

OBTENÇÃO *IN VITRO* DE BRODOS DE *BEGONIA RIEGER* COM THIDIAZURON, CINETINA E ÁCIDO NAFTALENO ACÉTICO¹

PRODUCTION *IN VITRO* OF SHOOTS *BEGONIA RIEGER* BY THE USE OF THIDIAZURON, KINETIN AND NAPHTHALENEACETIC ACID

Juçara Terezinha Paranhos² Cinara de Lima Echart³
Elci Terezinha Henz Franco⁴

RESUMO

Com o objetivo de determinar um protocolo adequado à obtenção de brotos aéreos de *Begonia rieger*, cultivaram-se segmentos de pecíolos, discos foliares basais e distais, em meio MS completo, testando-se quatro combinações de ácido naftaleno acético (ANA) e cinetina (0,01 + 0,1; 0,05 + 0,5; 0,1 + 1,0; 0,2 + 2,0mg/l) e duas combinações de ANA e thidiazuron (TDZ) (0,01+0,1; 0,01+0,25mg/l). Os discos foliares basais mostraram-se mais eficientes na formação de brotos (60-80%) sem raízes, enquanto que os pecíolos foram mais eficientes na formação de brotos com raízes. Para os discos foliares distais o melhor tratamento foi de 0,1 e 1,0mg/l de ANA e cinetina. O uso de TDZ a 0,1mg/l teve maior eficiência na formação de brotos sem raízes (60%) para todos os

explantes estudados. O material tratado com o TDZ apresentou maior número de brotos aéreos do que com a cinetina. Quando associou-se 0,1 + 1,0mg/l de ANA e cinetina, os discos foliares distais formaram maior número (52/explante) de brotos. Na menor concentração de TDZ houve maior número de brotos, 80 e 90 por explante, nos discos foliares distais e basais, respectivamente. Nos pecíolos, a maior concentração de TDZ formou maior número de brotos. Em ambas concentrações de TDZ, as culturas permaneceram em ativo crescimento vegetativo, ao contrário das crescidas em meio com cinetina, cujos brotos oxidaram e morreram.

Palavras-chave: multiplicação *in vitro*, thidiazuron, ácido naftaleno acético, cinetina, *Begonia*.

¹Trabalho apresentado no I Encontro Brasileiro de Biotecnologia Vegetal, Brasília-DF. 1993.

²Engenheiro Agrônomo, Mestre, Bolsista da FAPERGS, Departamento de Biologia, Centro de Ciências Naturais e Exatas (CCNE), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), 97119-900, Santa Maria, RS, autor para correspondência.

³Aluno do Curso de Ciências Biológicas, Bolsista do PET/CAPES, Departamento de Biologia, CCNE, UFSM.

⁴Biólogo, Mestre, Professor do Departamento de Biologia, CCNE, UFSM.

SUMMARY

Petiole segments, basal and distal leaf disks were cultivated in MS medium to determine an adequate protocol to obtain shoots of *Begonia rieger*. The MS medium was used with four combinations of naphthaleneacetic acid (NAA) and kinetin, respectively: 0.01 + 0.1; 0.05 + 0.5; 0.1 + 1.0; 0.2 + 2.0mg/l, and in two combinations of NAA and thidiazuron (TDZ), respectively: 0.01 + 0.1 and 0.01 + 0.25mg/l. Basal leaf disks were more effective to form shoots (60 to 80%) without roots. However petiole segments were more effective to form rooted shoots. The concentration of 0.1mg/l of NAA plus 1.0mg/l of Kinetin was more effective to form shoots from distal leaf disks. The TDZ at smaller concentration was more effective to form shoots without roots (60%). It induced more shoots than kinetin. The distal leaf disks produced more shoots with 0.1mg/l of NAA and 1.0mg/l of kinetin. The smaller concentration of TDZ induced more shoots, 80 and 90%, respectively, for distal and basal leaf disks. For petiole segments the highest TDZ concentration induced more shoots. In both TDZ concentrations the explants remained in active vegetative growth, oposed as observed for kinetin.

