

## CALOGÊNESE E BROTAÇÕES ADVENTÍCIAS EM TECIDO SOMÁTICO DE KIWI SUPLEMENTADOS COM THIDIAZURON

### CALLOGENESIS AND ADVENTITIOUS SHOOTS IN KIWI SOMATIC TISSUE SUPPLEMENTED WITH THIDIAZURON

Eva Choer<sup>1</sup> Pedro Lima Monks<sup>2</sup> Gerson Renan de Luces Fortes<sup>1</sup>

#### RESUMO

Discos foliares com 0,46cm<sup>2</sup> foram coletados de brotações adventícias de Kiwi cultivados *in vitro* pertencentes a cv. Matua e condicionados por 24 horas em meio líquido contendo 2,4-D (5mg/l). Após este período o material foi cultivado em meio MS acrescido com Thidiazuron nas seguintes concentrações: 0; 0,25; 0,5; 1; 2; 4; 8 e 16mg/l. Os explantes inoculados com a superfície adaxial em contato com o meio de cultura permaneceram três semanas em ambiente escuro à temperatura de 25°C e, posteriormente, foram transferidos para sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas, 2.000 lux de luminância e temperatura de 23 ± 2°C. Nesse ambiente os tratamentos foram mantidos por mais três semanas e então avaliados. As doses mais elevadas de Thidiazuron (8 e 16 mg/l) mostraram-se fitotóxicas, levando os explantes à morte. A formação de raízes foi observada apenas no tratamento controle. A intensidade de formação de calos, número de brotações adventícias, peso da matéria seca e o número de gemas apresentaram comportamento quadrático, em relação às concentrações de Thidiazuron. O Thidiazuron não foi eficiente para formar brotações adventícias de Kiwi. A intensidade de formação de calo aumentou nas concentrações de até 2,21mg/l de Thidiazuron, diminuindo a partir deste valor.

**Palavras-chave:** *Actinidia deliciosa*, Kiwi, cultura de tecido, Thidiazuron, TDZ.

#### SUMMARY

Leaf discs (0.46cm<sup>2</sup>) were collected from adventitious shoots of 'Matua' Kiwi cultivated *in vitro* and were conditioned

during 24 hours in liquid medium with 2,4-D (5mg/l). After this period they were cultured in MS medium added with Thidiazuron in the concentrations following: 0; 0.25; 0.5; 1; 2; 4; 8 and 16mg/l. Explants were inoculated with the adaxial surface in contact with the culture medium and were maintained for about three weeks at 25°C in darkness. After this time they were kept for three weeks in a growth room and exposed to a 16 hour photoperiod, light intensity of approximately 2,000 lux and temperature of 23 ± 2°C. The higher concentrations of Thidiazuron (8 and 16mg/l) were phytotoxic, leading to explant death. Rooting was observed only in the control treatment. Callus intensity formation, adventitious shoots number, callus dry matter weight and bud number showed a quadratic response to the Thidiazuron concentrations. Concentrations of Thidiazuron were not efficient to increase the adventitious shoot number of Kiwi. Callus intensity increased until 2.21 mg/l Thidiazuron concentrations, and declined afterwards.

**Key words:** *Actinidia deliciosa*, tissue culture, Thidiazuron, TDZ.

#### INTRODUÇÃO

O Kiwi (*Actinidia deliciosa*) ou quivi, é provavelmente a mais recente espécie domesticada como cultivo de importância em diversos países. Em 1900, o Kiwi foi coletado na forma silvestre, no sul da China, sendo posteriormente levado para a Nova Zelândia. Neste país foram selecionadas as melhores plantas para formação do primeiro cultivo comercial,

<sup>1</sup> Engenheiro Agrônomo, Pesquisadores do Centro de Pesquisas Agropecuárias de Clima Temperado. EMBRAPA- Pelotas.

<sup>2</sup> Engenheiro Agrônomo, Professor da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Pelotas, 96010-970, Pelotas, RS. Autor para correspondência.

há mais de cinquenta anos. A grande expansão da cultura ocorreu na década de 1970, quando se difundiu pela Europa, Estados Unidos e, mais recentemente, para a América do Sul (EMBRAPA, 1991).

