

# ABSORÇÃO, DISTRIBUIÇÃO E METABOLISMO DE 6-BENZILADENINA EM EXPLANTES DE *HYACINTHUS AMETHYSTINA* CV. ALBUS<sup>1</sup>

MARIO ANGELO VIDOR<sup>2</sup>, CÉSAR PÉREZ RUIZ<sup>3</sup>, BELÉN FERNÁNDEZ MUÑIZ<sup>4</sup> e MARIA LUZ CENTENO<sup>5</sup>

**RESUMO** - Com objetivo de estudar a absorção, distribuição e metabolismo de 6-benziladenina (BA) em *Hyacinthus amethystina* cv. Albus (jacinto pirenáico), utilizaram-se explantes de escamas de bulbos cultivados em meio MS, suplementado com 4,90  $\mu\text{M}$  de AIB e 22,19  $\mu\text{M}$  de BA. Os explantes foram cultivados em duas posições quanto à sua polaridade: dorsal e ventral. No momento de tomar as amostras, cada explante foi dividido em duas partes: basal e apical. Os explantes foram cultivados em presença de 8-(<sup>14</sup>C)-BA com atividade específica de 2,0 GBq/mmol, adicionado ao meio em tal proporção que cada recipiente de cultivo tivesse uma atividade de 940 KBq. As amostras para análise foram tomadas 1, 12, 36 e 72 horas de cultivo. Em jacinto pirenáico existe relação direta entre a distribuição de BA e o desenvolvimento dos explantes. A maior parte de BA foi absorvida nas primeiras 36 horas de cultivo e, embora se produza mais na zona de contato do explante com o meio, a BA absorvida é transportada a distintas partes do explante, e isto varia com a polaridade de cultivo. Houve relação direta entre a posição de cultivo do explante, o metabolismo do regulador, o conteúdo de supostas formas ativas de BA e as respostas morfológicas.

Termos para indexação: 6-benziladenina, HPLC, polaridade de cultivo.

## ABSORPTION, TRANSPORT AND METABOLISM OF 6-BENZILADENINE IN *HYACINTHUS AMETHYSTINA* CV. ALBUS EXPLANTS

**ABSTRACT** - Bulb scale explants of *Hyacinthus amethystina* cv. Albus (pirenaic hyacinth), cultivated in medium MS, supplemented with 4.90  $\mu\text{M}$  and 22.19  $\mu\text{M}$  of 6-Benziladenine (BA) of IBA were utilized in order to study the absorption, distribution and metabolism of BA. The explants were cultivated in two different positions in relation to their polarity: dorsal and ventral. Also, each explant sample was divided in two parts: basal and apical. The explants were cultivated in the presence of 8-(<sup>14</sup>C)-BA with specific activity of 2.0 GBq/mmol, which was added to the medium in quantity so that each growing recipient had an activity of 940 KBq. The samples for analysis were cultivated during a period 1, 12, 36 and 72 hours. A positive relationship between BA distribution and explant growth in pirenaic hyacinth was found. Most of the BA was absorbed during the first 36 hours of cultivation and, although there was higher growth in the explant to medium contact zone, the absorbed BA was transported to distinct explant parts, which varies with the polarity of the cultivation. There was a positive relationship between the position of the growing explant, the growing regulator metabolism, the content of considered active forms of BA and the morphogenic responses.

Index terms: 6-benziladenine, HPLC, cultivation polarity.

## INTRODUÇÃO

As respostas morfológicas de tecidos cultivados *in vitro* dependem tanto de fatores intrínsecos aos mesmos, como a idade ou a origem do explante, como dos reguladores aplicados ao meio de cultivo (Blakesley & Constantine, 1992). Van der Krieken et al. (1988) afirmam que a regeneração de órgãos a partir de pequenos explantes possibilita estudar, de forma isolada, os processos de diferenciação morfológica. A aplicação exógena de reguladores de

<sup>1</sup> Aceito para publicação em 22 de setembro de 1997.

<sup>2</sup> Eng. Agr., Dr., EPAGRI, Estação Experimental de Lages, Caixa Postal 181, CEP 88502-970 Lages, SC. E-mail: vidor@epagri.rct-sc.br

<sup>3</sup> Biólogo, Dr., Prof. Titular, Dep. de Biología Vegetal, Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos, Universidad Politécnica de Madrid, Ciudad Universitaria, s/nº 28040 - Madrid, Espanha. E-mail: cesarperez@bio.etsia.upm.es

<sup>4</sup> Biólogo, Dr., Prof. Titular, Dep. de Biología de Organismos y Sistemas, Faculdade de Biología, Universidade de Oviedo, Oviedo, Espanha. E-mail: bmferran@sci.cpd.uniovi.es

<sup>5</sup> Bióloga, Drª, Bolsista do Dep. de Biología de Organismos y Sistemas, Faculdade de Biología da Universidade de Oviedo.

crescimento vegetal determina, em geral, a direção de tais respostas. Entre as citocininas, a BA (6-benziladenina) é a mais utilizada no cultivo de tecidos, posto que, em geral, induz maiores taxas de proliferação que outras, como a zeatina ou cinetina (Marino & Bertazza, 1990). No presente trabalho, os explantes de jacinto eram oriundos de escamas, e portanto, não apresentavam raízes – que são o principal lugar de síntese de citocininas – (Van Staden & Mallett, 1988; Van Staden & Bayley, 1990), pelo que não é de estranhar que o crescimento de gemas laterais, brotos e bulbilhos requeresse a aplicação de citocininas exógenas (Bach, 1992) e que as respostas obtidas dependessem, direta ou indiretamente, das citocininas.

