

EFEITOS DAS CITOCININAS BENZILAMINO PURINA E THIDIAZURON, NA MULTIPLICAÇÃO "IN VITRO" DE BROTAÇÕES DE *Eucalyptus Dunnii* MAID.

Maria Elisa Cortezzi Graça¹
Antonio Nascim Kalil Filho²
Antonio Carlos de S. Medeiros³
Fernando R. Tavares⁴

RESUMO

O efeito do tidiazuron (TDZ) foi comparado ao da benzilaminopurina (BAP) na multiplicação *in vitro* de clones de *Eucalyptus dunnii*. Brotações de três clones foram inoculadas no meio básico MS (Murashige & Skoog, 1962) suplementado de sacarose (3%), ágar (0,3%), PVP 10.000 (polivinilpirrolidona) (1,0 g.l⁻¹) e de 1,0mM, 5,0mM ou 10,0mM de BAP ou TDZ. A maior proliferação de brotações ocorreu com o BAP. Entre as concentrações estudadas, a concentração de 1,0mM de BAP foi a que resultou em um maior número de brotações. O TDZ nas concentrações utilizadas promoveu a multiplicação, mas aumentou a calosidade e foi detrimental para o desenvolvimento das brotações. Concentrações mais baixas devem ser usadas para se testar a eficiência do produto para a multiplicação de *E. dunnii in vitro*.

PALAVRAS-CHAVE: cultura de tecidos, citocininas, *Eucalyptus*, TDZ, BAP.

EFFECTS OF 6 BENZYLAMINO PURINE AND THIDIAZURON ON PROPAGATION "IN VITRO" OF EUCAYPYPTUS DUNNII MAID COPPICING

ABSTRACT

The effect of thidiazuron (TDZ) and 6-benzylamino purine (BAP) on *in vitro* axillary shoot formation of *Eucalyptus dunnii* Maid. was determined. Shoots from three clones were cultivated on basal MS media (Murashige & Skoog, 1962) supplemented with sucrose (3.0%), agar (0.6%), PVP (polivinylypyrrolidone) (1.0 g.l⁻¹

¹ Engenheira-agrônoma, Doutora, Pesquisadora da *Embrapa Florestas*.

² Engenheiro-agrônomo, Doutor, Pesquisador da *Embrapa Florestas*.

³ Engenheiro-agrônomo, Doutor, Pesquisador da *Embrapa Florestas*.

⁴ Engenheiro-agrônomo, Bacharel, Pesquisador da *Embrapa Florestas*.

1) and BAP or TDZ at 1.0mM , 5.0mM or 10.0mM. Shoot proliferation was greater with BAP than with TDZ. Among the concentrations used, 1.0mM BAP promoted the greatest number of shoots. The use of TDZ in the medium was detrimental to the shoots, resulting in poor growth, leaf chlorosis and excessive callus formation at the base of the shoots. Therefore lower concentrations of TDZ ought to be tried to test the efficiency of this cytokinin in *Eucalyptus*.

KEY-WORDS: tissue culture, cytokinins, TDZ, BAP, *Eucalyptus*

1. INTRODUÇÃO

Uma das últimas inovações na micropropagação de espécies lenhosas tem sido a introdução do tidiazuron (TDZ) (N-fenil-N´-1,2,3-tiadiazol-5-ylureia) como regulador de crescimento no meio de cultura. Embora tenha sido desenvolvido para ser utilizado como desfoliante para o algodão, com o nome comercial de Dropp, o TDZ possui alta atividade de citocinina em cultivos *in vitro*, quando utilizado em pequenas concentrações (Mok et al., 1982). A superior potencialidade do TDZ sobre as citocininas do tipo das adeninas, em particular 6-benzilaminopurina e zeatina, ficou comprovada em bioensaios com cultura de calos de *Phaseolus* (Mok et al. 1980). O thidiazuron tem sido utilizado para a multiplicação de gemas axilares de espécies lenhosas durante a micropropagação. Tabrett & Hammatt (1992), comparando o TDZ e o BAP, verificaram que o TDZ, ao invés do BAP, aumentou o peso fresco das culturas e a proporção de embriões derivados de epicótilos que produziram brotações adventícias de *Fraxinus excelsior*. Em *Prunus avium* L., a micropropagação foi melhor sucedida quando o TDZ foi suplementado no meio de cultura do que na sua ausência (Hammatt & Grant, 1997). Efeitos significativos também foram observados na proliferação de brotações adventícias oriundas de folhas de *Prunus* spp (Escalettes & Dosba, 1993). A formação das brotações de *Fraxinus americana* foi induzida em meio contendo TDZ, mas não em explantes cultivados em meio com BAP ou 2-iP (isopenteniladenina) (Bates et al., 1992). A combinação de TDZ com a zeatina, no entanto, foi o melhor tratamento para a sobrevivência e desenvolvimento de gemas advindas de epicótilos e embriões zigóticos de *Picea glauca* (Ellis et al., 1991).

