitrogênio (mM)	Razão NH_4^+/NO_3^-	Açúcares redutores totais mg glicose/100mg m.s.
0	controle	14,3702[a]
40*	1:1	6,4876
45*	1:1,25	6,6131
50	1:1,5	5,3853
55	1:1,75	5,6923
60*	1:2	5,8180
65	1:2,25	4,1576
70	1:2,5	5,8332
75	1:2,75	6,3899
80	1:3	7,0874
100	1:4	6,2504

teste F= 10,7600** CV= 20,70%

teste de Tuckey a nível de 5%

Δ_1 4,1379

Δ_2 5,0678

Δ_3 4,6263

** teste F significativo a nível de 1%

* médias incompletas

Δ ver legenda da tabela 7

Na figura 9, pode-se constatar que os níveis de açúcares solúveis totais são mais altos nas células nas quais o processo de diferenciação celular não ocorreu ... (100mM - 70mM de N inorgânico).

Em calos onde o processo organogenético estava em desenvolvimento, ocorreu uma queda nos níveis de açúcares redutores totais e açúcares livres. Estas observações estão de acordo com observações de outros autores (THORPE e MEIER, 1972).

A presença de grandes concentrações de açúcares solúveis nos calos cultivados em meio de cultura contendo 100mM de nitrogênio inorgânico, pode ser atribuída à toxidez de ions nitrito, provavelmente em excesso, em decorrência da alta concentração de nitrato no meio de cultura ... (80mM).

Segundo THOM *et alii*(1982), células em fase de maturação apresentam cerca de 20% de sacarose armazenada.

Dos dados da figura 6, pode-se inferir que a diferença entre os valores de ART (açúcares redutores totais) e AR (açúcares redutores) represente os teores de sacarose nas células de cana de açúcar. Esses valores estariam bem abaixo dos valores de sacarose, observados por THOM *et alii* (1982) indicando provavelmente, a utilização de açúcares na obtenção de energia na forma de $NADP^+$/NADPH necessária para o processo de diferenciação.

5. CONCLUSÕES

O presente trabalho permitiu as seguintes conclusões:

- a variação do nível de nitrogênio inorgânico total e da razão amônio/nitrato tem influência no processo organogenético de células de calo de cana-de-açúcar, variedade IAC 48-65;

- os calos de cana-de-açúcar cultivados em meio de cultura contendo 60mM de nitrogênio inorgânico ... (20mM NH_4^+/40mM NO_3^-) apresentaram maior peso fresco;

- a capacidade de diferenciação celular em calos de cana-de-açúcar pode ser observada em meios de cultura contendo entre 50mM e 65mM de nitrogênio inorgânico total e razão amônio/nitrato próxima de 1:2;

- os calos em processo de diferenciação não diferiram de calos em processo de crescimento, quanto à matéria seca, matéria fresca/materia seca x 100 e níveis de proteína celular;

- um aumento nos níveis de nitrogênio solúvel celular foi observado com o aumento de nitrogênio inorgânico no meio. A concentração celular de amônio livre não apresentou diferenças estatísticas nos diferentes tratamentos;

- aparentemente, as alterações no metabolismo de nitrogênio, na fase estacionária, na qual as células de cana-de-açúcar foram colhidas, não estão correlacionadas, de forma direta, com o processo de organogênese;

- os açúcares solúveis totais e açúcares livres apresentam concentrações celulares semelhantes nos tratamentos nos quais as concentrações de nitrogênio inorgânico do meio é intermediária;

- as altas concentrações de nitrogênio inorgânico (entre 70 e 80mM) determinaram aumento dos níveis celulares de açúcares solúveis totais, os quais, entretanto, não diferem dos tratamentos com nitrogênio inorgânico mais baixos, e

- os teores de açúcares solúveis livres de células cultivadas em meio sem nitrogênio inorgânico ou com excesso de nitrogênio inorgânico (100mM), foram significativamente mais elevados do que aqueles encontrados nas células que receberam um suprimento adequado de nitrogênio (entre 40 e 80mM).

6. LITERATURA CITADA

BARBA, R. e L. G. NICKELL, 1969. Nutrition and organ differentiation in tissue cultures of sugarcane, a monocotyledon. Planta 89: 299-302.

BARTON, K.A. e W.J. BRILL, 1983. Prospects in Plant Genetic Engeneering. Science 219: 671-676.

BAYLEY, J.M.; J.KING e O.L. GAMBORG, 1972a. The effect of the source of inorganic nitrogen on growth and enzymes of nitrogen assimilation in soybean and wheat cells in suspension cultures. Planta 105: 15-24.

BAYLEY, J.M; J. KING e O.L. GAMBORG, 1972b. The ability of amino compounds and conditioned medium to aliviate the reduced nitrogen requirement of soybean cells grown in suspension cultures. Planta 105: 25.32.