Geralmente, o crescimento e a produção de respostas morfogênicas de explantes cultivados *in vitro* em presença de reguladores, se descrevem em relação à concentração destes no meio de cultivo. Segundo Vankova et al. (1991), está claro que as respostas obtidas no cultivo *in vitro* estão relacionadas com os reguladores de crescimento aplicados exogenamente. Contudo, não está claro se as citocininas exógenas atuam *per se* sobre os processos morfogênicos, ou se sua ação está mediada por citocininas endógenas. As respostas aos reguladores aplicados, e, concretamente, a BA, são o resultado de numerosos processos bioquímicos que incluem sua absorção, transporte e metabolismo (Auer et al., 1992) e que determinam o conteúdo do regulador em forma ativa nos tecidos.

Após sua absorção a partir do meio de cultivo, a citocinina sofre uma série de transformações metabólicas que conduzem à formação de compostos com atividade hormonal diferente, e seu metabolismo costuma variar em função das condições de cultivo e da concentração do hormônio aplicado (Van der Krieken et al., 1988), dentro, inclusive, do mesmo tipo de explante. Por isso, considerou-se oportuno realizar o estudo de alguns dos fatores que afetam a concentração de BA nos explantes e, deste modo, conhecer mais sobre o controle que ela exerce no comportamento *in vitro* dos explantes.

Por outro lado, Trewavas (1979) afirma que a ação hormonal sobre a indução da divisão celular e dos processos morfogênicos, começa já nos primeiros 30 minutos depois da aplicação dos regula-

dores, e por isso os experimentos se realizaram em períodos de cultivo curtos.

O objetivo deste trabalho foi o de estudar a absorção, distribuição e metabolismo de 6-benziladenina (BA) em *Hyacinthus amethystina* cv. Albus (jacinto pirenáico).

## MATERIALE MÉTODOS

Como material vegetal, foram utilizados explantes de escamas de bulbos de *H. amethystina*. As escamas foram cultivadas em meio MS suplementado com sacarose a 5%, 4,90 mM de AIB (ácido indolbutírico) e 22,19 mM de BA. O meio foi solidificado com 8 g/L de ágar (DifcoBacto Ágar). O pH foi ajustado em  $5,7 \pm 0,1$ , e as condições da câmara de cultivo foram de 16 horas de fotoperíodo e 25°C de temperatura, tendo como fonte de iluminação tubos fluorescentes de luz fria (GTE internacional), que oferecem uma densidade de fluxo de fótons de 50 mol/m<sup>2</sup>.s.

De acordo com a parte do explante que estava em contato com o meio no cultivo, chamou-se: posição ou polaridade dorsal, quando o lado dorsal da escama (explante) estava em contato com o gel; posição ou polaridade ventral, quando o lado ventral estava em contato com o gel. Ademais, dividiu-se cada explante em partes basal (parte inferior em contato com o meio) e apical (parte superior). As análises de absorção e metabolismo de BA foram feitas em todos os tipos de materiais.

Em cada recipiente de cultivo foram colocados 20 mL de meio de cultivo e quatro explantes; os experimentos se fizeram em duplicado.

Para poder determinar a absorção e metabolismo de BA, os explantes foram cultivados em presença de 8-(<sup>14</sup>C)-BA com atividade específica de 2,0 GBq/mmol (Amersham International), que foi adicionada ao meio em proporção tal que a atividade em cada recipiente de cultivo era de 940 KBq (Auer et al., 1992). Para alcançar a concentração final de 7,76 mM foi adicionada BA sem marcar. As amostras para análise foram tomadas a 1, 12, 36 e 72 horas de cultivo.

Imediatamente depois de recolhido, o material vegetal foi congelado por imersão em N líquido, pulverizado e liofilizado. O processo de extração foi realizado segundo o método desenvolvido por Horgan & Scott (1987). Para a extração foram utilizados os solventes descritos por Bielecki (1964), para evitar a degradação das formas nucleotídicas. O tecido (100 mg de peso seco em pó) foi extraído durante 18 horas, a -20°C, utilizando como solvente 10 mL da formulação metanol:clorofórmio:ácido fórmico:água (Bielecki I) na proporção 60:25:5:10 (v/v).

Em seguida, foi filtrado através de placa porosa e filtro de fibra de vidro (Watman GF/A, = 3,7 cm), e foi reextraído com 10 mL a mais da formulação metanol:ácido fórmico:água (Bielecki II) na proporção 60:10:40 (v/v), durante quatro horas, a -20°C, filtrando-se novamente e lavando-se com 5 mL do último solvente.

De ambos os filtrados combinados, foram tomadas amostras para fazer a curva de absorção de BA (três amostras de cada tratamento). Cada amostra de 1 mL foi secada em rotavapor a vácuo, a 35°C, redissolvida em 0,5 mL de água mili-Q e 1,5 mL de líquido de centelha (Pico Água, Packard), medindo-se posteriormente a radioatividade em um contador Packard 2500 TR para obter a curva de absorção, avaliando a quantidade de 8-[<sup>14</sup>C] BA absorvida pelas amostras. O resto do extrato (22 mL) foi secado em rotavapor (vácuo a 35°C).

O resíduo seco foi redissolvido em 20 mL de água a pH 3 (com ácido acético diluído) e foi aplicado a uma coluna de celulose-fosfato em forma NH<sub>4</sub><sup>+</sup> equilibrada no mesmo pH. O volume de empacotamento da coluna foi de 3 mL. Como a densidade de empacotamento da celulose era de aproximadamente 0,2 g.p.s.mL<sup>-1</sup>, se utilizou 0,6 g de celulose-fosfato por coluna. A hidratação da celulose foi feita com hidróxido de sódio (NaOH) 0,5 N durante 5 minutos, foi decantado o sobrenadante e lavado com água destilada (aproximadamente quatro lavadas de 5 minutos cada um), até conseguir um pH menor ou igual a 11. Em seguida foi adicionado ácido clorídrico (HCl) 0,5 N e repetido o mesmo procedimento até obter-se um pH próximo a 3. Como colunas, foram utilizadas seringas de 5 mL e empacotaram-se até o volume desejado (3 mL).