No Brasil, o cultivo do Kiwi vem despertando interesse crescente nos últimos anos, em função dos bons preços alcançados pelos frutos, alto potencial produtivo e baixo custo de produção (SCHUCK, 1992). No entanto, devido a sua pequena variabilidade genética, fora do território chinês, o melhoramento desta espécie, com a utilização das técnicas tradicionais, tem sido limitado (MARINO & BATTISTINI, 1990). A indução da variação somaclonal através da regeneração das plantas *in vitro* provenientes de cultura de células somáticas constitui-se em excelente ferramenta para o melhoramento (LARKIN & SCOWCROFT, 1981). Estudos visando a multiplicação de Kiwi *in vitro* foram realizados por FORTES *et al.* (1992a; 1992b).

Altas concentrações de citocinina tipo adenina são necessárias para o crescimento e diferenciação em culturas de tecido. Estas substâncias são altamente susceptíveis à degradação pelas enzimas citocinina-oxidases (MOK *et al.*, 1987). O Thidiazuron (TDZ), N- Fenil -N'- 1, 2, 3 - Thidiazol - 5 Ylureia, foi registrado em 1976 como desfolhante de algodoeiro (*Gossypium* spp.) (ARNDT *et al.*, 1976). Este produto tem sido usado como regulador de crescimento, em função de sua alta atividade citocínica, resistência à degradação pelas oxidases, ser estável e biologicamente ativo à menores concentrações do que as citocininas tipo adenina (MOK *et al.*, 1987). Tem sido utilizado na micropropagação clonal de várias espécies frutíferas como: maçã, cereja, pêssego, framboesa (CHVOJKA & RESLOVA, 1988), *Phaseolus lunatus* (CAPELLE *et al.*, 1983) e em olerícolas, tais como, *Brassica oleracea* (MOK *et al.*, 1987). No entanto, reduzido número de trabalhos foram encontrados na bibliografia consultada sobre o emprego deste produto na micropropagação somática de Kiwi.

Este trabalho foi realizado com a finalidade de avaliar a resposta do tecido somático de Kiwi na formação de calos e brotações adventícias em meio MS, suplementado com diferentes concentrações de Thidiazuron.

## MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos do Centro de Pesquisas Agrôpecuárias de Clima Temperado (CPACT) da EMBRAPA, Pelotas, RS, em 1993. Utilizou-se a

cultivar Matua proveniente da coleção *in vitro* de Kiwi do CPACT. A operação de cultivo foi realizada em sala de transferência usando-se uma câmara de fluxo laminar.

Os explantes, que constaram de discos foliares de 0,46cm<sup>2</sup>, foram retirados ao longo da nervura principal e inicialmente pré-condicionados em 2,4-D, na concentração de 5mg/l, em frascos de 250ml, durante 24 horas em mesa agitadora, num ambiente escuro e sob temperatura de 25°C. Após esta fase, os explantes foram submetidos a três lavagens em água destilada e autoclavados para retirada do excesso de 2,4-D. Em seguida, os mesmos foram cultivados em tubos de ensaio com 10ml do meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), acrescido de Thidiazuron (TDZ) nas seguintes concentrações: 0; 0,25; 0,5; 1; 2; 4; 8 e 16mg/l, em cinco repetições. Para cada repetição usaram-se cinco tubos de ensaio por tratamento, contendo um explante. Foram adicionados ao meio os seguintes compostos: sacarose (30g/l); mio-inositol (100mg/l) e ágar (6g/l). Antes da autoclavagem o pH foi ajustado para 6,0.

Os explantes foram inoculados com a superfície adaxial em contato com o meio de cultura. Após a inoculação todo o material permaneceu no escuro por cerca de três semanas, em temperatura constante de 25°C. Logo a seguir, o material foi transferido para sala de cultura com fotoperíodo de 16 horas, 2.000 lux de luminância e temperatura de 23 ± 2°C, onde permaneceu por mais três semanas.

