



Metodologia para o Superbrotamento de Amendoim (*Arachis hypogaea*) através do Cultivo "In Vitro"

Julita Maria Frota Chagas Carvalho¹

Cristiane Miranda Furtado²

Huberto Silva³

Juliana Pereira de Castro⁴

O amendoim (*Arachis hypogaea*), é uma planta herbácea anual, mundialmente reconhecida por ser uma rica fonte de proteína, contendo em seus grãos aproximadamente 20-25% de proteína de alta qualidade e 45% de óleo comestível (GODOY, et al. 1999).

Por se tratar de uma oleaginosa mundialmente cultivada, programas de melhoramento vegetal, incluindo-se as técnicas biotecnológicas, vêm sendo utilizados no desenvolvimento de diversas cultivares.

A cultura de tecidos é uma parte da biotecnologia que na atualidade tem rápida evolução. A micropropagação *in vitro* oferece condições para obter plantas de difícil propagação e de ciclos de vida longa, em um menor espaço de tempo do que o melhoramento convencional. Além de que, uma eficiente regeneração *in vitro* protocola a compatibilidade com os métodos de transformação genética, que podem ser muito utilizadas no desenvolvimento de amendoins transgênicos.

Objetivou-se com este trabalho, induzir o

superbrotamento na cultivar de amendoim BR-1, observando-se a regeneração de plântulas a partir de três tipos de explantes, determinando o melhor meio nutritivo suplementado com hormônios em concentrações e combinações diferentes, para o superbrotamento.

Sementes da cultivar BR-1 de amendoim foram desinfestadas quando inicialmente mergulhadas por um minuto no álcool a 70% e posteriormente imersas em solução contendo hipoclorito de sódio a 1,4% por 20 minutos e a seguir, enxaguadas 4 vezes em água bidestilada estéril, onde ficaram imersas durante 4 horas; posteriormente, essas sementes foram inoculadas em tubos de ensaio contendo 10 mL do meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) para formação da planta matriz; após o seu desenvolvimento, foram separados e excisados os explantes: epicótilo, folículo e gemas cotiledonares, os quais foram inoculados em tubos contendo o meio MS suplementado com combinações dos hormônios 6-benzilaminopurina (BAP) e ácido α -naftalenoacético (ANA), nas concentrações 0,0; 5,0; 10,0; 15,0; 20,0 mg.L⁻¹

¹Eng. Agr., Dra., Embrapa Algodão, Rua Osvaldo Cruz, 1143, Centenário, CP 174, CEP 58107-720, Campina Grande, PB. e-mail: julita@cnpa.embrapa.br

²Graduanda em Ciências Biológicas, da UEPB. Bolsista do PIBIC.

³Professor Dr. do departamento de Farmácia e Biologia da UEPB.

⁴Graduanda em Ciências Biológicas, da UEPB

BAP na presença ou não de 1,0 mg.L⁻¹ ANA em frasco de cultivo. Empregou-se um delineamento experimental inteiramente casualizado com 10 frascos por tratamento. Utilizaram-se três explantes por frasco, no caso do folículo e epicótilo, e um único explante, em se tratando da gema cotiledonar. Após 60 dias, os explantes foram avaliados utilizando-se o critério NGE (número de gemas por explante). Só foram considerados superbrotamento os explantes que apresentaram mais de 2 brotos, sendo estes, logo em seguida, transferidos para um meio sem hormônio, para o alongamento dos brotos.

A variável número de brotos/explante foi submetida a análise da variância e as médias dos tratamentos comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Utilizou-se a transformação $y = \sqrt{x+1}$ para a estabilização das variâncias dos erros experimentais (GOMES, 1985).

O resultado obtido para o explante folículo foi a ocorrência de formação de calos, sem induzir a formação de brotos. O meio que induziu a formação dos maiores calos continham BAP (10 mg.L⁻¹) + ANA (1,0 mg.L⁻¹), com os quais se obtiveram 80% de formação de calos grandes. No caso do epicótilo, onde ocorreu também apenas a formação de calos, os melhores resultados foram obtidos com BAP (5 mg.L⁻¹) + ANA (1,0 mg.L⁻¹) com 87% de formação de calos grandes, sendo este um meio com baixa concentração de BAP e presença do ANA. Este fato se deve provavelmente à presença de uma citocinina, que juntamente a uma auxina em baixas concentrações, resultam em uma rápida divisão celular, estimulando a formação de calos, que continuam a produzir células indiferenciadas (RAVEN et al. 1996). ALMEIDA et al. (2001) em estudos com a cultivar pernambucana de mamona, obtiveram produção de calos em meio MS suplementado com as citocininas BAP, CIN ou 2iP e a auxina ANA, sendo os melhores resultados provindos do meio suplementado com 1 mg.L⁻¹ ANA e 2 mg.L⁻¹ BAP.