BAYLISS, M.W, 1973. Origin of chromosome number variation in cultured plant cells. Nature 246: 529-530.

BEEVERS, L. e R.H. HAGEMAN, 1969. Nitrate reduction in higher plants. Annual Review Plant Physiology 20: 495-522.

BRAUN, A.C., 1959. A demonstration of the recovery of the

crown gall tumor cell with the use of complex tumor of single cell origin. Proceedings of National Academy of Science USA 45: 932-938.

BROWN, D.C.W e T.A. THORPE, 1980. Adenosine phosphate and nicotineamide adenine dinucleotide pool size during shoot initiation in tobacco callus. Plant Physiology 65: 587-590.

BROWN, D.C.W. e T.A. THORPE, 1982. Mitochondrial activity during shoot formation and growth in tobacco callus. Phisiologia Plantarum 54: 125-130.

CALDAS, R.A. e L.S. CALDAS, 1976. Nitrate, ammonium and kinetin effects on growth and enzyme activities of Paul's Scarlet Rose callus. Physiologia Plantarum 37: 111-116.

CHALEFF, R.S., 1983. Isolation of agronomically useful mutants from plant cell cultures. Science 219: 676-682.

CHANTAROTWONG, W; R.C. HUFFAKER, B.L. MILLER e R.C. GRANSTEDT, 1976. In vivo nitrate reduction in relation to nitrate uptake, nitrate content and in vivo nitrate reductase activity in intact barley seedlings. Plant Physiology 57: 519-522.

CHEN, W.H. e M.C. LIU, 1982. Utilization of sugar and nitrogen by sugarcane cells in suspension cultures. Taiwan Sugar 29:93-98.

CROCOMO, O.J., 1979. Assimilação do nitrogênio pelas plantas. In: Guimarães Ferri, M. Coord. Fisiologia Vegetal São Paulo, EPU Ed. da Universidade de São Paulo, vol. 1 p. 179-207.

CROCOMO, O.J.; W.R. SHARP e M.T.V. CARVALHO, 1979. Controle

da morfogênese e desenvolvimento de plantas em cultura de tecido de cana-de-açúcar. Resultados experimentais. Anais 1º Congresso Soc. Téc. Açucareiros do Brasil (STAB) 1: 241-243.

CROCOMO, O.J. e N.OCHOA-Alejo, 1983. Herbicide tolerance in regenerated plants. In: Evans, D.A., W.R. Sharp, P.V. Ammirato e Y. Yamada. Eds. Handbook of Plant Cell Culture. New York, Macmillan Publishing Co. p. 707-781.

DEAMBROGIO, E. e P.J. DALE, 1980. Effect of 2,4D on the frequency of regenerated plants in barley and on genetic variability between then. Cereal Research Communication 8: 417-423.

DOUGALL, D.K., 1980. Nutrition and Metabolism. In: Plant Tissue Culture as Source of Biochemicals. Staba, E.J. Ed. CRS Press Inc. p. 21-58.

DUBOIS, M; K.A. GILLES, J.K. HAMILTON; P.A. REBERS e F.S. SMITH, 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal. Chem. 28: 350-356.

EPSTEIN, E., 1936. Nutrição mineral das plantas: princípios e perspectivas, tradução e notas de E. Malanolta. São Paulo, Ed. da Universidade de São Paulo. p.341

FOLKES, B.F. e A.P. SIMS, 1974. The significance of aminoacid inhibition of NADP - linked glutamate dehydrogenase in the physiological control of glutamate synthesis in Candida utilis. Journal General Microbiology 82: 77-95.

FORCHE, E., R. KIBLER e K.H. NEUMAN, 1981. The influence of developmental stages of haploid and diploid callus cultures of Datura inoxia on shoot initiation. Z. Pflanzenphysiol Bol. 101: 257-262.

GAMBORG, O.L., 1970. Effect of aminoacids and ammonium on the growth of plant cells in suspension culture. Plant Physiology 45: 372-375.

GAMBORG, O.L., 1970. The culture of plant cells with ammonium salts as the sole nitrogen source. Plant Physiology 45: 598-600.

GAUTHERET, R.J., 1955. The nutrition of plant tissue culture. Annual Review of Plant Physiology 6: 433-454.

GLENN, E.P., 1981. Growth effect and metabolism of arginine in stationary and rapidly dividing sugarcane cell suspensions. Physiology Plant 52: 59-64.

GONÇALVES, A.N., 1975. The growth and developmental physiology of Eucalyptus in cell and tissue culture systems. Ohio, Ohio State University, 210 p. (Tese de mestrado).

GUERREIRO, M.G., J.M. VEGA, M. LOSADA, 1981. The assimilatory nitrate-reducing system and its regulation. Annual Review of Plant Physiology 32: 169-204.

HALPERIN, W., 1965. Alternative morphogenetic events in cell suspension culture. American Journal Botany 53: 443-453.