Foram realizadas as seguintes avaliações: a) intensidade de calo formado nos explantes (atribuiu-se notas de zero a três, correspondendo a nenhuma, baixa, média e alta formação de calos, respectivamente); b) número de gemas; c) número de brotações adventícias e d) peso de matéria seca. As observações sobre número de gemas, de brotações e intensidade de calos foram transformadas segundo raiz (x+0,5). Todas as variáveis foram submetidas a análise de variância e de regressão polinomial.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após o período de três semanas de permanência do explante no escuro houve formação de uma massa de células de coloração branco-amarelada, de consistência compacta e aspecto nodular. Posteriormente, estes calos foram transferidos para ambiente com iluminação, tornando-se verdes.

As concentrações de 8 e 16mg/l de TDZ mostraram-se fitotóxicas causando a morte dos explantes. Por esse motivo os diferentes parâmetros foram analisados até a concentração de 8mg/l. As

respostas dos discos foliares de Kiwi cultivados em meio contendo diferentes concentrações de TDZ foram quadráticas em relação ao peso de matéria seca, intensidade de formação de calos, número de brotações adventícias e número de gemas.

O peso máximo de matéria seca de calos (0,10g) foi obtido com utilização de 1,50mg/l de TDZ (Figura 1). Entretanto ZIMMERMAN & SCORZA (1994) citam que em explantes de pessegueiro, o peso de matéria seca dos calos aumentou com as concentrações de TDZ utilizadas (0,22; 2,2 e 22mg/l). No mesmo trabalho verificaram que o TDZ proporcionou maior crescimento quando comparado como a Benziladenina.

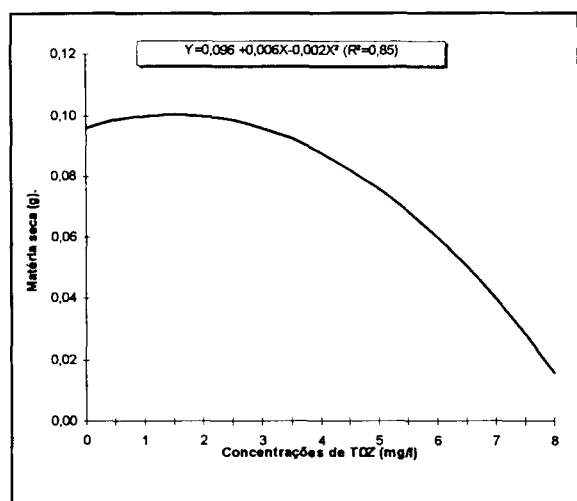


Figura 1 - Peso de matéria seca de calos de Kiwi em função das concentrações de Thidiazuron.

A intensidade de formação de calos aumentou com doses de até 2,21mg/l de TDZ (Figura 2). Nas concentrações mais elevadas houve redução desta formação, indicando, provavelmente, que a relação auxina/citocinina foi desfavorável para o evento da calogênese. Resultado semelhante foi verificado por OKUSE (1994), constatando que o uso de 2,2mg/l de TDZ foi mais eficiente na formação de calos do que outras citocininas e auxinas em explantes de espinafre. Segundo HUETTEMAN & PREECE (1993), concentrações superiores a 0,22mg/l de TDZ podem estimular a formação de calos em plantas lenhosas. Em noqueira pecan, este valor foi de 5,5mg/l (OBEIDY & SMITH, 1993) e, em *Juglans nigra* L., de 1,10mg/l de TDZ acrescido de 10 $\mu$ M de 2,4 D (NEUMAN *et al.*, 1993). O TDZ nas concentrações de 1,76 a 2,86mg/l foi considerado ótimo para a

calogênese, em pessegueiro. No entanto, doses mais elevadas resultaram em necrose dos explantes (DECLERCK & KORBAN, 1996). ARYA *et al.* (1995) verificaram que a fase inicial de formação de calos, em *Betula pendula* Roth, ocorreu com 0,3mg/l de TDZ, em meio basal WPM contendo 2% de sacarose. Em videira e soja o crescimento de calos foi favorecido pela utilização de, respectivamente, 100 $\mu$ M (LIN *et al.*, 1990) e 5x10<sup>-9</sup> M de TDZ (THOMAS & KATTERMAN, 1986).