Os resultados provenientes do explante gema cotiledonar estão apresentados na Tabela 1, observando-se a significância para cada tipo de tratamento utilizado. Ao se utilizar os hormônios 6-benzilaminopurina (BAP) na presença de ácido naftalenoacético (ANA), obteve-se um maior número de brotamento para o explante gema cotiledonar, a partir de 10 mg.L⁻¹ de BAP+1,0 mg.L⁻¹ de ANA. Os meios de cultura suplementados apenas com o hormônio BAP (5,0; 10; 15 e 20 mg.L⁻¹) resultaram em um menor índice de brotações que os

Tabela 1. Valores médios da indução de número de brotos por explante, referente à gema cotiledonar da cultivar de amendoim BR-1, conduzida em diferentes meios.

Tratamento	Nº brotos/explante ¹
T ₀ - MS	1,51 e
T ₁ - MS + 5,0mg.l ⁻¹ BAP	2,33 d
T ₂ - MS + 10mg.l ⁻¹ BAP	2,73 bcd
T ₃ - MS + 15mg.l ⁻¹ BAP	2,45 cd
T ₄ - MS + 20mg.l ⁻¹ BAP	2,65 bcd
T ₅ - MS + 5mg.l ⁻¹ BAP + 1,0mg.L ⁻¹ ANA	2,78 bcd
T ₆ - MS + 10mg.l ⁻¹ BAP + 1,0mg.L ⁻¹ ANA	3,30 a
T ₇ - MS + 15mg.l ⁻¹ BAP + 1,0mg.L ⁻¹ ANA	2,87 abc
T ₈ - MS + 20mg.l ⁻¹ BAP + 1,0mg.L ⁻¹ ANA	2,97 ab
F _{tratamento}	20,65**
CV%	13,39

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.

¹Dados transformados em $y = \sqrt{x+1}$.

demaís, além de não apresentarem diferenças significativas entre si. KANYAND, et al (1994), ao estudar a regeneração de amendoim *in vitro* utilizando o hormônio thiadiazuron (TDZ) nas concentrações de 0,5 até 50 mg.L⁻¹ e os explantes hipocótilo, cotilédone, internodal, folha com pecíolo e folha sem pecíolo, obteve uma alta frequência de regeneração, com uma maior formação de brotos em concentração de TDZ de 0,5 até 30 mg.L⁻¹.

Conclusões

- Gemas Cotiledonares de amendoim cultivar BR-1 fornecem brotos quando cultivados em meio MS suplementado com BAP;
- O número de brotos fornecido pelas gemas cotiledonares em meio MS é maior quando adicionado também o hormônio ANA, além do BAP;
- Dentre as combinações dos hormônios BAP e ANA estudadas, a que fornece maior número de brotos por explante para gema cotiledonar contém 10 mg.L⁻¹ BAP + 1,0 mg.L⁻¹ ANA;
- Dentre as combinações dos hormônios BAP e ANA estudadas, a que fornece maiores calos para o explante folículo contém 10 mg.L⁻¹ BAP + 1,0 mg.L⁻¹ ANA;
- Dentre as combinações dos hormônios BAP e ANA estudadas, a que fornece maiores calos para o explante epicótilo contém 5 mg.L⁻¹ BAP + 1,0 mg.L⁻¹ ANA.

Referências Bibliográficas

ALMEIDA, F. de A. C.; MORAIS, A.M. de; CARVALHO, J.M.F.C.; GOUVEIA, J.P.G. de. Produção de calo *in vitro* de duas variedades de mamona. **Revista de Oleaginosas e Fibrosas**, Embrapa CNPA, v. 5, n° 3, p.405-411, 2001.

GODOY, I.J. de; MORAES, S.A. de; ZANOTTO, M.D.; SANTOS, R.C. Melhoramento do Amendoim. IN: BOREM, A. **Melhoramento de Espécies Cultivadas**. Viçosa: UFV, p.51-94, 1999.

GOMES, F.P. **Curso de estatística experimental**. 11 ed. Piracicaba: Nobel, 1985. 466p.

KANYAND, M.; DESSAI, A. P.; PRAKASH, C. S. Thidiazuron promotes high frequency regeneration of peanut (*Arachis hipogaea*) plants in vitro. **Plant Cell Reports**, v. 14, p. 1-5, 1994.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.

RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. **Biologia vegetal**. 5 ed, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. 728p.

Comunicado Técnico, 196

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Algodão
Rua Osvaldo Cruz, 1143 Centenário, CP 174
58107-720 Campina Grande, PB
Fone: (83) 315 4300 Fax: (83) 315 4367
e-mail: sac@cnpa.embrapa.br
1ª Edição
Tiragem: 500



Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento



Comitê de Publicações

Presidente: Luiz Paulo de Carvalho
Secretária Executiva: Nivia M.S. Gomes
Membros: Demóstenes M.P. de Azevedo
José Wellington dos Santos
Lúcia Helena A. Araujo
Márcia Barreto de Medeiros
Maria Auxiliadora Lemos Barros
Maria José da Silva e Luz
Napoleão Esberard de M. Beltrão
Rosa Maria Mendes Freire

Expedientes: Supervisor Editorial: Nivia M.S. Gomes
Revisão de Texto: Nisia Luciano Leão
Tratamento das ilustrações: Geraldo F. de S. Filho
Editoração Eletrônica: Geraldo F. de S. Filho