A lavagem e equilíbrio das colunas foi feito como se descreve a seguir: lavado com água destilada até que os eluídos estivessem livres de Cl. Para comprová-lo, fez-se o teste do nitrato de prata (AgNO<sub>3</sub>). Foi aplicado AgNO<sub>3</sub> e uma gota de ácido nítrico (HNO<sub>3</sub>); a aparição de um precipitado branco significava que ainda havia cloro; a coluna foi equilibrada com água acidificada a pH 3 com ácido acético diluído; para que não se diluisse a amostra, eliminou-se a água da coluna até que o menisco coincidiu com a celulose.

A amostra foi redissolvida em 3 mL de água a pH 3 (ajustado com ácido acético diluído) e aplicada com pipeta Pasteur cuidadosamente à coluna, não recolhendo as primeiras gotas. Logo foram adicionados à coluna (pouco a pouco e com uma pipeta Pasteur) cinco volumes de água a pH 3 (15 mL), deixando que o solvente passasse gota a gota, e recolhendo-se o eluente. Este lavado ácido continha os nucleotídeos. Em seguida, foi levado com cinco volumes de hidróxido de amônio 2 M, e da mesma forma foram eluídos os compostos catiônicos. Este lavado básico con-

tinha os nucleosídeos e bases livres. Ambas as frações (ácida e básica) foram evaporadas em alta velocidade e a vácuo (Savant SC-200).

O processado das frações ácida e básica foi realizado da seguinte maneira: a fração ácida contendo os nucleotídeos foi redissolvida em 5 mL de água destilada com ácido acético em proporção de 994:6 (v/v) (Van Staden & Bayley, 1991), e foram tomadas duas alíquotas de 100 mL, para determinar a radioatividade. Em seguida, a amostra foi aplicada a colunas Sep-Pak C<sub>18</sub>, previamente equilibradas com 5 mL de metanol, duas vezes, e 5 mL de água a pH 3, duas vezes. Uma vez aplicada a amostra, foram feitas três lavadas com 5 mL de água ácida a pH 3. Os nucleosídeos de citocinina retidos na coluna foram recuperados com metanol a 50% (v/v) em água, para o que se lavou duas vezes com 5 mL (Van Staden & Bayley, 1991); a fração básica (nucleosídeos e bases livres) foi processada da mesma maneira, mas utilizando-se 5 mL de água de mili-Q, e os compostos retidos na coluna foram eluídos com 5 mL de metanol puro, por duas vezes (Horgan & Scott, 1987).

Os eluídos foram secados em alta velocidade e a vácuo (Savant SC-200) e redissolvidos em solvente de partida, para cromatografia líquida de alta resolução (HPLC): metanol:ácido acético 0,2 M a pH 3,5 com trietilamina (TEA) (5% v/v), para fração ácida ou nucleotídica; acetonitrilo:água a pH 7 com trietilamina bicarbonato (TEAB) (5% v/v), para fração básica ou nucleosídica.

A separação, identificação e quantificação foi feita em um cromatógrafo líquido Waters modelo 600, acoplado a um detector Waters 996 de diodos, e outro, de radioatividade (LB 507 B de Berthold), mediante HPLC. O processo cromatográfico foi controlado pelo programa Millennium 2010- Chromatography Manager de propriedade de Millipore Corporation.

As amostras foram redissolvidas nos respectivos solventes de partida, num cromatógrafo. Na coluna, incluíram-se 200 µL de cada amostra previamente filtrada (Anatop-Plus de 0,2 µm). Os dados referentes à absorção de luz a 270 nm dos compostos eluídos foram recolhidos em cromatogramas, e os que refletem a radioatividade emitida pelo metabólito de BA, em radiogramas.

A separação cromatográfica dos nucleotídeos de BA (metabólitos mais polares) foi feita utilizando-se um gradiente de 5% a 45% de metanol em água de mili-Q com ácido acético 0,2 M, e ajustado seu pH a 3,5 com TEA (v/v); a duração do processo foi de 42 minutos. Depois de um isocrático no primeiro minuto de 5% de metanol, seguiu-se um gradiente linear durante 30 minutos, até 45% de metanol, seguido de outro isocrático de 1 minuto, e retorno às condições iniciais em dez minutos. O fluxo foi de 1 mL/minuto, e a coluna de fase reversa Spherisorb ODS-2,

com partículas de 5  $\mu\text{m}$  e de 15 x 0,46 cm de dimensões. A absorbância foi medida a 270 nm, e os solventes foram filtrados antes de sua utilização.

BA e seus metabólitos foram identificados por coelusão com padrões puros e por seu espectro de absorção em UV. Sua quantificação foi realizada a partir das porcentagens de área dos picos radioativos que apareciam nos radiogramas, com respeito ao total de radioatividade na fração correspondente (ácida ou básica).

A identificação se fez por comparação dos tempos de retenção com os do padrão puro autêntico 5'-monofosfato de BA ([9R-5'P]BA), e por seus espectros de absorção sobre luz UV.

A quantificação se fez a partir dos radiogramas obtidos de cada amostra.

