

INDUÇÃO DO SUPERBROTAMENTO *IN VITRO* DE EIXOS EMBRIONÁRIOS DE *ARACHIS HYPOGAEA* L.

Juliana Pereira de Castro¹; Cristiane Miranda Furtado²; Julita Maria Frota Chagas Carvalho³;
Tais de Moraes Falleiro Suassuna³

RESUMO: O embrião zigótico é formado por tecido de alta totipotência, um excelente explante para propagação clonal *in vitro*, adequando-se assim a programas de introdução, armazenamento e intercâmbio de germoplasma de amendoim. O objetivo deste trabalho foi induzir o superbrotamento na cultivar de amendoim BR-1, utilizando o eixo embrionário. As sementes foram desinfestadas e lavadas quatro vezes em água bidestilada estéril, ficando imersas durante 24 horas na última lavagem; posteriormente, foi retirado o eixo embrionário e cultivado em meio Murashige e Skoog (1992) suplementado com 6-benzilaminopurina (BAP), nas concentrações 0,0; 0,5; 1,0; 2,0 e 3,0 mg.L⁻¹. Empregou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado com 15 repetições, sendo cada tubo uma repetição. As avaliações foram realizadas aos 28 dias de cultivo, pelo critério de número de brotos, comprimento de planta em (cm), formação e número de calos por explante. Houve formação de múltiplos brotos nos tratamentos onde o meio de cultura foi suplementado com BAP (0,5; 1,0; 2,0 e 3,0 mg.L⁻¹) obtendo-se maior proliferação de brotos ao se utilizar a concentração de 3,0 mg.L⁻¹. Os maiores comprimentos de plantas e a menor presença de calos ocorreram em meio sem presença de BAP.

UNITERMOS: Micropropagação, Cultura de tecidos, BAP.

INDUCTION OF THE MULTIPLE SHOOTS *in vitro* OF EMBRYONIC AXES OF *Arachis hypogaea* L.

ABSTRACT:

The zygotic embryo is originated in a tissue with high totipotence. It is an excellent explant for clonal *in vitro* propagation, appropriated for introduction, storage and exchange of peanut germplasm. This work aimed to induce multiple shoots in cultivated peanut, cultivar BR-1, from embryonic axes. The seeds were sterilized and washed by four times in bi-distilled sterile water, and rinsed by 24 hours; subsequently, the embryonic axes were removed carefully from the seeds and cultivated in MS medium, supplemented with 6-benzylaminopurine (BAP) at different concentrations (0,0; 0,5; 1,0; 2,0 and 3,0 mg.L⁻¹). The experimental design was completely randomized with 15 replicates. The evaluations were made after 28 days of inoculation, by counting the number of shoots by explants. Multiple shoots were observed in the treatments where the medium was supplemented with BAP (0,5; 1,0; 2,0 and 3,0 mg. L⁻¹) obtaining a highest proliferation of shoots in the concentration of 3,0 mg.L⁻¹ BAP. The largest plants and lower callus number were obtained in medium not supplemented with BAP.

UNITERMS: Micropropagation, Tissue culture, BAP.

¹ Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Paraíba – UFPB, Campus II, Areia, PB, CEP: 58.397-000, e-mail: julipcastro@hotmail.com; ² Bióloga, Doutoranda em Engenharia de Processos, Universidade Federal de Campina Grande - UFCG, Campina Grande, PB, CEP 58.109-970 e-mail: cristiane_furtado@yahoo.com.br; ³ Embrapa Algodão, CP 174, Campina Grande – PB, e-mail: julita.carvalho@embrapa.br; Tais.Suassuna@embrapa.br

INTRODUÇÃO

O amendoim cultivado (*Arachis hypogaea* L.) é uma das leguminosas produtoras de grãos mais plantadas em todo o mundo, devido ao seu alto conteúdo de proteína e óleos insaturados. É cultivado extensivamente na China, Índia e Estados Unidos e África (Martins, 2011).

A técnica do cultivo de tecidos se baseia principalmente no aproveitamento da totipotência das células vegetais, ou seja, na capacidade de produzir órgãos, como brotos e/ou raízes (organogênese) ou embriões somáticos, que regeneram uma planta completa (embriogênese somática) em meio de cultura favorável, podendo ser iniciado com qualquer parte da planta: gemas, raízes, folhas, células isoladas, protoplastos, semente, embrião zigótico, antera, etc. A escolha de um ou outro explante dependerá dos objetivos desejados, da disponibilidade e capacidade de resposta do material (Carvalho, 1999).

