

EFEITO DE THIDIAZURON NA INDUÇÃO E MANUTENÇÃO DE CALOS DE ERVA-BALEEIRA (*Cárdia verbenacea* L.)

EFFECTS OF THIDIAZURON ON CALLUS INDUCTION AND MAINTENANCE OF *Cárdia verbenacea* L

Osmar Alves Lameira¹ José Eduardo Brasil Pereira Pinto²
Maria das Graças Cardoso³ Manuel Losada Gavilanes⁴

RESUMO

O trabalho teve como objetivo avaliar a influência do Thidiazuron (TDZ) na formação e manutenção de calos de *Cárdia verbenacea*. Segmentos caulinares com 3 a 4cm de comprimento provenientes de mudas cultivadas em casa de vegetação foram desinfestados em solução contendo hipoclorito de sódio comercial a 30% e duas gotas de detergente por 10 minutos, sendo 5 minutos em agitação. Posteriormente, foram excisados e inoculados com 5mm de tamanho em meio sólido a 0,6% de Murashige & Skoog (MURASHIGE & SKOOG, 1962) - MS, complementado com 0,22; 0,68; 2,04 e 6,13µM de TDZ. A formação de calos ocorreu em todos os tratamentos com 10a J 5 dias de cultivo. Os tratamentos que apresentaram o explante com a maior área coberta com calos, em média 75%, foram 2,04 e 6,13µM de TDZ. Somente nesses tratamentos os calos aumentaram de volume e mantiveram a coloração inicial quando transferidos para o meio fresco de cultura. Os tratamentos com menores concentrações de TDZ apresentaram explantes com 50% da área coberta com calos e quando transferidos para o meio fresco de cultura ocorreu a paralisação do crescimento com a posterior morte dos calos.

Palavras-chave: planta medicinal, *Cárdia*, thidiazuron.

SUMMARY

The influence of thidiazuron on callus formation and maintenance of *Corola verbenacea* was evaluated. Stem segments with 3 to 4cm length were excised from greenhouse plants and

surface sterilized with 30% commercial sodium hypochlorite for 10 minutes. Explants were inoculated with 5mm on Murashige and Skoog (MVRASHIGE & SKOOG, 1962) - MS solid medium (0.6%) supplemented with 0.22, 0.68, 2.04 and 6.13µM TDZ. Callus induction was observed 10 to 15 days after incubation. The media containing, 2.04 and 6.13µM TDZ induced 75% explant with callus. The callus when transferred to fresh culture medium exhibited active growth. The treatments containing lower concentration induced 50% explant with callus that when transferred to fresh culture medium, showed no development.

Key words: medicinal plant; *Cordia*; thidiazuron.

INTRODUÇÃO

Cordia verbenacea também conhecida como erva-baleeira é uma planta medicinal usada como antiinflamatório e analgésico pela ação terapêutica do seu princípio ativo artemetina, sendo indicada para a artrite, reumatismo e problemas de coluna, quando administrada internamente na forma de chá (SILVA JÚNIOR *et al.*, 1995).

O Thidiazuron (TDZ) foi desenvolvido originalmente pela empresa Schering AG (Berlim, Alemanha) para ser utilizado como desfolhante do algodoeiro (ARNDT *et al.*, 1976) tendo demonstrado

¹Engenheiro Agrônomo, Mestre, EMBRAPA/CPATU, Belém – PA, Doutorando na Universidade Federal de Lavras (UFLA).

²Engenheiro Agrônomo, Professor Titular, Departamento de Agricultura, UFLA, Caixa Postal 37, 37200-000, Lavras – MG. Autor para correspondência.

³Professora, Doutora, Departamento de Química, UFLA.

⁴Professor Titular, Departamento de Biologia, UFLA.

efeitos semelhantes aos das citocininas quando aplicado em concentrações muito reduzidas.

A atividade de citocinina do TDZ foi detectada em bioensaios de calos de *Phaseolus lunatus* L. cv. Kingston, onde ele foi mais ativo que a zeatina. É um composto do grupo das feniluréias e não apresenta o anel purina comum às citocininas tipo adenina, tais como, benzilaminopurina, cinetina ou zeatina, podendo ser a mais potente das difenil uréias que já foram avaliadas para uso em cultura de tecidos vegetais (MOK *et al.*, 1982). Estudos com o TDZ mostram que este é mais ativo biologicamente em baixas concentrações que outras citocininas sintéticas como cinetina e benzilaminopurina, é mais resistente às oxidases, além de ser mais estável (MOK *et al.*, 1987).