A cromatografia relativa aos nucleosídeos e bases livres (metabólitos menos polares - glucosídeos e ribosídeos de BA) se desenvolveu utilizando-se um gradiente de 5% a 20% de acetonitrilo em água de mili-Q ajustada a pH 7 com TEAB 10% (v/v). A duração do processo foi de 39 minutos. Depois de um isocrático, no primeiro minuto de 5% de acetonitrilo, continuou-se com um gradiente linear durante 28 minutos, até 20% de acetonitrilo, seguido de outro isocrático de 5 minutos, e retorno às condições iniciais em 5 minutos. O fluxo foi de 1,5 mL/minuto, e a coluna de fase reversa Spherisorb ODS-2, com partículas de 5  $\mu\text{m}$  e de 15 x 0,46 cm de dimensões. A absorbância foi medida a 270 nm, e os solventes foram filtrados antes de sua utilização.

A identificação se fez por comparação dos tempos de retenção com os de padrões de BA, 7- $\beta$ -D-glucopiranosil BA ([7G]BA), 9- $\beta$ -D-glucopiranosil BA ([9G]BA), e 9- $\beta$ -D-ribofuranosil BA ([9R]BA).

A quantificação se fez a partir dos correspondentes radiogramas obtidos para cada amostra.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A resposta *in vitro* de explantes de jacinto com seu subsequente desenvolvimento morfo-fisiológico pode ser determinada, pela posição destes explantes no meio de cultivo. Neste trabalho, os tecidos mostraram absorção e distribuição de BA diferentes, dependendo de os explantes terem sido cultivados em posição ventral ou dorsal, tal como mostra a Fig. 1, onde está representada a cinética de absorção de BA durante as primeiras 72 horas de cultivo.

Os tecidos absorveram elevadas quantidades de BA do meio, desde a primeira hora e até a 36ª hora de

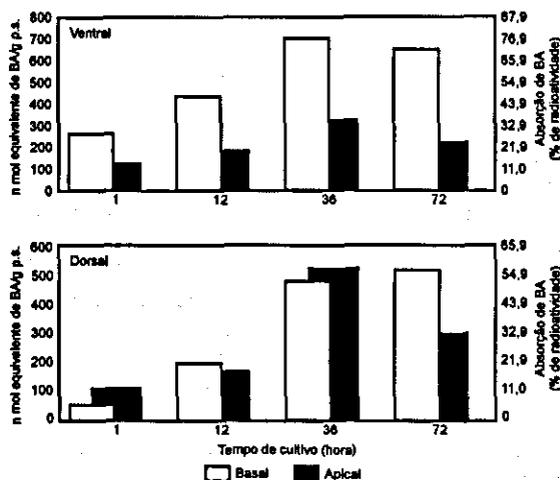


FIG. 1. Absorção de 6-benziladenina (BA) pelos explantes de *H. amethystina*, durante as 72 primeiras horas de cultivo, avaliados em duas posições (ventral e dorsal) e em duas partes (basal e apical) do explante. Cada valor é média de seis dados.

cultivo (Fig. 1); a partir desse momento, a absorção permaneceu estável (porção basal dos explantes em posição dorsal) ou diminuiu (resto dos materiais). Ainda que a absorção se produza mais na zona de contato do explante com o meio, a BA absorvida é transportada a distintas partes do explante, e isto varia com a polaridade de cultivo. Neste sentido, o transporte foi menos efetivo quando o explante foi cultivado em posição dorsal. A rápida absorção de BA está de acordo com os resultados obtidos por Lampugnani et al. (1981) e Minocha & Nissen (1982) em explantes de *Citrillus vulgaris* e *Helianthus tuberosus*, respectivamente.

A absorção de BA foi muito mais rápida quando os tecidos foram cultivados em posição ventral, dado que em explantes completos (porção apical + porção basal) se detectaram 400 e 600 nmol de equivalentes de BA (BA + possíveis metabólitos) a 1 hora e 12 horas, respectivamente, enquanto que nos cultivados em posição dorsal, estas quantidades, referentes aos mesmos tempos de cultivo, foram de, aproximadamente, 150 e 360 nmol de equivalentes de BA (Fig. 1). Não obstante, tanto a quantidade máxima de BA absorvida, próxima a 1000 nmol de equivalentes de BA/explante, como o momento em que os tecidos

alcançaram este máximo (36 horas), foram independentes da posição de cultivo.

A radioatividade detectada na porção apical dos explantes de jacinto procede do transporte dos nmol de equivalentes de BA absorvida pela porção basal, em contato com o meio de cultivo. O fato de que explantes cultivados em posição dorsal mostrassem distribuição da radioatividade mais homogênea entre as posições basal e apical do que os cultivados em posição ventral (Fig. 1), sugere que este transporte foi mais efetivo nos primeiros; o resultado final é que as partes mais internas dos bulbos (apical em posição ventral e basal em posição dorsal) mostraram sempre altas concentrações de equivalentes de BA, independentemente de sua posição na superfície do meio de cultivo.

Assim, a velocidade de absorção de BA, e, portanto, o conteúdo endógeno em nmol de equivalentes de BA durante as primeiras horas de cultivo, foram maiores em explantes cultivados em posição ventral, coincidindo com uma maior capacidade para formar calo, brotos e bulbilhos, ao passo que o cultivo em posição dorsal deu lugar a uma distribuição mais homogênea do regulador nos tecidos.

A BA absorvida pelos explantes de jacinto foi rapidamente metabolizada, de modo que, já a partir de uma hora de cultivo, entre 60 e 80% da radioatividade detectada nos tecidos, se apresentou em forma de nucleotídeos de BA (fração ácida) (Fig. 2).