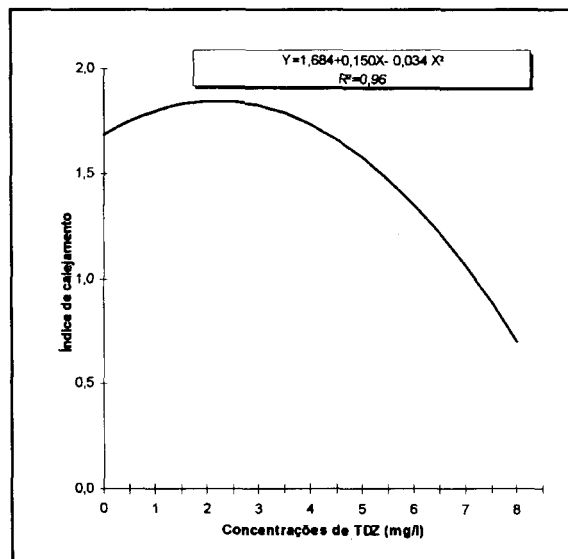


Figura 2 - Intensidade de formação de calos em discos foliares de Kiwi em função das concentrações de Thidiazuron.

O número de brotações adventícias decresceu com a elevação das concentrações de TDZ (Figura 3). Na concentração de 5,86mg/l ocorreu a menor quantidade de brotos. Resultados semelhantes foram observados em explantes de folhas de Kiwi (SEELYE & BUTCHER, 1991) e em cebola (MOHAMED-YASSEEN *et al.*, 1993). PENCE & SOURUP (1988) citam que 0,0022 a 0,011mg/l de TDZ foram as melhores dosagens para a formação de brotos de *Acer spp.* Em macieira a maior indução de brotações ocorreu com utilização de 0,1 a 0,2mg/l de TDZ (NIEUWKERK *et al.*, 1986; HANKE *et al.*, 1991). MEYER & KERNSH (1986) verificaram que concentrações de 0,05 a 0,10 $\mu$ M de TDZ foram mais ativas na proliferação de brotos de *Celtis occidentalis*, do que 4 a 10 $\mu$ M de BAP.

Com relação ao número de gemas formadas, o quivi também apresentou comportamento quadrático com as doses de TDZ utilizadas (Figura 4).

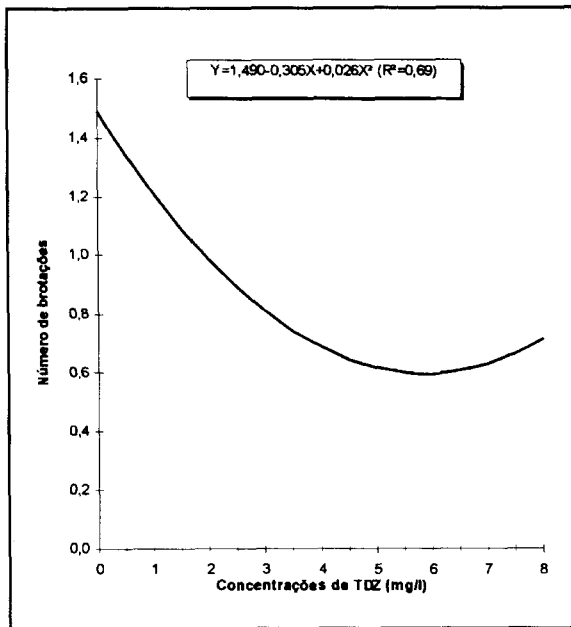


Figura 3 - Número de brotações de discos foliares de Kiwi em função das concentrações de Thidiazuron.