Por ser o TDZ mais potente que outras citocininas, as concentrações requeridas são menores que das demais citocininas para se obter resultados similares de multiplicação. Sankhla et al. (1996) verificaram que o TDZ, utilizado em baixas concentrações, foi altamente eficiente em promover a multiplicação de brotações de *Albizia julibrissin*, sendo necessárias altas concentrações de benziladenina e zeatina para produzir efeito similar.

Por outro lado, o número de brotações obtidas de *Rhododendron simsii* "Hellmut Vogel" foram menores em relação a outras citocininas, e necessitaram de um período de alongamento quando o TDZ foi utilizado. Este estágio foi dispensado quando a zeatina foi utilizada (Mertens et al., 1996). O BAP foi a melhor combinação em qualidade e número de brotações de *Cercis canadensis* var. *mexicana* que o TDZ (Mackay et al., 1995). Em geral, o BAP resultou na máxima proliferação de brotações de *Berberis trifoliata*, sem contudo mostrar diferença entre concentrações baixas de TDZ ou altas de cinetina.

Porém, as brotações produzidas em TDZ eram de pior qualidade, com discoloração da parte basal das brotações e formação de antocianinas nas folhas quando comparadas com BAP ou cinetina (Molinar et al., 1996).

A embriogênese somática de algumas espécies pode ser estimulada com a adição de TDZ. Para *Cayratia japonica* (Thump.) Gagnep., herbácea perene, a adição de TDZ aumentou até 25% a formação de embriões somáticos (Zhou et al., 1994).

A comparação entre o TDZ e o BAP na multiplicação de brotações de *Eucalyptus dunnii* foi realizada com o objetivo de se obter uma fonte de citocinina alternativa para o estágio da multiplicação, visto que subcultivos contínuos com o BAP podem causar a inibição do enraizamento para várias espécies de *Eucalyptus*. (Bennett et al., 1992).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

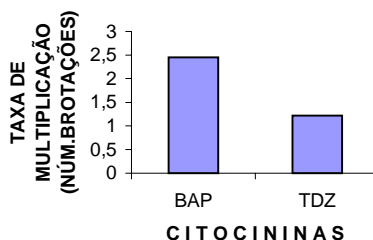
Brotações de três clones de *Eucalyptus dunnii* Maid. mantidos *in vitro* foram subcultivados durante 60 dias em meio básico de Murashige & Skoog (1962) (MS) antes de se iniciar os tratamentos, a fim de se retirar efeitos residuais de reguladores de crescimento que outrora eram presentes. Em seguida, brotações foram inoculadas no meio MS básico suplementado de PVP 10 (polivinilpirrolidona) ($1,0 \text{ g.L}^{-1}$), sacarose (30 g.L^{-1}), ágar ($6,0 \text{ g.L}^{-1}$) e com benzilaminopurina ou TDZ, ambos utilizados nas concentrações de $1,0 \text{ mM}$, $5,0 \text{ mM}$ ou $10,0 \text{ mM}$. A taxa de multiplicação das brotações foi calculada pelo cociente do incremento de brotações dois meses pós-inoculação e o número de brotações iniciais inoculadas, e o percentual de calosidade pelo cociente entre o número de calos obtidos em relação ao número de explantes total (explantes com + sem calosidade).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, sendo que os tratamentos consistiram de combinações de três clones, duas citocininas, BAP e TDZ, com três concentrações de cada uma. Cada frasco continha duas brotações individualizadas ou em grupos. Foi determinado o número inicial das brotações agrupadas, sendo o resultado final expresso em termos de incremento no número de brotações. Cada tratamento constou de oito repetições, sendo que o experimento foi repetido duas vezes, em dois subcultivos de 30 dias cada.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