Em todos os materiais e tempos de análises, a maior parte da radioatividade foi encontrada precisamente na fração ácida, aquela que contém os nucleotídeos de BA (Fig. 2). Devido à impermeabilidade que apresenta a membrana celular frente a estes metabólitos, supõe-se que a BA é transportada como tal até o interior das células, onde o regulador pode ser compartimentado como nucleotídeo e/ou metabolizado (Letham & Palni, 1983; Burch & Struchbury, 1986, 1987). Nas células, os nucleotídeos poderiam liberar de novo [9R]BA, e BA que, por sua vez, podem permanecer como tais ou serem glucosilados (Kamineck, 1992). Se os glucosídeos formados são 3, 7 ou 9 N glucosídeos de BA, então BA ou [9R]BA são inativados, já que os N-glucosídeos são formas de detoxificação, armazenamento ou inativação do regulador (Van Staden & Drewes, 1992). Por outro lado, se se formam O-glucosídeos, [9R]BA e BA podem ser de

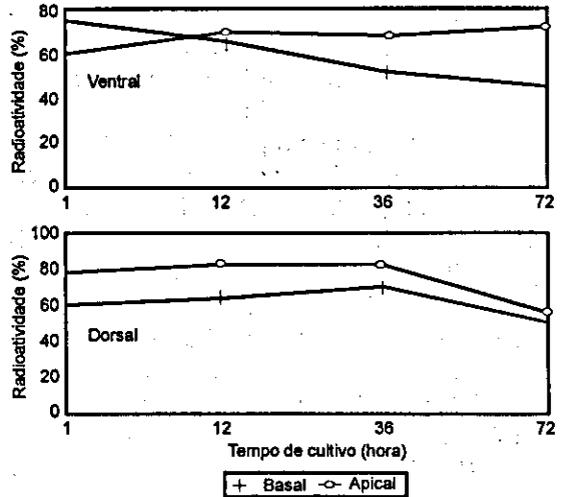


FIG. 2. Distribuição da radioatividade (%) na fração ácida em explantes de *H. amethystina*, durante as 72 primeiras horas de cultivo, avaliada em duas posições (ventral e dorsal) e em duas partes (basal e apical). Cada valor é média de três dados.

novo liberados, posto que estes compostos são formas de reserva hidrolizáveis (Letham & Palni, 1983).

Portanto, pode-se considerar que os nucleotídeos de BA são compostos-chaves e iniciais no metabolismo celular de BA, o que está de acordo com Letham & Palni (1983), Ernst & Oesterhelt (1985), Palni et al. (1987) e Van Staden & Drewes (1992). Isto explicaria por que estes compostos foram os mais rapidamente formados e abundantes em explantes de jacinto.

Comparando as Figs. 1 e 2, deduz-se uma relação proporcional entre a velocidade do metabolismo de BA nos tecidos e a velocidade de absorção do regulador, ou quantidade de nmol de equivalentes de BA nos tecidos, por unidade de tempo. Assim, se a rota metabólica de BA em explantes de jacinto é a proposta por Kamineck (1992): BA absorvida → nucleotídeos de BA (interior das células) → BA, [9R]BA e outros metabólitos detectados na fração básica, está claro que esta via atuou mais rapidamente na porção basal dos explantes cultivados em posição ventral que em qualquer outro tipo de material, de acordo com uma maior velocidade de absorção de BA (Fig. 1). Assim, neste tecido, a proporção de nucleotídeos, em relação ao total dos

metabólitos detectados na amostra (Fig. 2), já descendeu desde a primeira hora de cultivo e, o descenso nas seguintes horas foi mais intenso que nos restantes materiais com absorções menores.

Neste sentido, as duas porções (apical e basal) de explantes cultivados em posição dorsal, que apresentaram evolução da absorção de BA similar até às 36 horas de cultivo (Fig. 1), também mostraram variação similar na quantidade de radioatividade detectada na fração ácida (Fig. 2), e além disso, esta não começou a descender até passadas 36 horas.

Por último, também a porção apical dos explantes em posição ventral, que mostrou menores absorções de BA que os demais materiais relativos a todos os tempos (Fig. 1), apresentou um atraso metabólico em relação a estes materiais, e a proporção de nucleotídeos de BA não descendeu durante todo o período de estudo (Fig. 2).

Quanto à análise dos metabólitos de BA detectados na fração ácida, assim como os encontrados na fração básica, levou-se a cabo, mediante HPLC, detecção de compostos com um espectro de absorção de luz ultravioleta similar ao de citocininas-padrão e medida da radioatividade de tais compostos em um contador de centelhas.

Nos radiogramas correspondentes à fração ácida ou nucleotídica das amostras de jacinto pirenáico, detectaram-se três picos, cujos tempos de retenção não coincidiram com nenhum dos padrões empregados, pelo que os denominamos nucleotídeos A, B e C de BA. Provavelmente, trata-se do mono-, di- e trifosfato de [9R]BA, respectivamente; esta é a ordem crescente de seus tempos de retenção na coluna cromatográfica. Isto pode ser apoiado pelo trabalho de Van der Krieken et al. (1988) com capas de células de mesófilo de fumo, dado que os autores obtiveram estas mesmas três formas de nucleotídeos de BA, ainda que com tempos de retenção algo menores que os observados neste trabalho, e que posteriormente identificaram após hidrólise enzimática com apirase e fosfatase alcalina.

Na Fig. 3 é mostrada a distribuição da radioatividade detectada na fração ácida entre os compostos A, B e C, em explantes de jacinto pirenáico durante as primeiras 72 horas de cultivo. Em todos os materiais analisados, o nucleotídeo B de BA (provavel-

mente o difosfato de [9R]BA) foi o composto mais abundante. Tanto Van Staden & Mallett (1988) como Bayley et al. (1989), trabalhando com tomate, detectaram, como principal metabólito de BA, um composto cujo tempo de retenção não coincidia com o de nenhum dos padrões utilizados.