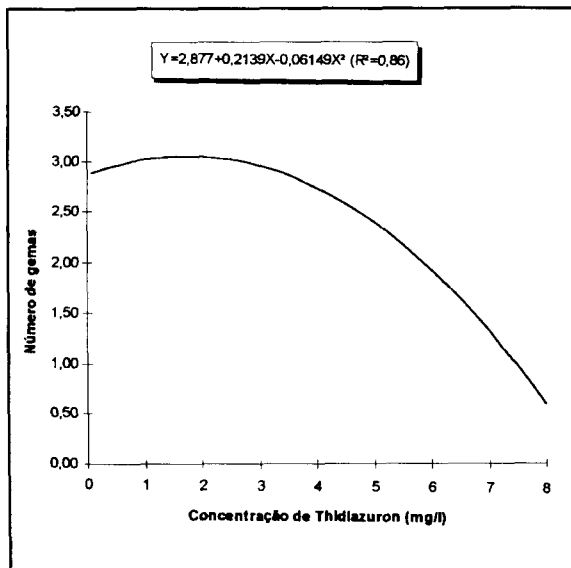


Figura 4 - Número de gemas de discos foliares de Kiwi em função das concentrações de Thidiazuron.

Foi verificado que o número máximo de gemas ocorreu com 1,74mg/l de TDZ. TAO & SUGIURA (1992) observaram que este regulador foi menos eficiente na formação de gemas adventícias de caquizeiro (*Japanese persimon*) que outros tipos de

citocininas. Constataram a formação de gemas apenas na concentração de 0,22mg/l de TDZ. Em petúnia ocorreu intensa proliferação de gemas na concentração de  $10^{-6}$   $\mu$ M. No entanto, quando esta foi elevada para  $10^{-4}$  à  $10^{-3}$ , o TDZ mostrou-se fitotóxico (FELLMAN *et al.*, 1987).

## CONCLUSÕES

O Thidiazuron não é eficiente na formação de brotações adventícias de Kiwi. Concentrações altas (8 e 16mg/l) causam a morte de explantes de discos foliares. A intensidade de formação de calos aumenta com concentrações de até 2,2mg/l de Thidiazuron diminuindo a partir deste valor.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARNDT, F., RUSCH, R., STILLPIED, M.V. SN 49537, a new cotton defoliant. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v. 57, p. 599, 1976.
- ARYA, I.D., SARITA, *et al.* Rapid *in vitro* multiplication of silverbirch (*Betula pendula* Roth) through axillary bud culture. *Annals of Forestry*, Jabalpur, v. 3, n. 1, p. 65-71, 1995.
- CAPELLE, S.C., MOK, D.W.S., KIRCHNER, S.C., *et al.* Effects of thidiazuron on cytokinin autonomy and the metabolism of N<sup>6</sup> (Delta<sup>2</sup> -isopentenyl) [8-<sup>14</sup>C] adenosine in callus tissue of *Phaseolus lunatus* L. *Plant Physiology*, Bethesda, v. 73, p. 796-802, 1983.
- CHVOJKA, L., RESLOVA, J. High N-phenyl -N-1-2-3- Thidiazol-5-Ylurea activity in regulated organogenesis of garden plants. *Horticultural Abstracts*, Farnham Royal, v. 58, n. 2, p. 82, 1988.
- DECLERCK, V., KORBAN, S.S. Micropropagation of Mexican redbud, *Cercis canadensis* var. mexicana. *Journal of Horticultural Science*, Urbana, v. 71, v. 1, p. 49-55, 1996.
- EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisas de Fruteiras de Clima Temperado. Kiwi. In: *Relatório Técnico, 1980/90*, Pelotas, Embrapa, 1991. p. 41-44.
- FELLMAN, C.D., READ, P.E., MOSIER, M.A. Effect of thidiazuron and CPPU on meristem formation and shoot proliferation. *Plant Physiology*, Bethesda, v. 22, n. 6, p. 1197-1200, 1987.
- FORTES, G.R. de L., SANTOS FILHO, B.G., BONATO, *et al.* Obtenção de calos e brotações adventícias em tecido somático de Kiwi pré-condicionados em 2,4 D. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Cruz das Almas, v. 14, n. 1, p. 65-69, 1992a.
- FORTES, G.R. de L., ZECCA, A.G.D., NATCHIGAL, F.C., *et al.* Multiplicação *in vitro* de Kiwi, cv. Hayward. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Cruz das Almas, v. 14, n. 1, p. 71-75, 1992b.
- HANKE, V., ROHDE, A., GRAFE, C. Studies on regeneration from somatic tissue *in vitro*. I. Adventitious shoot formation on leaf explants in apple (*Malus domestica* Borkh). Dresden-Pillnitz, v. 56, n. 5, p. 214-220, 1991.

