

Otimização da regeneração do amendoim (*Arachis hypogaea* L.) *in vitro*.

Castro, Juliana Pereira¹; Rêgo, Maílson Monteiro²; Carvalho, Julita Maria frota Chagas³; Suassuna, Taís de Moraes Falleiro⁴, Silva, Pollyana Karla⁵, Rêgo, Elizanilda Ramalho².

¹Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Agronomia (UEPB-CCA), email: julipcastro@hotmail.com; ²Professor do DF/DCFS/CCA/UEPB, 58.370-000, Areia (PB); ³Orientadora, Eng. Agr. Dr. em Biotecnologia, Embrapa Algodão, Rua Osvaldo Cruz, 1143, Centenário, CEP 58107-720 Campina Grande, PB. e-mail: julita@cnpa.embrapa.br; ³Eng. Agr. Dr. em Genética e Melhoramento de plantas, E-mail: tais@cnpa.embrapa.br; ⁴Graduanda em Ciências Biológicas UEPB,

INTRODUÇÃO

O amendoim (*Arachis hypogaea* L.) é uma espécie cultivada nos cinco continentes, sendo mundialmente reconhecido como rica fonte de proteína e óleo de origem vegetal (GODOY, 2001; MACEDO, 2004). No Brasil, é cultivado principalmente nas regiões Sudeste, Nordeste e em expansão no Centro-Oeste. Na região Nordeste, o seu cultivo é basicamente uma atividade de pequenos e médios produtores, os quais utilizam baixo nível tecnológico (Barros *et al*, 1994; Santos, 1995; Santos *et al.*, 2005).

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

De acordo com Ribas *et al*, (2002), o conteúdo de tiamina do meio MS pode não ser suficiente para obter ótimos resultados em algumas culturas. Gamborg *et al.* (1968) compararam o complexo vitamínico B5 e o uso de tiamina no cultivo de células de soja e verificaram que somente a tiamina era necessária para o crescimento das células. Morris *et al* (1995) regenerou sementes de amendoim com até 31 anos de armazenamento utilizando o complexo B5.

As giberelinas bioativas, como o GA₃, promovem a germinação de sementes em várias espécies de plantas, estimulando o crescimento do embrião. Outro importante efeito das giberelinas é que estas agem sobre o metabolismo dos glicídios envolvidos no fornecimento de energia às células e que podem contribuir para tornar o potencial osmótico celular mais negativo, aumentando o fluxo de água para o interior da célula favorecendo assim sua expansão (DAYKIN *et al.*1997).

Trabalhos realizados no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da Embrapa Algodão vêm demonstrando o grande potencial organogênico do amendoim, especialmente a partir de eixos embrionários e segmentos nodais de plântulas obtidas *in vitro* (Furtado *et al.*, 2003). No entanto, são necessários ajustes para melhorar problemas relativos a germinação.

Este trabalho teve por objetivo testar os complexos vitamínicos do meio MS, B5 e tiamina, combinado ou não com o ácido giberélico (GA₃) na otimização da regeneração do amendoim *in vitro*.

MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no Laboratório de Biotecnologia da Embrapa Algodão. Sementes do cultivar BR-1 armazenadas a cinco anos em câmara fria (10-15°C e 60% de umidade relativa) e apresentando 50% de germinação, foram desinfestadas em solução de NaOCl a 1,8% e uma gota de Tween 20 permanecendo sob agitação durante vinte minutos; em seguida, o material vegetal foi lavado 4 vezes em água bidestilada estéril, na qual permaneceu imerso durante 24 horas na última água. Posteriormente, foi excisado das sementes, em câmara de fluxo laminar, os eixos embrionários e inoculados em meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), MS + B5 (Gamborg *et al.*, 1968), MS acrescido de 0,3 mg.L⁻¹ de tiamina, suplementados ou não com 0,5 mg.L⁻¹GA₃. Os meios de cultivo foram suplementados com 20 g.L⁻¹ de açúcar comercial (União) e 0,65% de ágar, e o pH ajustado