A técnica de cultivo *in vitro* de embriões zigóticos vem sendo praticada pelos melhoristas de plantas a quase um século (Cartaxo, 2003), para regenerar embriões de sementes sem capacidade de germinação, e como fonte de explantes com tecidos de elevada totipotência (HU et al., 1998).

Várias espécies silvestres de amendoim foram regeneradas utilizando eixos embrionários como explante (Mansur, 2001; Gagliardi *et al.*, 2000, 2002), além de acessos do Banco Ativo de Germoplasma (BAG Amendoim), cujo armazenamento por longos períodos resultou em perda completa da germinação – as sementes estavam inviáveis (Suassuna et al., 2005).

Um dos fatores que pode ter maior influência na propagação *in vitro* é o uso de fitorreguladores (Pinhal et al., 2011). A citocinina 6-benzilaminopurina (BAP) é muito eficaz para promover multiplicação de brotos em diversas espécies e parece ser a citocinina por excelência para multiplicação de partes aéreas e indução de gemas adventícias (Hu e Wang, 1983). Trabalhos que utilizaram diferentes citocininas como fitorreguladores no superbrotamento de *Gossypium hirsutum* L. (Carvalho *et al.*, 2000) e *Arachis hypogaea* L. (Furtado *et al.*, 2003), sendo o BAP o melhor fitorregulador na indução de múltiplos brotos.

Mansur (2001), ao estudar a regeneração de espécies silvestres de amendoim utilizando o fitorregulador BAP na concentração de $1,9 \text{ mgL}^{-1}$ e o explante eixo embrionário, obteve alta frequência de regeneração, com alta formação de brotos.

O conhecimento da capacidade de regeneração de plantas de amendoim via indução de superbrotamento poderá auxiliar em distintas etapas de conservação, avaliação ou multiplicação de germoplasma da espécie.

Objetivou-se com este trabalho induzir a formação de múltiplos brotos a partir de eixos embrionários de amendoim (cultivar BR-1) utilizando-se diferentes concentrações do hormônio 6-benzilaminopurina (BAP).

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no Laboratório de Biotecnologia da Embrapa Algodão. Sementes da cultivar BR-1 foram desinfestadas em solução de NaOCl (100ml) a 1,8% e uma gota de Tween 20 e colocado sob agitação durante vinte minutos; em seguida, sob fluxo laminar, o material vegetal foi lavado 4 vezes em água bidestilada estéril, permanecendo imerso durante 24 horas na última lavagem. Posteriormente, os eixos embrionários foram excisados das sementes e inoculados em meio MS (Murashige e Skoog, 1962), suplementado com 0,0; 0,5; 1; 2 e 3 mgL^{-1} de BAP. Os meios de cultivo foram suplementados com 30 g/L de sacarose e 0,65% de ágar, e o pH ajustado para 5,7 utilizando NaOH ou HCl antes da autoclavagem a 120°C^{-1} . Para cada tubo foram adicionados 10ml de meio, sendo em seguida fechados com tampa de polietileno e vedados com filme plástico. As culturas permaneceram no escuro por 72 horas, e posteriormente foram mantidas durante 25 dias a $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, com um fotoperíodo de 16h de luz/8h de escuro e intensidade luminosa de $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}$.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com 15 repetições e um eixo embrionário por tubo. As avaliações foram realizadas após 28 dias de cultivo anotando-se o número de brotos por explante, comprimento da planta e presença de calo. Após a coleta dos dados, procedeu-se à análise de variância, com os dados transformados em $y = \sqrt{x+1}$. A comparação das médias foi feita pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade (Gomes, 1985).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O resumo da análise de variância pode ser observado na Tabela 1. Foi detectado efeito significativo para os tratamentos, nas três variáveis.

Tabela 1. Resumo da análise de variância das variáveis: número de brotos, comprimento da planta e presença de calo em eixos embrionários da cultivar de amendoim BR-1, utilizando-se citocinina 6-benzilaminopurina (BAP)

Fonte de Variação	GL	Quadrado Médio das Variáveis		
		Número de brotos	Comprimento da planta (cm)	Presença de calo
Tratamento	4	15,553**	59,29**	1,733**
Resíduo	70	0,746	5,859	0,158
Total	74	114,48	647,336	18
CV (%)	-	35,413	56,61	66,26
Média	-	2,44	4,276	0,6

^{ns} Não diferem estatisticamente pelo teste F a 5% de probabilidade. ** Significativo a 1% de probabilidade pelo teste F.