HALPERIN, W. e D.F. WETHERELL, 1965. Ammonium requirement for embriogenesis *in vitro*. Nature (London) 205: 519.

HARDY, E.L. e T.A. THORPE, 1981. Nitrogen metabolism in shoot-forming tobacco callus. Plant Physiology, suppl. 67: 7.

HAYNES, R.J. e K.M. GOH, 1978. Ammonium and nitrate nutrition of plants. Biology Review 53: 465-510.

HEINZ, D.J. e G.W.P. MEE, 1969. Plant differentiation from callus tissue of *Saccharum* species. Crop Science 9: 346-348.

HEINZ, D.J., M. KRISHNAMURTHI, L.G. NICKELL e A. MARETZKI, 1977. Cell, tissue and organ culture in sugarcane improvement. In: REINERT, J. and Y.P.S. BAJAJ. Eds. Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture. Berlin, Springer-Verlag, p.3-17.

HICKS, G.S., 1980. Patterns of organ development in plant tissue culture and the problem of organ determination. The Botanical Review 46: 1-23.

KABAT, E.A. e M.M. MAYER, 1967. Ninhydrin method for primary aminoacids. In: THOMAS, CHARLES C. Ed. Experimental Immunochemistry 2nd ed. Spring Field p. 560-563.

KANAMORI, T., S.KONISHI e E. TAKAHASHI, 1972. Inducible formation of glutamate dehidrogenase in rice plant roots by the addition of ammonia to the media. Physiologia Plantarum 26: 1-6.

KRISHNAMURTHI, M. e J. TLASKAL, 1974. Fiji disease resistant *Saccharum officinarum* var. Pindar sub-clones from tissue culture. Proceeding of International Society Sugarcane Technology 15: 1-8.

LARKIN, P.J., 1981. Sugarcane tissue and protoplast culture. Datilografado. Austrália. CSIRO 14pp.

LAWYER, A.L., K.L. GRADY e J.A. BASSHAM, 1981. Intracellular concentration and metabolism of carbon compounds in tobacco callus cultures effects of light and auxins. Plant Physiology 68: 857-864.

LEA, P.J. e B.J. MIFLIN, 1974. Alternative route for nitrogen assimilation in higher plants. Nature 251: 614-616.

LIU, M.C. e M.H. CHEN, 1973. Effect of organic nitrogen on growth and patterns of growth and division in suspension cultures of sugarcane. J. Agric. Assoc. China 81: 20-26.

LIU, M.C. e M.H CHEN, 1974. Histological studies on the origin and process of plantlet differentiation in sugar cane callus mass. Proc. XV Congress International Society Sugarcane Technology p. 118-128.

LIU, M.C. e M.H. CHEN, 1976. Tissue and cell culture as aids to sugarcane breeding I. Creation of genetic variation through callus culture. Euphytica 25: 393-403.

LOWRY, O.H., N.J. ROSENBROUGH, A.L. FARR e R.J. RANDALL, 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. Journal of Biological Chemistry 193: 265-275.

MALFATTI, H., J.C.VALLEE, E. PERDRIZET, M. CARRE e C. MARTIN, 1983. Free amino acids and amines in leaf explants of Nicotiana tabacum cultivate *in vitro* on media inducing rhizogenesis or caulogenesis. Physiologia Plantarum 57: 492-498.

MASCARENHAS, A.I., 1981. Plant tissue culture - it's role in studies on organogenesis. Current Science 50: 535-540.

MARTIN, S.M., D. ROSE e V. HUI, 1977. Growth of plant cell cultures with ammonium as the sole source of nitrogen. Canadian Journal Botany 55: 2838-2843.

MEERS, J.L. e D.W.TEMPEST, 1970. Glutamine (amide) 2-oxoglutarate aminotransferase oxidoredutase (NADP) on enzyme involved in the synthesis of glutamate by some

bacteria. Journal General Microbiology 64: 187-194.

MENGEL, K. e E.A. KIRBY, 1978. Principles of Plant Nutrition International Potash Institute, Berne. 593 p.

MIFLIN, B.J. e P.J. LEA, 1976. The pathway of nitrogen assimilation in plants. Phytochemistry 15: 873-885.

MINOTTI, P.L., D.C. WILLIANS, W.A. JACKSON, 1969. The influence of ammonium on nitrate reduction in wheat seedlings. Planta 86: 267-271.

MOHANTY, B. e J.S. FLETCHER, 1976. Ammonium influence on the growth and nitrate reductase activity of Paul's Scarlet Rose suspension cultures. Plant Physiology 58: 152-155.

MONTAGUE, M.C., R.K. ENNUS, N.R. SIEGEL e E.G. JAWORSKI, 1981. A comparison of 2,4 diclorofenoxiacetic acid metabolism in cultured soybean cells and in embryogenic carrot cells. Plant Physiology 67: 603-607.