para 5,7 utilizando NaOH ou HCL antes da autoclavagem a 120°C por 20 minutos. Em seguida os tubos de ensaio foram 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:8h (claro:escuro) e intensidade luminosa de $30\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com 6 tratamentos e 15 repetições, cada repetição consistiu em um eixo embrionário por tubo. As avaliações foram realizadas após 10 dias de cultivo onde se avaliou o número de eixos embrionários germinados, tamanho da planta e número de raízes, e aos 28 dias de cultivo onde se avaliou o peso fresco e seco da parte aérea e radicular. Foi realizada análise de variância dos dados e as médias foram comparadas usando o teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, todas as operações estatísticas foram realizadas usando o software genes (Cruz, 2004).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da germinação, comprimento de plântula e números de raízes foram avaliadas aos 10 dias após a inoculação nos diferentes meios de cultivo e os resultados são mostrados na tabela 1. Os resultados indicaram que entre essas três variáveis não há diferenças de resposta em relação a variável germinação de eixo embrionário, entretanto, em relação ao comprimento médio da plântula (cm) e o número de raízes, o meio MS é tão eficiente quanto os demais, sugerindo que as sementes de amendoim devam ser postas para germinar *in vitro* sem adição de GA₃, Tiamina ou complexo vitamínico B5 (tabela 2), isolados ou em conjunto. Com relação as demais variáveis, avaliadas aos 28 dias, não houve diferenças significativas (Tabelas 1 e 2).

Tabela 1. Análise de variância entre os seis tratamentos em relação as oito variáveis avaliadas aos 10 e 28 dias, respectivamente.

Fonte de Variação	G.L.	Quadrado Médio das Variáveis							
		Germinação	Comprimento médio da plântula (cm)	Número de folhas	Número de raízes	Peso Fresco da raiz (g)	Peso Seco da raiz (g)	Peso Fresco parte aérea (g)	Peso seco parte aérea (g)
Tratamentos	5	0,28 ^{ns}	1,68*	3,64 ^{ns}	6,01*	0,003 ^{ns}	0,00005 ^{ns}	0,0005 ^{ns}	0,0004 ^{ns}
Resíduo	84	0,212	0,38	2,58	0,86	0,01	0,0001	0,02	0,001
Total	89								
CV%	-	0,68	0,51	0,77	1,07	0,10	1,13	0,22	4,89
Média	-	66,94	119,73	206	86,13	100,2	100,2	75,94	81,03

*Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Tabela 2. Comparação entre médias dos seis tratamentos em relação as variáveis germinação, comprimento de plântulas (cm), número de folhas, número de raízes, peso fresco de raiz, peso seco de raiz, peso fresco de parte aérea e peso seco de parte aérea, as quatro primeiras variáveis foram avaliadas aos 10 dias e as demais aos 28 dias após a inoculação.

Tratamentos	Germinação	Comprimento da plântula (cm)	Número de folhas	Número de raízes	Peso Fresco da raiz (g)	Peso Seco da raiz (g)	Peso Fresco parte aérea (g)	Peso seco parte aérea (g)
MS	0,533 ^a	0,906 ^a	0,800 ^a	1,666 ^a	0,079 ^a	0,008 ^a	0,234 ^a	0,042 ^a
MS + GA ₃	0,933 ^a	0,533 ^{ab}	1,333 ^a	1,200 ^{ab}	0,125 ^a	0,013 ^a	0,254 ^a	0,058 ^a
MS + Tiamina	0,600 ^a	0,780 ^a	0,733 ^a	1,400 ^{ab}	0,109 ^a	0,012 ^a	0,224 ^a	0,048 ^a
MS+Tiam.+GA ₃	0,666 ^a	0,266 ^{ab}	0,533 ^a	0,666 ^{bc}	0,112 ^a	0,012 ^a	0,202 ^a	0,047 ^a
MS + B5	0,666 ^a	0,620 ^{ab}	1,266 ^a	1,533 ^{ab}	0,108 ^a	0,010 ^a	0,204 ^a	0,044 ^a
MS + B5 + GA ₃	0,733 ^a	0,000 ^b	0,000 ^a	0,000 ^c	0,102 ^a	0,010 ^a	0,222 ^a	0,052 ^a

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

Plântulas de amendoim com maior comprimento médio foram obtidas quando as sementes, armazenadas por cinco anos em câmara fria, foram inoculadas em meio MS sem aditivos (Figura 1). Na figura 1C, é possível perceber que as plântulas do meio MS desenvolveu-se mais que dos outros tratamentos.