A partir dos resultados obtidos na indução de superbrotamento da variedade de amendoim BR-1 (Tabela 1), constatou-se que o eixo embrionário produziu múltiplos brotos, provavelmente devido, ao fato de que embriões cultivados são explantes com tecido de elevada totipotência (Hu *et al.*, 1998) e, quando inoculados em meio suplementado com BAP, segundo Hu e Wang (1983) induzem à formação de grande número de brotos e alta taxa de reprodução.

Tabela 2. Valores médios da indução de múltiplos brotos em eixos embrionários da cultivar de amendoim BR-1, utilizando-se citocinina 6-benzilaminopurina (BAP).

Tratamento	Nº de brotos/explante
T0 –MS	1,41c
T1-MS + 0,5mg.L-1	1,80b
T2-MS + 1mg.L-1	1,83b
T3-MS + 2mg.L-1	1,88b
T4-MS + 3mg.L-1	2,19a
F _{tratamento}	20,83**
CV%	30,41

Médias seguidas pelas mesmas letras não são significativamente diferentes entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade

** Significativo ($p < 0,01$) pelo teste F

Pôde-se observar, ainda, que o meio MS básico não produziu superbrotamento (Figura 1A). Observou-se nesse meio as plantas com maiores comprimentos e uma menor presença de calos. Os meios de cultura suplementados com o fitorregulador BAP (0,5; 1; 2 mgL⁻¹) não apresentarem diferenças significativas entre si, para esta variável, enquanto o tratamento contendo BAP 3 mgL⁻¹

(Tabela 2 e Figura 1B) produziu maior número de brotos por explante. Para as variáveis comprimento da planta e presença de calo, os meios suplementados com BAP não apresentaram diferenças significativas, diferindo apenas do controle.

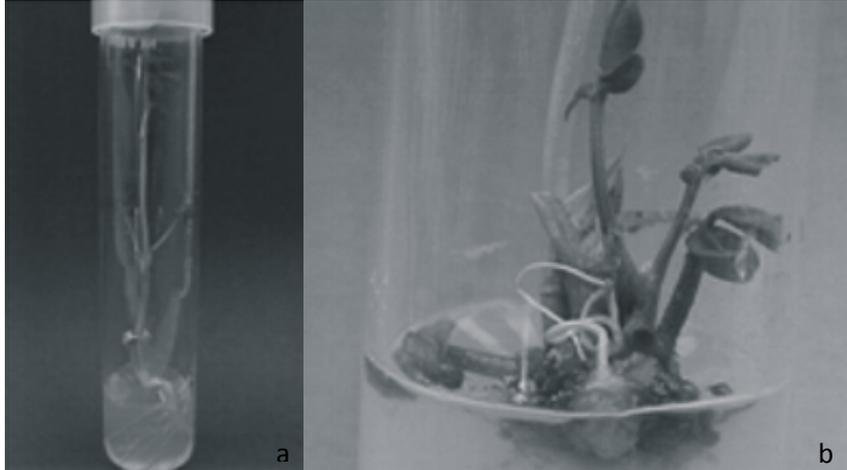


Figura 1. Superbrotamento da cultivar de amendoim BR-1: a) cultivo em meio MS; b) cultivo em meio MS suplementado com 3 mgL⁻¹ de BAP.

Mansur (2001), ao estudar a regeneração de espécies silvestres de amendoim utilizando este mesmo fitoregulador e mesmo tipo de explante, constatou formação de múltiplos brotos na maioria das espécies estudadas. Resultado similar foi encontrado por Gagliardi et al. (2000), ao regenerar espécies da sessão *Extranervosae* do gênero *Arachis*.

Gagliardi *et al.* (2002) obtiveram múltiplas brotações em meio MS suplementado com BAP para espécies silvestres de amendoim utilizando como explante gema cotiledonar e meristema apical. Ao utilizar o explante gema cotiledonar de plântulas *in vitro* de amendoim, cultivar BR-1, Furtado *et al.* (2003) obtiveram múltiplos brotos em meio MS suplementado com BAP isolado ou em combinação com ácido α -naftalenoacético (ANA), sendo os melhores resultados encontrados nos tratamentos contendo a presença de BAP (10 mgL⁻¹) e do ANA (1,0 mgL⁻¹).

O superbrotamento de amendoim a partir de eixos embrionários é de extrema importância na regeneração e multiplicação de germoplasma da espécie, tendo em vista que, com apenas uma semente é possível obter grande número de plantas saudáveis.