- HUETTEMAN, C.A., PREECE, J.E. Thidiazuron- a potent cytokinin woody plant tissue culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Carbondale, v. 33, n. 2, p. 105-119, 1993.
- LARKIN, P.J., SCOWCROFT, W.R. Somaclonal variation a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. **Theoretical Applied Genetics**, New York, v. 60, p. 197-214, 1981.
- LIN, C.H., WANG, R.J., JAUGH, G.Y. Enhancement of callus formation on grape single bud cuttings by thidiazuron. **Horticultural Abstracts**, Farnham Royal, v. 60, n. 2, p. 118, 1990.
- MARINO, G., BATTISTINI, S. Leaf callus growth shoot regeneration and somaclonal variation in *Actinidia deliciosa*, effect of medium pH. **Acta Horticulturae**, The Hague, n. 280, p. 37-44, 1990.
- MEYER, M.M.JR., KERNSH, R. Thidiazuron and in vitro shoot proliferation of *Celtis occidentalis* L. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF PLANT TISSUE AND CELL CULTURE, 6. Minneapolis; 1986, Minneapolis, University of Minnesota, 1986, p. 149.
- MOHAMED-YASSEEN, Y., SPLITTSTDESSER, W.E., LITZ, R.E. *In vitro* bulb formation and plant recovery from onion inflorescences. **HortScience**, Alexandria, v. 28, p. 1050-1052, 1993.
- MOK, C.M., MOK, D.W.S., TURNER, E. *et al.* Biological and biochemical effects of cytokinin - active phenylurea derivatives in tissue culture systems. **HortScience**, Alexandria, v. 22, n. 6, p. 1194-1197, 1987.
- MURASHIGE, T., SKOOG, F.I. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, p. 473-497, 1962.
- NEUMAN, M.C., PREECE, J.E., VAN-SAMBEEK, J.W., *et al.* Somatic embryogenesis and callus production from cotyledon explants of eastern black walnut. **Plant-Cell-Tissue and Organ Culture**, v. 32, n. 1, p. 9-18, 1993.
- NIEUWKERK, J.P.VAN, ZIMMERMAN, R.H., FORDHAM, I. Thidiazuron stimulation of apple shoot proliferation *in vitro*. **HortScience**, Alexandria, v. 21, n. 3, p. 516-518, 1986.
- OBEIDY, A.A., SMITH, M.A.L. Organogenesis from mature pecan cotyledons and embryogenic axes. **HortScience**, Alexandria, v. 28, n. 3, p. 213-215, 1993.
- OKUSE, I. Influences of the sexuality in flower stalk on the callus formation and growth in spinach (*Spinacia oleracea* L.). **Bulletin of the Faculty of Agriculture**, Hirosaki, n. 57, p. 55-62, 1994.
- PENCE, V.C., SOURUP, V.G. Plant regeneration from *Trillium* spp. *in vitro*. **HortScience**, Alexandria, v. 21, n. 5, p. 1211-1213, 1988.
- SCHUCK, E. Propagação de Quivi. **Agropecuária Catarinense**, Florianópolis, v. 5, n. 4, p. 138, 1992.
- SEELYE, J.F., BUTCHER, S.M. *In vitro* response of Actinidia leaf and callus tissue to thidiazuron. **New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science**, Wellington, v. 19, n. 4, p. 447-450, 1991.
- TAO, R., SUGIURA, A. Adventitious bud formation from callus cultures of *Japanese persimon*. **HortScience**, Alexandria, v. 27, n. 3, p. 259-261, 1992.
- THOMAS, C.J., KATTERMAN, F.R. Cytokinin activity induced by thidiazuron. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 81, p. 681-683, 1986.
- ZIMMERMAN, T.W., SCORZA, R. Benzyladenine and shortened light/dark cycles improve *in vitro* shoot proliferation of peach. **HortScience**, Alexandria, v. 29, n. 6, p. 698, 1994.