O crescimento de calos é desejável para induzir variação somaclonal e estudos fisiológicos, principalmente, quando se deseja relacionar a presença de produtos secundários com o crescimento celular. O TDZ é uma potente citocinina para estimular a formação de calos em explantes lenhosos, especialmente, quando usado em concentrações igual ou maior que 1.0uM (HUETTEMAN & PREECE, 1993).

O objetivo do trabalho foi avaliar a influência do TDZ na formação e manutenção de calos visando o estabelecimento da curva de crescimento celular para posterior correlação com o princípio ativo.

MATERIAIS E MÉTODOS

Como fonte de explantes foram usadas mudas de erva-baleeira cultivadas em casa de vegetação. Segmentos caulinares com 3-4cm de comprimento foram lavados em água corrente, em seguida desinfestados em solução contendo hipoclorito de sódio comercial a 30% e duas gotas de detergente por 100ml de solução durante 10 minutos, sendo 5 minutos em agitação. Posteriormente, em câmara de fluxo laminar, foram lavados quatro vezes em água destilada autoclavada. Em seguida foram excisados e inoculados com 5mm de tamanho em meio sólido a 0,6% de Murashige & Skoog (MURASHIGE & SKOOG, 1962)-MS, complementado com 0,22; 0,68; 2,04 e 6,13uM de TDZ. O fotoperíodo foi de 16 horas luz sob 1000 lux. Cada tratamento continha 20 explantes.

O percentual de indução de calos foi realizada no início da formação dos calos sobre todos os explantes cultivados. Na avaliação da área dos explantes coberta com calos, três avaliadores atribuíram notas de 1, 2, 3 e 4 para os explantes que apresentavam, respectivamente, 25, 50, 75 e 100% da área coberta com

calos, 30 dias após o cultivo inicial. Em seguida foi realizado o peso fresco dos calos. O percentual de manutenção dos calos foi realizado 30 dias após serem transferidos para o meio fresco de cultivo. O delineamento estatístico usado foi o inteiramente casualizado e os tratamentos foram comparados pelo Teste de Duncan ao nível de 1% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na tabela 1 são apresentados os dados percentuais referentes a indução, manutenção e peso fresco dos calos. A formação de calos ocorreu em todos os tratamentos com 10 a 15 dias de cultivo e as colorações predominantes foram verde e verde cinza. As maiores concentrações foram as mais eficientes, onde todos os explantes formaram calos, apresentaram a maior área coberta com calos e os maiores pesos e quando transferidos para o meio fresco de cultivo continuaram crescendo.

Tabela 1 - Percentagem de indução, manutenção e peso fresco de calos em segmentos caulinares de *Cordia verbenacea* sob efeito de TDZ.

TDZ (µM)	Indução (%)	Manutenção (%)	Peso fresco (g)
0,22	70	0	0,97
0,68	80	0	1,19
2,04	100	100	1,44
6,13	100	100	1,33

Os tratamentos com as menores concentrações de TDZ foram menos eficientes, apresentaram explantes com 50% da área coberta com calos (Figura 1) e quando transferidos para o meio fresco nas mesmas concentrações ocorreu a paralização do crescimento com a posterior morte dos calos (Tabela 1). Não foi observada a proliferação de brotos neste trabalho.

Os tratamentos que apresentaram o explante com a maior área coberta com calos, em média 75%, foram 2,04 e 6,13 uM de TDZ (Figura 1). Somente nesses tratamentos os calos mostraram serem friáveis, aumentaram de volume e mantiveram a coloração inicial quando transferidos para o meio fresco de cultura. A inabilidade dos calos é muito importante para o início da suspensão celular.