MURASHIGE, T. e F. SKOOG, 1962. A revised medium rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15: 473-497.

NASH, D. e M. DAVIES, 1972. Some aspects of growth and metabolism of Paul's Scarlet Rose cell suspensions. Journal of Experimental Botany 23: 75-91.

NELSON, N., 1944. A photometric adaptation of the Somogyi method for determination of glucose. Journal Biological Chemestry 153: 375-380.

NICKELL, L.G., 1964. Tissue and cell cultures of sugarcane another research tool. Hawaiian Planters Record 57: 223-229.

NICKELL, L.G. e H.P. KORTSCHAK, 1964. Arginine, its role in sugarcane growth. Hawaiian Planters Record 57: 230-236.

NICKELL, L.G. e A. MARETEZKI, 1969. Growth of suspension cultures of sugarcane cells in chemically defined media. Physiologia Plantarum 22: 117-125.

OCHOA-ALEJO, N. e O.J. CROCOMO, 1981. Influência de três formas de nitrogênio sobre o metabolismo de compostos nitrogenados em cana-de-açúcar (Saccharum spp) cv NA 56-79. Anais Congresso Stab, vol. II: 305-319.

PATE, J.S., 1980. Transport and participation of nitrogenous solutes. Annual Review of Plant Physiology 31: 313-340.

RAGHAVAN, V. e J.G. TORREY, 1964. Inorganic nitrogen nutrition of the seedlings of the orchid, Cattleya. American Journal Botany 51: 264-274.

REINERT, J., M.TAZAWA e S. SEMENOFF, 1967. Nitrogen compounds as factors of embryogenesis *in vitro*. Nature 216: 1215-1216.

REINERT, J. e D.BACKS, 1968. Control of totipotency in plants cells growing *in vitro*. Nature 220: 1340-1341.

RHODES, D., G.A. RENDON, G.R. STEWART, 1976. The regulation of ammonia assimilating enzymes in Lemma minor L. Planta 129: 203-210.

RICHTER, R. e W. DIJKSHOORN, 1975. Aminoacids of barley plants in relation to nitrate,urea or ammonium nutrition. Plant Soil 42: 601-618.

ROSE, D. e S.M. MARTIN, 1974. Parameters for growth measurements in suspension cultures of plant cells. Canadian Journal Botany 52: 903-912.

ROSE, D. e S.M. MARTIN, 1975. Effect of ammonium on growth of plant cells (Ipomoea sp) in suspension cultures. Canadian Journal Botany 53: 1942-1949.

SHEN, T.C., 1969. Induction of nitrate reductase and the preferential assimilation of ammonium in germinating rice seedlings. Plant Physiology 44: 1650-1655.

SCHENK, R.V. e A.C. HILDEBRANDT, 1972. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. Canadian Journal Botany 50: 199-204.

SHEPARD, J.F., D. BIDNEY e E. SHAHIN, 1980. Potato protoplast in crop improvement. Science 208: 17-24.

SHEPARD, J.F., D. BIDNEY, T. BARBY e R. KEMBLE, 1983. Genetic transfer in plants through interspecific protoplast fusion. Science 219: 683-688.

THORPE, T.A. e D.D. MEIER, 1972. Starch metabolism, respiration and shoot formation in tobacco cultures. Physiologia Plantarum 27: 365-369.

THORPE, T.A., 1982. Physiological and biochemical aspects of organogenesis *in vitro*. In: Proceeding of the 5th International Congress of Plant Tissue and Cell Cultures. 121-124.

THOM, M., A. MARETZKI, E. KOMOR e W.S. SAKAI, 1982. Nutrient uptake and accumulation by sugarcane cell cultures in relation to the growth cycle. Plant Cell Tissue and Organ Culture. 1: 3-14.

TORREY, J.G., 1967. Morphogenesis in relation to chromossomal constitution in long term plant tissue cultures. Physiologia Plantarum 20: 265-275.

VASIL, V. e A.C. HILDEBRANDT, 1965. Growth and tissue formation from single, isolated tobacco cells in microculture. Science 147: 1454-1455.

VELICKY, I.A. e D. ROSE, 1973. Nitrate and ammonium as nitrogen nutrients for plant cell cultures. Canadian Journal Botany 51: 1837-1844.

WEATHERBURN, M.W., 1967. Phenol hipochlorite reaction for determination of ammonia. Analitical Chemistry 39: 971-974.

WEISSMAN, G.S., 1964. Effect of ammonium and nitrate nutrition on protein level and exudate composition. Plant Physiology 39: 947-952.

WEISSMAN, G.S., 1972. Influence of ammonium and nitrate nutrition on enzymatic activity in soybean and sunflower. Plant Physiology 49: 138-141.

WETHERELL, D.F. and D.K. DOUGALL, 1976. Sources of nitrogen supporting growth and embriogenesis in cultured wild carrot tissue. Physiologia Plantarum 37: 97-103.