CONCLUSÃO

- O meio de cultivo MS suplementado com BAP, induz à formação de múltiplos brotos em eixos embrionários;
- O maior número de brotos foi obtido em meio MS suplementado com 3 mg/L⁻¹ de BAP;
- O maior comprimento da planta (cm) se deu no meio MS sem suplemento hormonal;
- Os meios suplementados com BAP induzem a formação de calos.

REFERÊNCIAS

Cartaxo, G.M.C. (2003). *Cultivo in vitro de embrião zigótico e crioconservação de sementes de girassol (Helianthus annuus L.)*. 60p. (Monografia para obtenção do grau de Licenciatura e Bacharelado em Ciências Biológicas)- Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, PB.

- Carvalho, J.M.F.C. (1999). *Técnicas de micropropagação*. Campina Grande: Embrapa CNPA. (Embrapa CNPA. Documento, 64). 39p.
- Carvalho, J.M.F.C.; Souza, D. M.; Santos, J.W. (2002). Indução de superbrotamento e regeneração *in vitro* da cultivar de algodão CNPA 7H. *Revista Brasileira de Oleaginosas e fibrosas*: Embrapa CNPA, 4 (2): 61-65.
- Furtado, C. M.; Carvalho, J.M.F.C.; Silva, H.; Castro, J. P.; Santos, J.W.; Santos, T. S. (2003). Indução do Superbrotamento de Amendoim Cultivar BR-1 Através do Cultivo *In Vitro*. *Revista Brasileira de Oleaginosas e fibrosas*: Embrapa CNPA, 7 (213): 685-691.
- Gagliard, R.F.; Pacheco, G.P.; Coculino, S. P.; Valls, J.F.M., Mansur, E. (2000). *In vitro* regeneration from seeds explantes of wild groundnut species (genus *Arachis*, section *Extranervosae*). *Biodiversity Conserv*, 9: 943-951.
- Gagliard, R.F.; Pacheco, G.P.; Valls, J.F.M., Mansur, E. (2002). Germoplasm preservation of wild *Arachis* species through culture of shoot apices and axillary buds from *in vitro* plants. *Biologia Plantarum*, 45 (3): 353-357.
- Gomes, F. P. (1985). *Curso de Estatística experimental*. 11 ed. Piracicaba: Nobel, 466p.
- Hu, C.Y.; Wang, P.J. (1983). Meristem, shoot tip, and bud cultures. In: Evans, D.A.; Sharp, W.R.; Ammirato, P.V. Yamada, Y., ed *Handbook of plant cell culture*. New York: Macmillan, 1: 177-227.
- Hu, C.Y.; Ferreira, A.G. (1998). Cultura de Embriões. In: Torres, A.C.; Caldas, L.S.; Buso, J.A. *Cultura de Tecido e Transformação Genética*. Brasília: Embrapa-SPI / Embrapa-CNPQ, 1: 371-393.
- Mansur, E. (2001). Resgate de acessos inviáveis e preservação *in vitro* de germoplasma de *Arachis*. In: *Simpósio de recursos genéticos para a América Latina e Caribe*, 3, 2001, Londrina. *Anais...* Londrina: IAPAR.
- Martins, R. Produção de amendoim e expansão da cana-de-açúcar na Alta Paulista, 1996-2010. *Informações Econômicas*, v. 41, n. 06, junho 2011.
- Murashige, T.; Skoog, F.A. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, 15: 473-497.
- Pinhal, H.F., Anastácio, M.R., Carneiro, P.A.P., Silva, V.J.da, Moraes, T.P. de, Luz, J.M.Q. (2011) Aplicações da cultura de tecidos vegetais em fruteiras do Cerrado. *Ciência Rural*, Santa Maria, Online. ISSN 0103-8478, v.41, n.7. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/cr/2011nahead/a3911cr4848.pdf> . Acesso em: 8 de novembro de 2011.
- Suassuna, T.M.F.; Castro, J.P.; Furtado, C.M.; Ribeiro, C.S.N.; Santos, T.S.; Santos, J.W.; Carvalho, J.M.F.C. (2005). Regeneração e multiplicação de plantas de amendoim *in vitro* a partir de sementes inviáveis. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS, 3, 2005, Gramado. *Anais...* Passo Fundo: SBMP/Embrapa Trigo, 2005. CD-ROM. [Suassuna, T.M.F. et al. 2005A]