Key words: multiplication *in vitro*, thidiazuron, naphthaleneacetic acid, kinetin, *Begonia*.

INTRODUÇÃO

O gênero *Begonia* engloba mais de 1300 espécies, entre as quais *Begonia rieger*, de grande valor comercial e ornamental pela sua beleza. Por ser híbrida, somente os métodos convencionais de propagação não são suficientes para atender a demanda de mudas.

A micropropagação *in vitro* é a aplicação mais concreta da cultura de tecidos e a que maiores resultados tem demonstrado. A sua utilização a nível comercial já é realidade em diversos países com destaque para os da Europa Ocidental e Estados Unidos.

Para FORTES et al. (1993) a micropropagação é eficiente para muitos genótipos, fornecendo material rejuvenecido e isento de contaminações. Segundo GRATTAPAGLIA & MACHADO (1990) o sucesso de um sistema de micropropagação depende do controle de diversas variáveis, tais como a composição do meio de cultura e os tipos de explantes utilizados.

Teoricamente, qualquer tecido pode ser utilizado como explante em vista da totipotência das células e tecidos vegetais. Conforme MANGAT & PELEKIS (1990), uma das possibilidades expressivas do caráter totipotente de células e tecidos de plantas é sua habilidade para regeneração via embriogênese e organogênese.

Várias substâncias reguladoras de crescimento têm sido utilizadas para obtenção de maior número de brotações. Sachs apud HANSEN et al. (1988) relaciona uma certa habilidade de regeneração da *Begonia* por ação de substâncias específicas. Dentre as citocininas, as mais usadas em cultura de tecidos são a cinetina e a benzil amino purina (BAP), sendo esta última mais eficiente na formação de brotos. Recentemente, um novo regulador de crescimento, o thidiazuron (N-fenil-N-1,2,3-thidiazol-5-y-uréia), produto químico registrado em 1976 como desfolhante específico do algodão (Arndt et al. apud FORTES et al., 1993) tem sido usado *in vitro* devido a sua alta atividade citocínica, resistência à degradação pelas oxidases e, também, estabilidade e ação biológica em menores concentrações do que as citocininas do tipo adenina. Essa substância tem sido usada na micropropagação clonal de espécies frutíferas (MENEGUCCI et al., 1993), olerícolas (INNECCO et al., 1993) e ornamentais (SATO et al., 1993; CARVALHO & PINTO, 1993).

O trabalho teve como objetivo determinar um protocolo para micropropagação da espécie *Begonia rieger*, associando a auxina ANA (ácido naftaleno acético) com as citocininas cinetina e thidiazuron (TDZ), bem como selecionar o explante mais adequado.

MATERIAL E MÉTODOS

Explantes de diferentes origens (discos foliares basais e distais e segmentos do pecíolo) foram retirados da planta matriz e desinfetados em solução de hipoclorito de sódio a 2% e duas gotas de detergente neutro por 100ml de solução, por 15 minutos. Após, foram lavados com água estéril por três vezes.

Os explantes, medindo aproximadamente 0,5 x 0,5cm, foram cultivados em meio básico completo de MURASHIGE & SKOOG (1962), contendo 100mg/l de inositol (Hakkaart & Versluijs, apud HANSEN et al., 1988); 30mg/l de sulfato de adenina; 30g/l de sacarose e solidificado com 6,0g/l de agar. Nesse meio testou-se quatro doses de ANA (0,01; 0,05; 0,1 e 0,2mg/l) associadas a quatro doses de cinetina (0,1;

0,5; 1,0 e 2,0mg/l), e 0,01mg/l de ANA associada a duas doses de TDZ (0,10 e 0,25mg/l). O pH do meio foi ajustado para $5,9 \pm 0,1$ com NaOH ou HCl 1N e autoclavado a 120°C, 1 atm. por 15 minutos.

Cada frasco, medindo em torno de 5,0 x 2,0cm, recebeu um explante e foi fechado com papel alumínio, constituindo-se na unidade experimental. Utilizou-se dez frascos por tratamento. As culturas foram colocadas em câmara de crescimento onde permaneceram no escuro até o aparecimento de mudanças morfológicas, quando então, foram submetidas a um fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 25°C, durante todo o cultivo. Avaliou-se a percentagem de respostas, através de observações visuais e o número de brotos com auxílio de lupa.