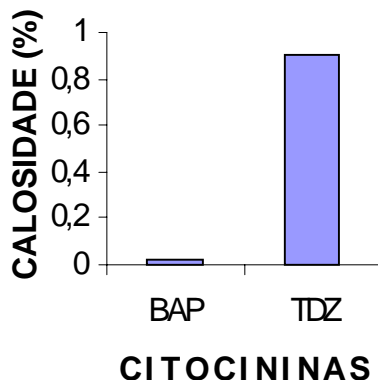
A multiplicação de *E. dunnii* foi influenciada pelas citocininas utilizadas (Figura 1).

FIGURA 1 – Comparação dos efeitos de BAP e TDZ na multiplicação de brotações de *E. dunnii*.



O número de brotações foi significativamente maior com o BAP do que com TDZ quando estes foram suplementados ao meio de cultura. As brotações subcultivadas em TDZ se apresentavam amareladas, pouco desenvolvidas e com formação excessiva de calos na base (Figura 2).

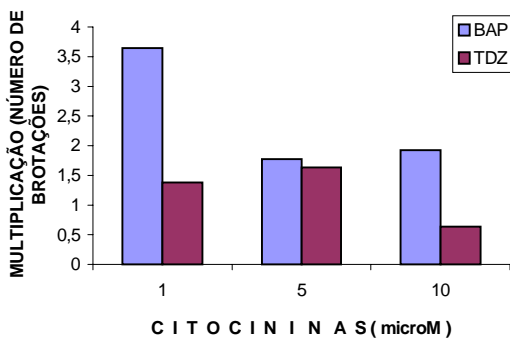
FIGURA 2 – Calosidade das brotações de *E. dunnii* em função das citocininas utilizadas no meio de multiplicação.



Esses sintomas acentuaram-se mais no segundo subcultivo (experimento), onde algumas brotações definharam e morreram. Esse efeito degenerativo do TDZ nas concentrações utilizadas também foi reportado por Molinar et al. (1996) com brotações de *Cercis canadensis var. mexicana* e por Huetteman & Preece (1993).

Entre as concentrações utilizadas, 1,0 μ M de ambos reguladores de crescimento promoveu maior incremento no número de brotações (Figura 3).

FIGURA 3 – Efeito de diferentes concentrações de BAP e TDZ na multiplicação de *E. dunnii*.



Embora a diferença entre as citocininas no número de brotações na concentração de 5,0mM não foi marcante, foi significativa nas demais concentrações (Tabela 1). Para o BAP houve uma relação entre o número de brotações e o decréscimo da concentração, enquanto que esta mesma tendência não foi observada para o TDZ (Figura 3).

TABELA 1– Brotação em *E. dunnii* em função de diferentes concentrações de BAP e TDZ

Hormônios	Equação polinomial	Coefficiente de determinação	Teste F
BAP	$B = 3,42 - 0,18C$	0,62	11,94**
TDZ	$B = 1,68 - 0,09C$	0,56	0,11ns

B = nº brotações; C= concentração do hormônio (citocinina)

ns- não significativo

** significativo a pF 0,01

As variadas respostas de multiplicação de brotações de espécies lenhosas empregando o TDZ são devidas à espécie trabalhada e à concentração de TDZ utilizada. Por ser o TDZ mais potente que as aminopurinas, é recomendado que se use faixas de concentrações menores quando se pretende comparar com outras citocininas (Huetteman & Preece, 1993). Entretanto, os mesmos autores sugerem que os experimentos preliminares devem ser conduzidos em concentrações equimolares para ambas citocininas, na faixa de 1,0 a 10,0 mM, como realizado no presente estudo, e por ser a primeira vez testado na micropropagação de *Eucalyptus*.