WHITE, P.R., 1963. The cultivation of animal and plant cells 2nd ed. Ronald Press. New York.

YOSHIDA, F. e H. KOHMO, 1982. Effect of media containing NH_4^+ as the sole nitrogen source on cultured cells of tobacco and rice. Proceeding of the 5th International Congress Plant Tissue and Cell Culture 231-232.

ZINK, M.W. e I.A. VELIKY, 1977. Nitrogen assimilation and regulation of nitrate and nitrite reductase in cultured Ipomoea cells. Canadian Journal Botany 55: 1557-1568.

7. APÊNDICE

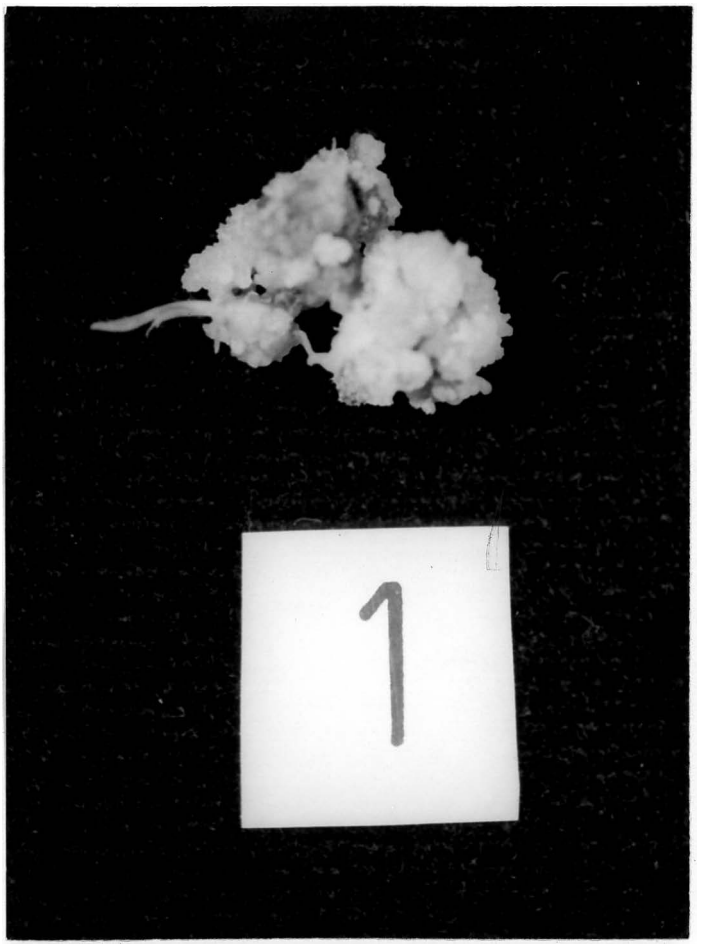


Figura I. Calo cultivado em meio de cultura contendo 100mM de nitrogênio inorgânico (NH_4^+/NO_3^- - 1:4,00)
O calo apresenta-se parcialmente necrosado. O aspecto das células é ressecado e friável. A única folha, que pode ser observada do lado esquerdo, formou-se no meio MS (60mM de N) antes do calo ser transferido para meio contendo 100mM de N.