Os explantes que formaram brotos foram transferidos para meio de enraizamento, composto de meio básico, livre de reguladores de crescimento. As plantas enraizadas foram transferidas para vasos contendo substrato (solo, areia e vermiculita, em iguais proporções), previamente esterilizados em estufa a 105°C por 30 minutos, e colocados em casa de vegetação a uma temperatura de 20-25°C.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observou-se um índice relativamente baixo de contaminação por fungos, em média 12,5% (Tabela 1). Os discos foliares basais e distais cultivados nas menores concentrações de ANA e cinetina, 0,01 e 0,1mg/l respectivamente, apresentaram pouca ou nenhuma resposta *in vitro*, sendo as demais concentrações mais eficientes na formação de brotos (60-80%). Os discos foliares basais mostraram-se mais eficientes na formação de brotos e esta percentagem aumentou com as concentrações dos reguladores de crescimento, atingindo 80% com 0,2mg/l de ANA mais 2,0mg/l de cinetina. Para os discos foliares distais, a melhor concentração para regeneração de brotos foi de 0,1mg/l de ANA e de 1,0mg/l de cinetina, com formação de brotos em 70% dos explantes. Esses dois tipos de explantes não produziram raízes nos tratamentos estudados.

Tabela 1 - Percentagem das características dos explantes cultivados em meio MS completo com combinações de ANA e cinetina (mg/l). Santa Maria-RS.,1993.

TRATAMENTOS		CONTAMINAÇÃO SEM RESPOSTA	BROTOS	BROTOS + RAÍZ
		COM FUNGOS		
ANA + Cinetina				
Segmentos de pecíolos				
0,01	0,1	10	30	40
0,05	0,5	20	40	20
0,1	1,0	40	10	40
0,2	2,0	20	20	60
Discos foliares basais				
0,01	0,1	0	100	0
0,05	0,5	20	20	60
0,1	1,0	0	20	80
0,2	2,0	10	10	80
Discos foliares distais				
0,01	0,1	10	90	0
0,05	0,5	10	40	50
0,1	1,0	0	30	70
0,2	2,0	10	60	30

Para os segmentos de pecíolos, todas as concentrações mostraram-se relativamente eficientes na regeneração de brotos, bem como na produção de raízes. A formação de brotos foi maior nas concentrações extremas; 0,01-0,1 e 0,2-2,0mg/l de ANA e cinetina, respectivamente. Observou-se que a percentagem de brotos sem raízes, aumentou com os reguladores usados, atingindo o máximo de 60% de regeneração na maior concentração. Por outro lado, a formação de brotos com raízes foi maior na menor concentração, 40%, e esta percentagem diminuiu com o aumento das concentrações, sendo que na maior, não houve produção de raízes. Segundo METIVIER (1979) a interação auxina/citocinina é responsável pelo controle da morfogênese e a formação de tecidos e órgãos das plantas. A maior relação auxina/citocinina determina a formação de raízes, enquanto que a menor promove as brotações.

O uso do thidiazuron no meio de cultura, indiferente à origem dos explantes, mostrou ser mais eficiente na indução de brotos na menor concentração (0,1mg/l) onde 60% dos explantes regeneraram brotos (Tabela 2). Na concentração de 0,25mg/l, 30% dos discos foliares basais e 20% dos discos foliares distais

e segmentos do pecíolo formaram broto. Porém, nenhum tratamento com TDZ foi eficiente na formação de raízes. Isso era esperado, pois, na cultura de tecidos, essa substância é usada devido a sua alta atividade citocínica, tendo maior eficiência na indução de brotos (CHVOJKA & RESLOVA, 1987). SATO et al. (1993) avaliaram diversas concentrações de TDZ na indução de brotações de mini-gerbera e verificaram

Tabela 2 - Percentagem das características dos explantes cultivados em meio MS completo com duas combinações de ANA e thidiazuron (mg/l). Santa Maria-RS., 1993.