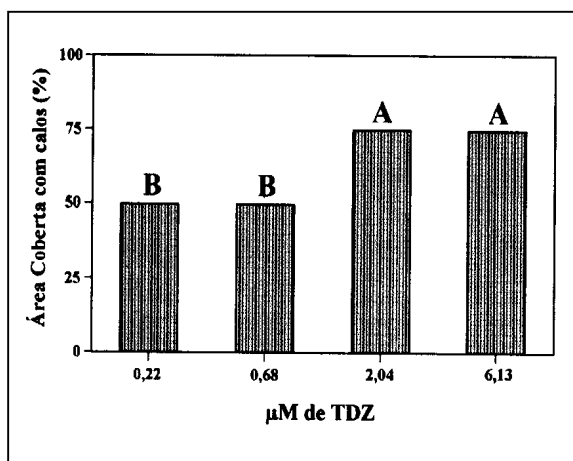


Figura 1 – Percentual de área coberta com calos sob diferentes concentração de TDZ. As médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Duncan ($p < 0,01$).

Apesar do TDZ ter um efeito maior na proliferação de brotações, conforme os resultados obtidos por BARNA & WAKHLU (1995) na micropropagação de roseira, PREECE *et al.* (1991) trabalhando com propágulos de silver maple (*Acer saccharinum* L.) verificaram que TDZ nas concentrações 0, 1, 0,5 e 1,0 µM, apresentaram efeito inibitório no crescimento de brotos axilares, mostrando, entretanto, efeito crescente na formação de calos com o aumento da concentração.

RAMANA *et al.* (1995) relatam a inibição de brotos de batata doce em cinco dos sete genótipos testados na presença de 0,9 µM de TDZ porém, o desenvolvimento de calos foi observado. Nos demais genótipos embora tenha ocorrido a regeneração de brotos, uma pequena formação de calos em tomo da base do explante pode ser observada.

Segundo HUETTEMAN & PREECE (1993) o aumento na concentração de TDZ tende a estimular a formação de calos à custa do crescimento de brotos axilares, tal como ocorreu neste trabalho com a erva-baleeira. Fato semelhante foi evidenciado por SATO (1994) estudando gérbera de vaso, o qual observou que a partir de 2,3 µM de DZ já se iniciava

o processo de indução de calos com a inibição da regeneração de brotos e folhas.

Portanto, fica evidenciado que a formação de calos induzida por altas concentrações de TDZ, certamente, inibirá a proliferação de brotos axilares, consequentemente, induzindo à variação somaclonal (HUETTEMAN & PREECE, 1993).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARNDT, F.R., RUSCH, R., STILFRIED, H.V., *et al.* A new cotton defoliant. *Plant Physiology*, Washington, v. 57, p. 99. 1976.(Abst.).
- BARNA, K.S., WAKHLU, A.K. Effects of thidiazuron on micropropagation of rose. *In Vitro Cellular Developmental Biology*, Columbia, v. 31, n. 1, p. 44-46, 1995.
- HUETTEMAN, C.A., PREECE, J.E. Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* N-therlands, v. 33, n. 2, p. 105-119, 1993.
- MOK, M.C., MOK, D.W.S., ARMSTRONG, D.J., *et al.* Cytokinin activity of N-phenyl-N'-1, 2, 3-Thiadiazol-5-yl urea (thidiazuron). *Phytochemistry*, Elmsford, v. 21, p. 1509-1511, 1982.
- MOK, M.C., MOK, D.W.S., TURNER, J.E., *et al.* Biológica! And biochemical effects of cytokinin-active phenylurea derivatives in tissue culture systems. *HortScience*, Virgínia, v. 22, n. 6, p. 119-1197, 1987.
- MURASHIGE, T., SKOOG, F. A revised médium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plantarum*, v. 15, p. 473-497, 1962.
- PREECE, J.E., HUETTEMAN, C.A., ASHBY, W.C., *et al.* Micro and cutting propagation of silver maple: I Results with adult and juvenile propagules. *Journal American Society Horticultural Science*. v. 116, p. 142-148, 1991.
- RAMANA, M.G., ANANTA, P., ESSIE, B., *et al.* Thidiazuron-induced adventitious shoot regeneration of sweetpotato (*Ipomea batatas*). *In Vitro Cellular Developmental Biology*, Columbia, v. 31, n. 2, p. 65-71, 1995.
- SATO, A.Y. Propagação de gérbera de vaso através da cultura de tecidos. Lavras - MG. 95 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Curso de Pós-graduação em Fitotecnia, Escola Superior de Agricultura de Lavras, 1994.
- SILVA JÚNIOR, A.A., VIZZOTO, V.J., GIORGI, E., *et al.* Plantas medicinais caracterização e cultivo. Florianópolis: EPAGRI, 1995. 71 p. Boletim Técnico, 68.