O difosfato de BA foi o único composto detectado na porção basal dos explantes cultivados em posição ventral, ao passo que na porção apical se encontraram, ainda, o monofosfato, às 36 e 72 horas de cultivo, e o trifosfato, às 72 horas (Fig. 3). Em tecidos cultivados na posição dorsal, apareceram, além do difosfato em todas as amostras, o monofosfato de BA às 72 horas na porção apical e o trifosfato às 36 horas nesta mesma porção e às 72 horas na basal.

Provavelmente, o fato de que na porção basal dos explantes cultivados em posição ventral não se detectaram outros nucleotídeos diferentes do mais representativo nas amostras, ou seja, o difosfato de BA, deveu-se ao metabolismo mais rápido apresentado por esta porção em relação ao resto dos materiais.

Assim, parece que nos explantes de jacinto pirenáico não só a velocidade com que se metaboliza a BA nos tecidos, mas também o número e tipo de metabólitos formados, dependem da quantidade de BA absorvida, e, portanto, dos nmol equivalentes de BA nesses tecidos.

Nas amostras analisadas só foram encontradas BA e [9R]BA como derivados da citocinina, de modo que, nas primeiras 36 horas de cultivo, a maior parte da radioatividade esteve associada à BA e, a partir desse momento, também a seu 9-ribosídeo, aumentando a proporção deste último às 72 horas.

Assim, a BA, além de transformar-se em nucleotídeos, foi ribosilada nos explantes de jacinto pirenáico. O ribosídeo de BA é considerado uma forma ativa de BA, associada a seu transporte e/ou reserva (Latham & Palni, 1983; Bayley et al., 1989). A ribosilação também se descreveu como uma das principais vias de metabolização em explantes de *Lachenlia* (Niederwieser et al., 1992) e *Lycopersicon esculentum* (Forsyth & Van Staden, 1988; Van Staden & Bayley, 1991).

A ausência de glucosídeos de BA nas amostras, que deveriam detectar-se na fração básica, indica que toda a BA que penetra nos tecidos permanece como

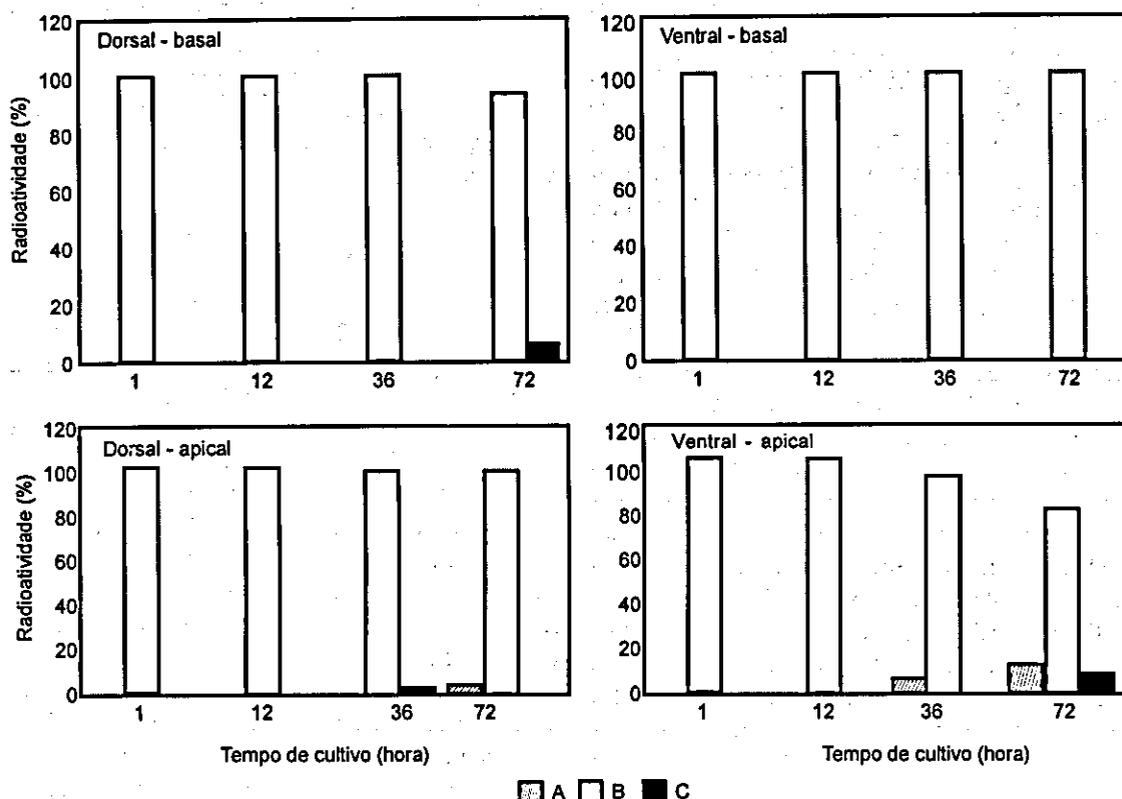


FIG. 3. Distribuição da radioatividade (%) avaliada na fração ácida entre os distintos metabólitos de 6-benziladenina (A, B e C, respectivamente, mono-, di- e tri-fosfato de [9R]BA), recolhidos nesta fração, em explantes de *H. amethystina*, durante as 72 primeiras horas de cultivo, avaliada em duas posições (dorsal e ventral) e em duas partes do explante (basal e apical). Cada valor é média de três dados.

tal composto livre, ou como formas de reserva que podem hidrolisar-se para liberar BA ou interconverter-se umas em outras. Isto, possivelmente, tem forte implicação na atividade do regulador nos tecidos e, portanto, nas respostas morfogênicas.