TRATAMENTOS		CONTAMINAÇÃO COM FUNGOS	SEM RESPOSTA	BROTOS	BROTOS +RAÍZ
ANA + TDZ					
Segmentos de pecíolos					
0,01	0,1	20	20	60	0
0,01	0,25	30	50	20	0
Discos foliares basais					
0,01	0,1	20	20	60	0
0,01	0,25	50	20	30	0
Discos foliares distais					
0,01	0,1	40	0	60	0
0,01	0,25	30	50	20	0

que 0,05mg/l foi mais eficiente e as dosagens mais elevadas apresentaram efeito tóxico.

O número de brotos formados foi maior com o uso do TDZ, para os três explantes estudados, do que cinetina (Tabela 3).

MENEGUCCI et al. (1993) avaliaram diversas concentrações de BAP e TDZ na micropropagação de três cultivares de bananeira e observaram diferenças nas respostas às citocininas para as cultivares estudadas. O maior número de brotos foi obtido em meio contendo TDZ para as cultivares Maçã e Mysore, enquanto que para a cultivar Prata Anã, foi com o BAP. MEYER & KERNSH (1986) ao compararem as citocininas TDZ e BAP (Benzil amino purina) demonstraram ser o TDZ cerca de mil vezes mais eficiente do que o BAP na indução de brotos em *Celtis occidentalis*. Em pimentão, INNECCO et al. (1993) observaram que o TDZ mostrou-se mais ativo que o BAP, dando maiores respostas morfogênicas em todas as concentrações

estudadas. Verificaram, também, que 0,15mg/l de TDZ e 4,0mg/l de BAP não diferiram, sendo o TDZ 25 vezes mais eficiente na indução de brotos que o BAP. Ao multiplicar *in vitro Heliconia* spp., CARVALHO & PINTO (1993) obtiveram maior número de brotações com nível menor de TDZ do que de BAP (0,025mg/l e 2,5mg/l, respectivamente). Entretanto, a conformação dos brotos foi prejudicada com o aumento do nível de TDZ para 0,5 e 1,0mg/l, acarretando formação de brotos de tamanho reduzido com folhas pequenas, algumas queimadas, com aspecto enrijecido (hiperhidricidade), contrastando com os diferentes níveis de BAP que produziu brotações mais alongadas e aparentemente mais vigorosas.

Os discos foliares basais e distais apresentaram número elevado de brotos aéreos na menor concentração de TDZ; 90 e 80 brotos/explante, respectivamente. Na maior concentração de TDZ formou-se menor número de brotos, sendo os discos foliares distais mais eficientes (60/explante). Entretanto, apesar dessa concentração ter formado menor número de brotos, verificou-se que estes eram maiores e mais definidos. FORTES et al. (1993) ao multiplicarem *in vitro Actinidia deliciosa* (Kiwi) observaram que concentrações altas de TDZ (8,0 e 16,0mg/l) induziram o maior número de brotações e folhas. Entretanto, a área foliar diminuiu com o aumento das concentrações.

Comparados com os demais explantes estudados, os segmentos de pecíolos apresentaram menor número de brotos (18 e 36 brotos por explante cultivado, respectivamente) nas concentrações de 0,1 e 0,25mg/l de TDZ. Nesse caso, a maior concentração induziu maior número de brotos.

Quando se associou 0,1 e 1,0mg/l de ANA e cinetina, os discos foliares distais apresentaram maior número de brotos (52/explante). O uso de ANA e cinetina nestas doses também induziu maior número de brotos para os demais explantes. Entretanto, nos discos foliares basais formou-se uma massa de brotos não definidos, impossibilitando a contagem. Os segmentos de pecíolos apresentaram menor número de brotos que os demais explantes, com exceção na menor concentração usada, onde formaram quatro brotos por explante cultivado, enquanto que os demais explantes não formaram brotos.