Figura 1. Plântulas de amendoim germinadas *in vitro*. A. Plântulas germinadas aos 10 dias após a inoculação. B e C. Plântulas germinadas aos 28 dias de cultivo. Disposição da esquerda para a direita: MS; MS + GA₃, MS + Tiamina, MS + Tiamina + GA₃, MS + B5 e MS + B5 + GA₃. Barra = 1,0 cm.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nas condições em que se desenvolveu o trabalho recomendam-se que sementes de amendoim armazenadas em câmara fria devem ser postas para germinar em meio MS sem adição de GA₃, Tiamina ou complexo vitamínico B5, pois estes não influenciam na resposta quando comparado ao meio MS.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARROS, M.A.L.; SANTOS, R.C. dos; ARAÚJO, J.M. de; SANTOS, J.W. dos; OLIVEIRA, S.R. de M. **Diagnóstico preliminar da cultura do amendoim no Estado da Bahia.** In

Embrapa. CNPA (Campina Grande, PB) Relatório técnico anual 1992-1993. Campina Grande, 1994b p.381-383.

CARTAXO, G.M.C. **Cultivo *in vitro* de embrião zigótico e crioconservação de sementes de girassol (*Helianthus annuus* L.)** 2003, 60f. 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, 2003.

DAYKIN, A.; SCOTT, I. M.; FRANCIS, D.; CAUSTON, D. R. Effects of gibberellin on the cellular dynamics of dwarf pea internode development. **Planta**, Berlin, v. 203, n. 4, p. 526-535, 1997.

FURTADO, C. M.; CARVALHO, J.M.F.C.; SILVA, H.; CASTRO, J. P.; SANTOS, J.W.; SANTOS, T. S. Indução do Superbrotamento de Amendoim Cultivar BR-1 Através do Cultivo *In Vitro*. **Revista Brasileira de Oleaginosas e fibrosas**: Embrapa CNPA. v.7, nº213. 2003. p. 685-691.

GAMBORG, O.L., MILLER, R., OJIMA, K. Nutrient requirement of suspension cultures os soybean root cells. **Experimental Cell Research**, New York, v.50, p.151-158, 1968.

GODOY, I.J Problemas e perspectivas do melhoramento genético do amendoim no Brasil. In: SIMPÓSIO DE RECURSOS GENÉTICOS PARA A AMÉRICA LATINA E CARIBE, 3, 2001, Londrina. **Anais...** Londrina: IAPAR, 2001.

HU, C.Y.; FERREIRA, A.G. Cultura de Embriões. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de Tecido e Transformação Genética**. Brasília: Embrapa-SPI / Embrapa-CNPB, v.1. p. 371-393, 1998.

MACEDO, M. H. G. Amendoim. Disponível em: Conjunturas Agropecuárias <http://www.conab.gov.br/>. Acesso em 10/11/2004.

SANTOS, R.C. Peanut crop: A viable alternative to Brazilian Northeast growers. **Ciência e cultura**, v.47, p.9-10, 1995.

SANTOS, R.C.; GODOY, I.J.; FÁVERO, A.P. Melhoramento do Amendoim. IN: SANTOS, R.C. **O Agronegócio do Amendoim no Brasil**. Campina Grande: Embrapa Algodão, p.123-192, 2005.

RIBAS, A. F.; DENIS, F. ; QUOIRIN, M; AYUB, R. A. MISTURAS VITAMÍNICAS NA REGENERAÇÃO DO MARACUJAZEIRO AMARELO (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.) **Ciência Rural**, Santa Maria, v.32, n.2, p.237-241, 2002

PALAVRAS-CHAVE:

Arachis, cultivo *in vitro*, germinação