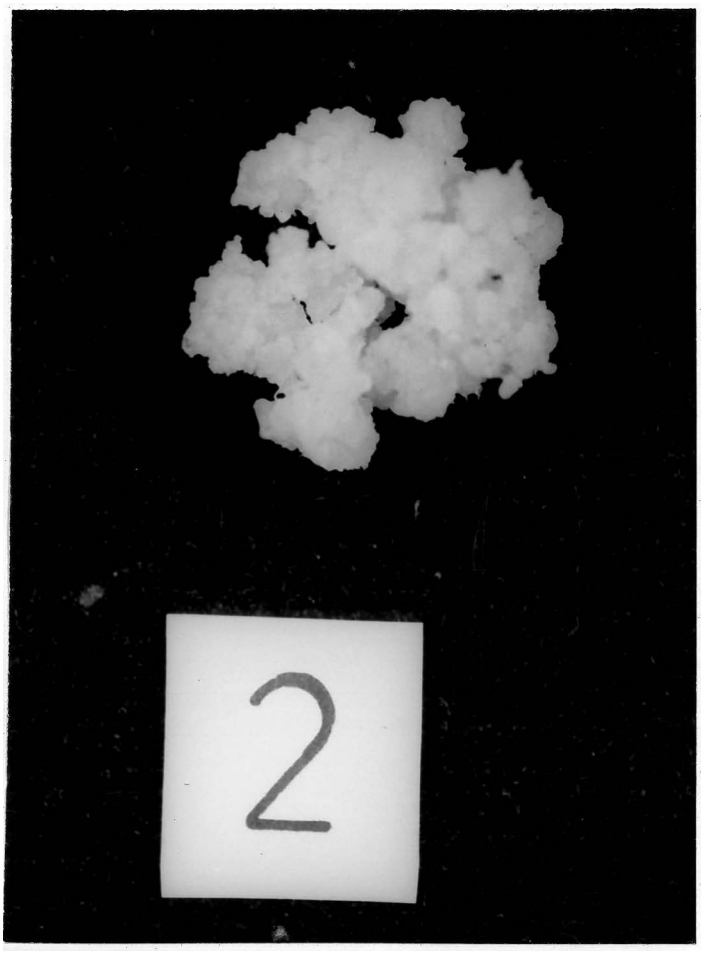


Figura II. Calo cultivado em meio de cultura contendo 80mM de nitrogênio inorgânico (NH_4^+/NO_3^- - 1:3,00)
O calo apresentou um crescimento intenso, apresentando coloração amarela e aspecto friável. Não houve formação de primórdios foliares.

Figura III. Calo cultivado em meio de cultura contendo 75mM de nitrogênio inorgânico (NH_4^+/NO_3^- - 1:2,75)
O calo, de coloração amarela clara e aspecto friável, não apresentou formação de primórdios foliares.

Figura IV. Calo cultivado em meio de cultura contendo 70mM de nitrogênio inorgânico (NH_4^+/NO_3^- - 1:2,50)
No calo bem desenvolvido, de coloração amarela clara, nao ocorreu diferenciação.

Figura V. Calo cultivado em meio de cultura contendo 65mM de nitrogênio inorgânico (NH_4^+/NO_3^- - 1:2,25)
Na parte suspensa do calo, de aspecto friável e coloração amarela clara, observa-se inúmeras folhas em estágio intermediário de desenvolvimento.

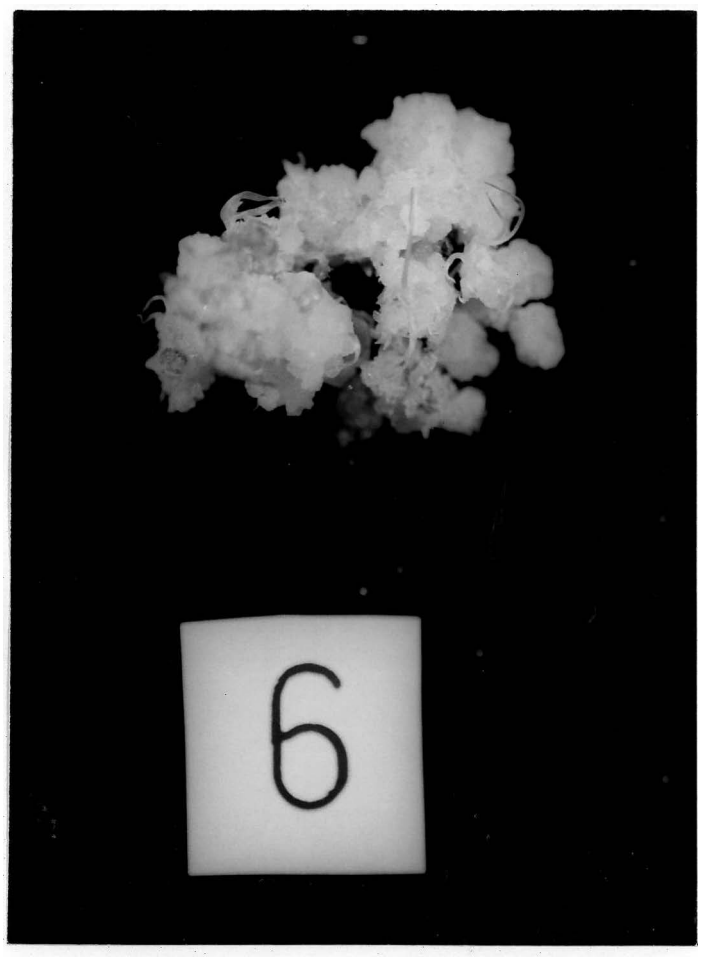


Figura VI. Calo cultivado em meio de cultura contendo 60mM de nitrogênio inorgânico (NH_4^+/NO_3^- - 1:2,00)
No calo de cor amarela e aspecto friável, observa-se folhas em diferentes estágios de desenvolvimento e grande número de primórdios foliares.

Figura VII. Calo cultivado em meio de cultura contendo 55mM de nitrogênio inorgânico (NH_4^+/NO_3^- - 1:1,75)
No calo, de cor amarela clara e friável, observa-se folhas em diferentes fases de desenvolvimento.
À esquerda, folhas em avançado estágio de desenvolvimento. Na parte superior e inferior, início de diferenciação de parte aerea.