Em geral, os glucosídeos de BA aparecem de forma tardia nos tecidos, do mesmo modo que a adenina, originada a partir da degradação oxidativa do regulador, pois trata-se de compostos terminais no metabolismo de BA. O fato de que estes derivados de BA não apareçam nos explantes de jacinto durante todo o período de estudo (72 horas), junto com a lenta diminuição da porcentagem de nucleotídeos de BA observada neles, implica que tais tecidos apresentaram metabolismo lento do regulador em relação ao

apresentado por outras espécies. Neste sentido, Van Staden & Mallett (1988), Bayley et al. (1989) e Van Staden & Bayley (1991) demonstraram que o metabolismo de BA varia entre diferentes espécies, entre distintos órgãos de uma planta, e entre explantes de diferentes idades.

Pode-se dizer que em explantes de jacinto pirenáico há relação direta entre: posição de cultivo do explante, quantidade de BA absorvida, metabolismo do regulador, conteúdo em supostas formas ativas de BA (BA e [9R]BA) e respostas morfogênicas. Assim, a posição ventral de cultivo, em relação à dorsal, dá lugar a que os explantes apresentem maior número de respostas. Esta posição também determina maior absorção de BA durante as primeiras 12-24 horas de

cultivo (Fig. 1). Além disso, a proporção média de metabólitos encontrados na fração básica, aquela que inclui BA e [9R]BA, foi similar em explantes de posição ventral e dorsal durante essas mesmas horas de cultivo, mas maior às 36 horas nos primeiros (34%) que nos segundos (20%) (Fig. 4). Portanto, o conteúdo em formas ativas de BA (BA e [9R]BA) foi maior durante as primeiras 36 horas de cultivo naqueles explantes que mais responderam. Em função da polaridade do explante em cultivo, a BA atuará de forma diferente, pois acederá também de forma diferente ao tecido, posto que as citocininas são compostos com mobilidade limitada, salvo via floema e xilema. Considerando um bulbo completo, a parte interna da escama que serve de explante é a que contém maiores concentrações de BA. Contudo, as expressões morfogênicas se observam na parte do explante que não está em contato com o meio, independentemente da posição de cultivo.

Os resultados deste estudo e os de Vankova et al. (1991) e Diaz (1994) sugerem uma ação direta de BA sobre as respostas morfogênicas em explantes de jacinto pirenáico, dado que houve uma coincidência entre os conteúdos mais elevados em formas

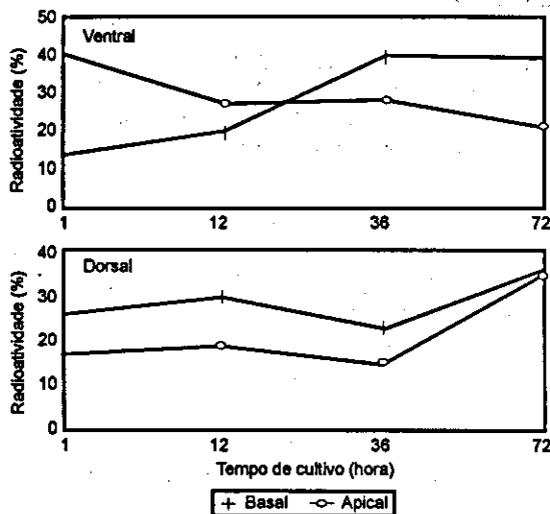


FIG. 4. Distribuição da radioatividade (%) na fração básica em explantes de *H. amethystina*, durante as 72 primeiras horas de cultivo, avaliada em duas posições (ventral e dorsal) e em duas partes (basal e apical). Cada valor é média de três dados.

ativas do regulador e a produção de respostas associadas à atividade da citocinina. A diferente distribuição que apresenta a BA nos explantes de jacinto poderia estar determinada por gradientes de concentração que costumam estabelecer-se entre meio e explante.

## CONCLUSÕES

1. Nas primeiras 36 horas de cultivo de explantes de jacinto pirenáico, absorve-se a maior parte da citocinina adicionada ao meio de cultivo.

2. Em tecidos de jacinto pirenáico existe relação direta entre a distribuição de BA e o desenvolvimento dos explantes.

3. A BA absorvida pelos explantes de jacinto pirenáico é rapidamente metabolizada e transformada em nucleotídeos de BA, o que indica que estes são compostos-chaves e iniciais no metabolismo celular de BA.

4. Existe relação proporcional entre a velocidade do metabolismo de BA nos tecidos de jacinto pirenáico e a velocidade de absorção do regulador.

5. Em explantes de jacinto pirenáico, a velocidade com que se metaboliza a BA nos tecidos e o número e tipo de metabólitos formados dependem da quantidade de BA absorvida.

6. A absorção de BA é muito mais rápida quando as escamas se cultivam em posição ventral.

7. A quantidade máxima de BA absorvida e o momento no qual os tecidos alcançam este máximo (36 horas) são independentes da posição de cultivo.

8. Em explantes de jacinto pirenáico existe relação entre posição de cultivo do explante, metabolismo do regulador, conteúdo em supostas formas ativas de BA (BA e [9R]BA), e respostas morfogênicas.

## REFERÊNCIAS

- AUER, C.A.; COHEN, J.D.; LALOUE, M.; COOKE, T.J. Comparison of benzyladenine metabolism in two *Petunia* hybrida lines differing in shoot organogenesis. *Plant Physiology*, v.98, p.1035-1041, 1992.