4. CONCLUSÕES

O efeito do TDZ, nas concentrações utilizadas, foi inferior ao do BAP na multiplicação de brotações de *E. dunnii*. Além de uma menor proliferação, as brotações apresentaram-se pouco desenvolvidas e atrofiadas, com excessiva calosidade. Há a necessidade de se testar concentrações mais baixas de TDZ comparadas com mais altas de citocininas da classe das aminopurinas para realmente se comprovar a eficiência dessa citocinina na multiplicação de brotações de *E. dunnii*.

5. REFERÊNCIAS

BATES, S.; PREECE, J. E.; NAVARRETE, N. E.; SAMBEEK, J. W. van; GAFFNEY, G.R. Thidiazuron stimulates shoot organogenesis and somatic embryogenesis in white ash (*Fraxinus americana* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 31, n. 1, p. 21-29, 1992.

- BENNETT, I. J.; McCOMB, J. A.; TONKIN, C. M.; McDAVID, D. A. J. Effect of cytokinins on multiplication and rooting of *Eucalyptus globulus* and other *Eucalyptus* species. In: SYMPOSIUM MASS PRODUCTION TECHNOLOGY FOR GENETICALLY IMPROVED FAST GROWING FOREST TREE SPECIES, 1992, Bordeaux. **Resumes - Summaries**. Bordeaux: AFOCEL / IUFRO, 1992. Resumo. Theme IV: Variété propagées par voie végétative. Não paginado.
- ELLIS, D. D.; BARCZYNSKA, H.; McCOWN, B. H.; NELSON, N. A comparison of BA, zeatin and thidiazuron for adventitious bud formation from *Picea glauca* embryos and epicotyl explants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Hague, v. 27, n. 3, p. 281-287, 1991.
- ESCALETTES, V.; DOSBA, F. *In vitro* adventitious shoot regeneration from leaves of *Prunus* spp. **Plant Science**, Dordrecht, v. 90, n. 2, p. 201-209, 1993.
- HAMMATT, N.; GRANT, N. J. Micropropagation of mature British wild cherry. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Hague, v. 47, n. 2, p. 103-110, 1997.
- HUETTEMAN, C. A.; PREECE, J. E. Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Hague, v. 33, n. 2, p. 105-119, 1993.
- MACKAY, W. A.; TIPTON, J. L.; THOMPSON, G. A. Micropropagation of Mexican redbud, *Cercis canadensis* var. *mexicana*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Hague, v. 43, n. 3, p. 295-299, 1995.
- MERTENS, M.; WERBROUCK, G. S.; SILVA, H. B. S. M. da; DEBERGH, P. *In vitro* regeneration of evergreen azalea from leaves. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Hague, v. 45, n. 3, p. 231-236, 1996.
- MOK, D. W. S.; MOK, M. C.; ARMSTRONG, J. Cytokinin activity of N-phenyl-N'-1,2,3-Thiadiazol-5-yl urea and its effect on cytokinin autonomy in callus cultures of *Phaseolus*. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 65, n. 6, p. 24, jun. 1980. Abstract.
- MOK, M. C.; MOK, D. W. S.; ARMSTRONG, D. J.; SHUDO, K.; ISOGAI, Y.; OKAMOTO. Cytokinin activity of N-phenyl-N'-1,2,3-thiadiazol-5-ylurea (Thidiazuron). **Phytochemistry**, v. 21, n. 7, p. 1509-1511, 1982.
- MOLINAR Jr., F.; MACKAY, W. A.; WALL, M. M.; CARDENAS, M. Micropropagation of Agarita (*Berberis trifoliata* Moric.). **HortScience**, Alexandria, v. 31, n. 6, p. 1030-1032, 1996.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiol. Plantarum**, Copenhagen, v. 15, p. 473-497, 1962.
- SANKHLA, D.; DAVIS, T. D.; SANKHLA, N. *In vitro* regeneration of silk tree (*Albizia julibrissin*) from excised roots. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Hague, v. 44, n. 1, p. 83-86, 1996.
- TABRETT, A. M.; HAMMATT, N. Regeneration of shoots from embryo hypocotyls of common ash (*Fraxinus excelsior*). **Plant Cell Reports**, New York, v. 11, p. 514-518, 1992.
- ZHOU, J.; MA, H.; GUO, F.; LUO, X. Effect of thidiazuron on somatic embryogenesis of *Cayratia japonica*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Hague, v. 36, n. 1, p. 73-79, 1994.