Em todos os explantes estudados, a partir de dois meses de subcultivos em fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 25°C, as culturas obtidas com o uso de ANA associado a cinetina apresentaram problemas

de oxidação, perda total da coloração verde e posterior morte dos brotos. Em ambas as concentrações de TDZ, as culturas permaneceram verdes e em ativo crescimento vegetativo, nas mesmas condições de cultivo. Isso demonstra a maior eficiência do TDZ na micropropagação. Segundo Mok et al. apud FORTES et al., (1993), o TDZ tem sido usado recentemente como regulador de crescimento, pois além da função citocínica, é também resistente à degradação pelas oxidases e estável e biologicamente ativo em baixas concentrações em relação às citocininas do tipo adenina.

Tabela 3 - Número de brotos formados por explante, cultivados em meio MS completo acrescido de reguladores de crescimento. Santa Maria-RS., 1993.

TRATAMENTOS mg/l	EXPLANTES		
	Seg. Pecíolo	Discos foliares	
		Basais	Distais
ANA + cinetina			
0,01	0,1	04	00
0,05	0,5	07	12
0,10	1,0	20	*
0,20	2,0	11*	29
ANA + TDZ			
0,01	0,10	18	90
0,01	0,25	36	40

* Massa foliar verde

** Folhas com pecíolos definidos.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à FAPERGS pelo apoio financeiro (Bolsa Recém-Mestre).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CARVALHO, D.G., PINTO, J.E.B.P. Multiplicação de *Heliconia* spp. *in vitro* através do uso de TDZ e BAP. In: ENCONTRO BRASILEIRO DE BIOTECNOLOGIA VEGETAL, 1993, Brasília, DF. **Resumos...** Brasília: REDBIO, 1993. p. 152.
- CHVOJKA, L., RESLOVA, J. High N - phenyl-N-1,2,3 - thiadiazol-5-ylurea activity in regulated organogenesis of garden plants. **Hort Abst**, v. 58, n. 2, p. 82, 1987.
- FORTES, G.R. de L., SANTOS FILHO, B.G., COFCEWIT, E.T. et al. Uso do regulador de crescimento Thidiazuron na multiplicação *in vitro* de Kiwi (*Actinidia deliciosa*) cv. Matua. **Rev Bras Fisiol Veg**, São Carlos, v. 5, n. 1, p. 101, 1993.
- GRATTAPAGLIA, D., MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C., CALDAS, L.S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP/EMBRAPA.CNPQ, 1990. p.99-169.
- HANSEN, C.E., KOPPERUD, C., HEIDE, O.M. Identity of cytokinin in *Begonia* leaves and their variation in relation to photoperiod and temperature. **Physiol Plant**, Copenhagen, v. 73, p. 387-391, 1988.
- INNECCO, R., PINTO, J.E.B.P., DECHAMPS, C. et al. Efeito comparativo do "TDZ e BAP" na regeneração de brotações e calos em pimentão (*Capsicum annuum* L.). **Rev Bras Fisiol Veg**, São Carlos, v. 5, n. 1, p. 100, 1993.
- MANGAT, B.S., PELEKIS, M.K. Changes in the starch content during organogenesis *in vitro* cultured *Begonia rex* stem explants. **Physiol Plant**, v. 79, p. 267-274, 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, 1986, Saint Paul. **Abstracts...** Saint Paul, 1986, p. 149.
- MENEGUCCI, J.L.P., PINTO, J.E.B.P., SILVA, C.R.R. Avaliação de um novo regulador de crescimento na micropropagação de cultivares de bananeira (*Musa* sp.). In: ENCONTRO BRASILEIRO DE BIOTECNOLOGIA VEGETAL, 1993, Brasília, DF. **Anais...** Brasília: REDBIO, 1993. p. 149.
- METIVIER, J.R. Citocininas. In: FERRI, M.G. **Fisiologia Vegetal**. São Paulo: EDUSP, 1979. v. 2, p. 93-127.
- MURASHIGE, T., SKOOG, F.I. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiol Plant**, v. 15, p. 473-492, 1962.
- SATO, A.Y., PINTO, J.E.B.P., MODESTO, H.S. et al. Avaliação de um novo regulador de crescimento na indução de brotações *in vitro* de mini-gerbera. **Rev Bras Fisiol Veg**, São Carlos, v. 5, n. 1, p. 99, 1993.