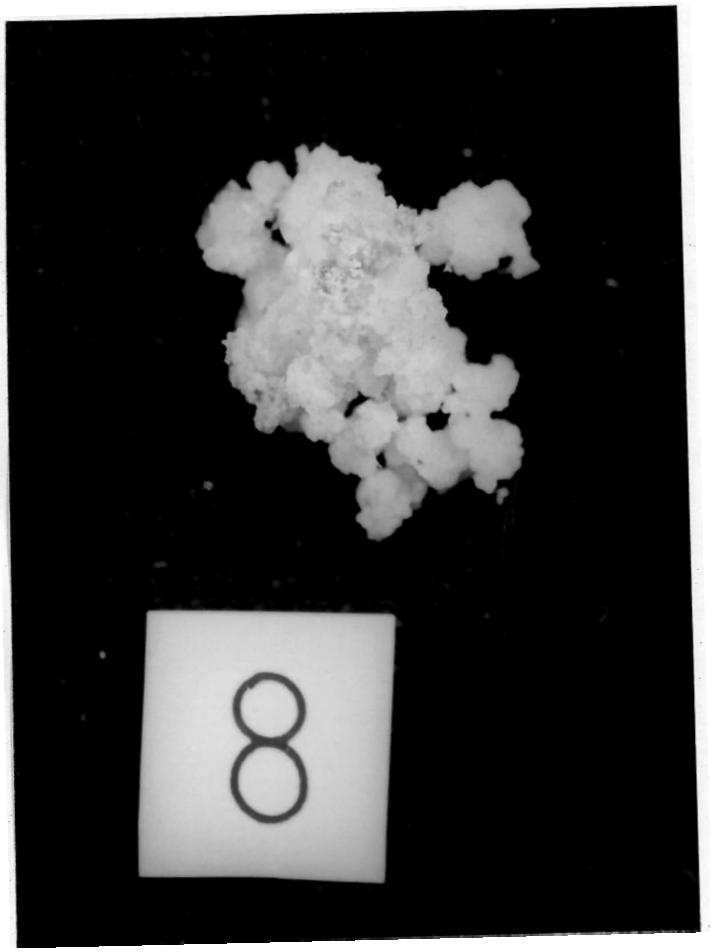


Figura VIII. Calo cultivado em meio de cultura contendo 50mM de nitrogênio inorgânico (NH_4^+/NO_3^- - 1:1,50)
A parte central do calo, com aspecto ressecado, são inúmeros primórdios foliares de coloração verde.

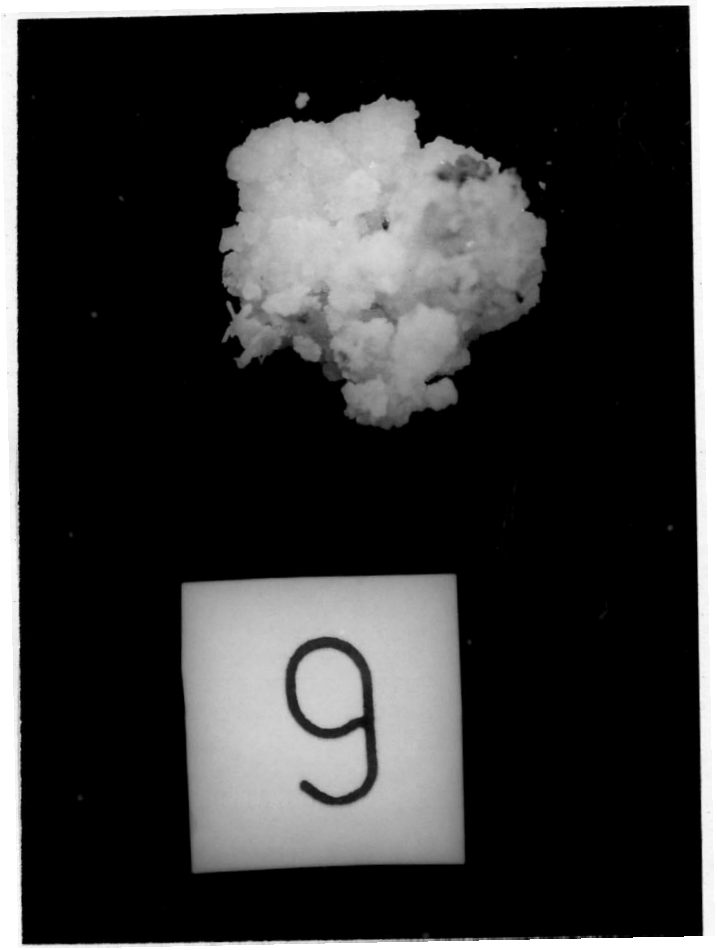


Figura IX. Calo cultivado em meio de cultura contendo 45mM de nitrogênio inorgânico (NH_4^+/NO_3^- - 1:1,25)
No calo de coloração amarela e consistente, não se observou primórdios foliares.