- BACH, A. Micropropagation of Hyacinths (*Hyacinthus orientalis* L.). In: BAJAJ, Y.P.S. (Ed.). *Biotechnology in Agriculture and Forestry, High-Tech and Micropropagation IV*. Berlin: Springer Verlag, 1992. v.20, p.144-159.
- BAYLEY, A.D.; VAN STADEN, J.; MALLETT, J.A.; DREWES, S.E. The *in vitro* metabolism of [8-<sup>14</sup>C] benzyladenine by excised organs of tomato plants. *Plant Growth Regulation*, v.8, p.193-204, 1989.
- BIELESKI, W.J. The problem of halting enzyme action when extracting plant tissues. *Analytical Biochemistry*, v.9, p.431-442, 1964.
- BLAKESLEY, D.; CONSTANTINE, D. Uptake and metabolism of 6-benzyladenine in shoot cultures of a range of species. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v.28, n.2, p.183-186, 1992.
- BURCH, L.R.; STRUCHBURY, T. Activity and distribution of enzymes that interconvert purine bases, ribosides and ribotides in the tomato plant and possible implications for cytokinin metabolism. *Physiologia Plantarum*, v.69, p.283-288, 1987.
- BURCH, L.R.; STRUCHBURY, T. Metabolism of purine nucleotides in the tomato plant. *Phytochemistry*, v.25, n.11, p.2445-2449, 1986.
- DIAZ, I.F. *Absorción y metabolismo de citoquininas en tejidos de Actinidia deliciosa cultivados in vitro*. [S.l.:s.n.], 1994. 109p. Ph.D. Thesis.
- ERNST, D.; OESTERHELT, D. Changes of cytokinin nucleotides in an anise cell culture (*Pimpinella anisum* L.) during growth and embryogenesis. *Plant Cell Reports*, v.4, p.140-143, 1985.
- FORSYTH, C.; VAN STADEN, J. Cytokinin metabolism in tomato plants. II. Metabolites of kinetin and benzyladenine in decapitated roots. *Plant Growth Regulation*, v.14, p.13-19, 1988.
- HORGAN, R.; SCOTT, I.M. *Cytokinins. In the principles and practice of plant hormone analysis*. London: Academic Press, 1987. p.304-365.
- KAMINECK, M. *Progress in cytokinin research*. Tibtech: Elsevier Science, 1992. v.10, p.159-164.
- LAMPUGNANI, M.G.; FANELLE, R.; LONGO, G.P.; LONGO, C.; ROSSI, G. Uptake of benzyladenine by excised watermelon cotyledons. *Plant Physiology*, v.68, p.11-14, 1981.
- LETHAM, D.S.; PALNI, M.S. The biosynthesis and metabolism of cytokinins. *Annual Review of Plant Physiology*, v.34, p.163-197, 1983.
- MARINO, G.; BERTAZZA, G. Micropropagation of *Actinidia deliciosa* cvs. Hayward and Tomuri. *Scientia Horticulturae*, v.45, p.65-74, 1990.
- MINOCHA, S.C.; NISSEN, P. Uptake of benzyladenine by tuber slices of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) over a wide concentration range. *Plant Physiology*, v.70, p.528-531, 1982.
- NIEDERWIESER, J.G.; VAN STADEN, J.; UPFOLD, S.J.; DREWES, F.E. Metabolism of 6-benzyladenine by leaf explants of *Lachenalia* during adventitious bud formation. *South African Journal of Botany*, v.58, n.4, p.236-238, 1992.
- PALNI, L.M.S.; TAY, S.A.B.; MaC LEOD, J.K. Determination by gas chromatography-mass spectrometry of [<sup>15</sup>N<sub>2</sub>]adenine incorporation into endogenous cytokinins and the effect of tissue age on cytokinin biosynthesis in *Datura innoxia* crown gall tissue. *Plant Physiology*, v.84, p.1158-1162, 1987.
- TREWAVAS, A.J. Plant growth substances: What is the molecular basis of their action? What's New in Plant Physiology. *Physiological Plant*, v.10, p.33-44, 1979.
- VAN DER KRIEKEN, W.M.; CROES, A.F.; BARENDSE, G.W.M.; WULLEMS, G.J. Uptake and metabolism of benzyladenine in the early stage of flower bud development *in vitro* in tobacco. *Physiologia Plantarum*, v.74, p.113-118, 1988.
- VANKOVA, R.; HSIAO, K.C.; BORNMAN, C.H.; GAUDINOVA, A. Effects of synthetic cytokinins on levels of endogenous cytokinins and respiration patterns of *Beta vulgaris* cells suspension. *Journal of Plant Growth Regulation*, v.10, p.197-199, 1991.
- VAN STADEN, J.; BAYLEY, A.D. Fate of benzyladenine metabolites extracted from tomato shoots in biological systems. *Plant Growth Regulation*, v.10, p.117-124, 1991.
- VAN STADEN, J.; BAYLEY, A.D. The metabolism of benzyladenine by excised organs of *Phaseolus vulgaris*. *South African Tydskranium Plantkum*, v.56, n.2, p.154-157, 1990.
- VAN STADEN, J.; DREWES, F.E. The stability and metabolism of benzyladenine glucosides in soybean callus. *Journal of Plant Physiology*, v.140, p.92-95, 1992.
- VAN STADEN, J.; MALLETT, J.A. Metabolism and transport of [8-<sup>14</sup>C] benzyladenine applied to rootless shoots and the roots of intact tomato plants. *Plant Physiology Biochemistry*, v.26, n.1, p.47-54, 1988.