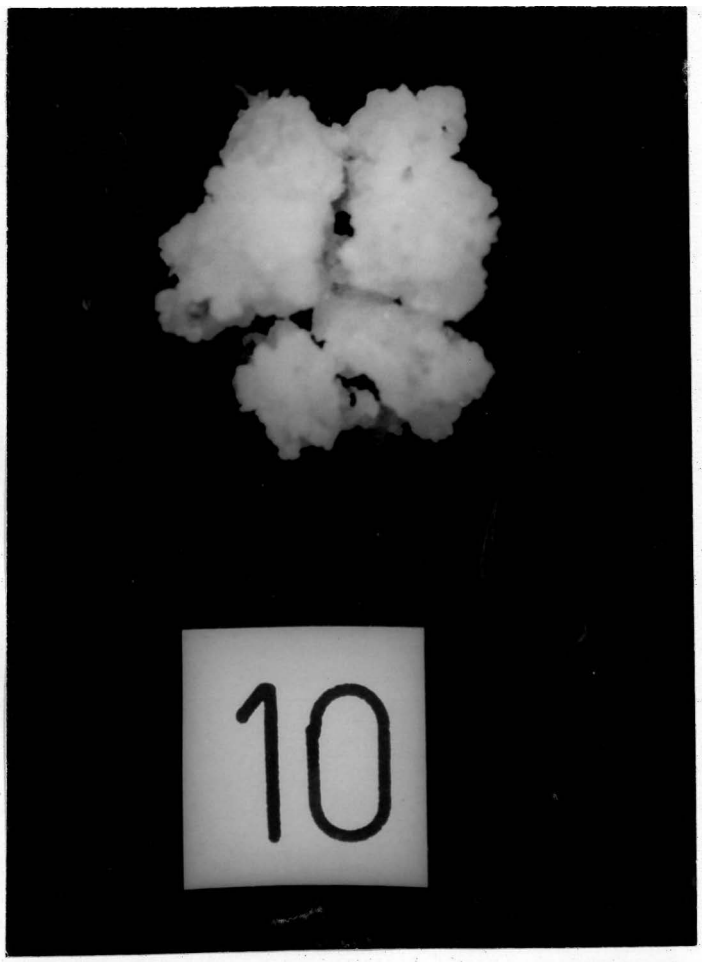


Figura X. Calo cultivado em meio de cultura contendo 40mM de nitrogênio inorgânico (NH_4^+/NO_3^- - 1:1,00)
No calo de coloração amarela clara e consistência firme, não houve formação de primórdios foliares.

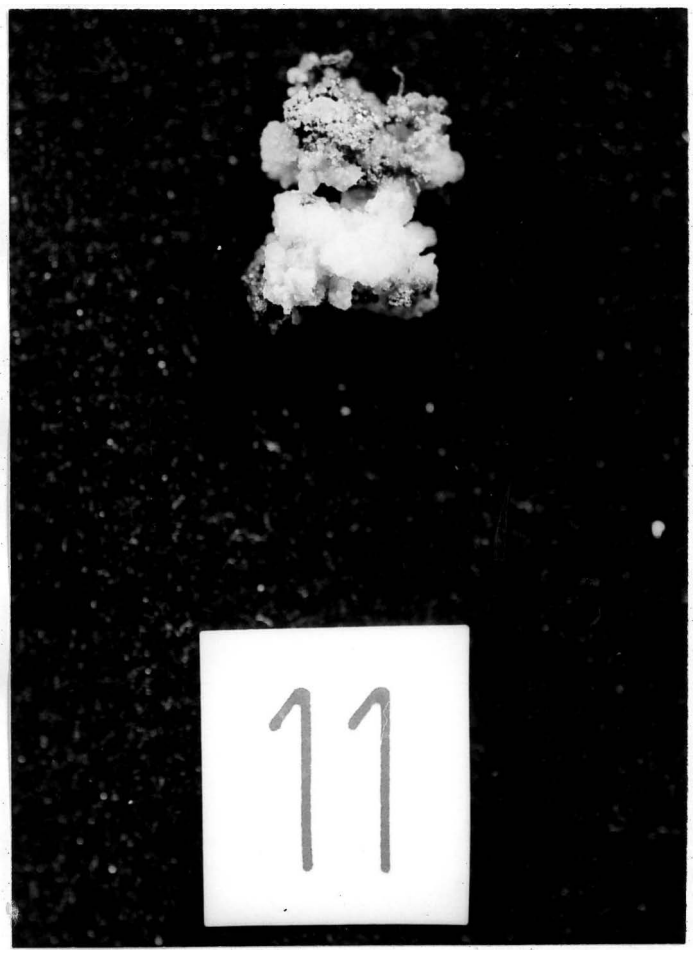


Figura XI. Calo cultivado em meio de cultura sem nitrogênio inorgânico (controle).
Calo apresentando necrose em praticamente toda a sua extensão, caracterizada por células escuras de cor marrom ou preta. O crescimento do calo foi pequeno.