

CULTIVO IN VITRO DE TECIDOS DE SOJA, *Glycine max* (L. Merrill)*

JOSEFA DIVA NOGUEIRA DINIZ**
RAIMUNDO GLADSTONE M. ARAGÃO***
JOSÉ FERREIRA ALVES***
RAIMUNDO FERDINANDO P. MACIEL***

SUMMARY

IN VITRO GORWTH OF SOYBEANS TISSUES

The work was conducted in order to study growth of soybean tissues *in vitro* under a modified medium of Murashige e Skoog, coconut water and different concentrations isolated or combined of Naphthaleneacetic Acid and Kynetin. A total randomly design, with 5 x 5 factorial arrangement with 8 repetitions was used. The treatments in number of 25, consisted of 5 levels of ANA (0,0, 1,0, 2,0, 3,0 e 4,0 mg/l), combined with the same levels of Kynetin, The observations made at 35 days, showed that the number of alive explants diminished increasing Kynetin levels, in combination with ANA levels. On the other hand, coconut water induced callus formation even in the absence of growth regulators. With Kynetin absent, roots were induced in all levels of ANA. Higher fresh weight were obtained with the highest concentration of ANA.

PALAVRAS-CHAVE: Cultura de tecidos, hipocótilo, calo, crescimento, diferenciação.

INTRODUÇÃO

O Brasil ocupa hoje o segundo lugar no mercado internacional na produção e exportação de soja, havendo a necessidade de uma

RESUMO

Objetivando avaliar o desenvolvimento de tecidos de soja *in vitro*, utilizou-se um meio modificado de Murashige e Skoog, 10% de água de coco e diferentes concentrações de ácido α -naftalenoacético (0,0, 1,0, 2,0, 3,0 e 4,0 mg/l), combinadas com as mesmas concentrações de cinetina num arranjo fatorial 5 x 5, segundo o delineamento inteiramente casualizado com 8 repetições. As observações efetuadas aos 35 dias evidenciaram que o número de explantes vivos diminuiu com o aumento da concentração de cinetina em combinação com ANA e que a água de coco induziu a formação de calo, independente da presença dos reguladores de crescimento. Na ausência de cinetina houve a formação de raízes nos explantes, em todos os níveis de ANA e um maior peso fresco foi observado em concentrações mais altas deste regulador.

* Trabalho extraído da Dissertação do primeiro autor para obtenção do grau de Mestre em Agronomia (Fitotecnia – Centro de Ciências Agrárias – UFC).

** Eng.^a Agrônoma do Dept.^o de Fitotecnia do CCA/UFC.

*** Professores do Centro de Ciências Agrárias da UFC.

crescente demanda por tecnologias que possam aumentar a curto e a médio prazos a produtividade da cultura. A utilização de técnicas modernas tem sido objeto de muitas pesquisas visando a obtenção de cultivares com características agrônômicas desejáveis. A micropropagação tem sido empregada para produção de plantas completamente diferenciadas, revestindo-se de grande importância para a produção comercial de muitas espécies vegetais.

Para o sucesso do cultivo *in vitro* é necessário a utilização de reguladores de crescimento, como auxinas e citocininas, que, segundo MURASHIGE & SKOOG¹⁵, influenciam na forma e textura do calo, extensão da formação do órgão, tamanho e número de órgãos formados, vigor e longevidade das culturas. Para NOGGLE & FRITZ¹⁶ estas substâncias iniciam as reações químicas, mudam a composição química dentro da planta e quando associadas aos fatores ambientais como luz, temperatura etc, interagem com os processos bioquímicos durante os processos de crescimento e diferenciação.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos isolados e combinados de diferentes concentrações de ANA e cinetina sobre o crescimento e diferenciação de tecidos de soja *in vitro*, utilizando um meio modificado de Murashige e Skoog e água de coco.

MATERIAL E MÉTODOS

Para o cultivo *in vitro*, utilizaram-se secções de hipocótilo de soja, de aproximadamente 2 mm, coletadas de plântulas após 3 dias da germinação. Os explantes foram cortados em placa de Petri, imersos em uma solução de hipoclorito de sódio a 10% (Água Sanitária Brilux, contendo 5% de cloro ativo), depois lavados três vezes em água destilada e autoclavada, quando foram inoculados em frascos contendo 25 ml de sais minerais e orgânicos do meio básico de MURASHIGE & SKOOG¹⁵ mais caseína hidrolizada (1,0 g/l), polivinilpirrolidona (5,0 g/l), L-glutamina (500 mg/l), L-asparagina (500 mg/l) e 10% de água de coco. Os tratamentos foram representados por concentrações de ANA (ácido α -naftalenoacético) e cinetina (6-furfurilaminopurina), isolados ou em combinações, ambos nos níveis de 0,0; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 mg/l.

Os explantes foram mantidos em câmara de crescimento, durante 35 dias, a uma temperatura média de 27°C durante o dia e 24°C

durante a noite; fotoperíodo de 8/16 horas de luz/escuro e intensidade luminosa de 2.000 lux. A umidade relativa do ar situava-se, em média, a 60% durante o dia e 70% durante a noite. Os frascos contaminados até 7 dias foram substituídos.

Como modelo experimental utilizou-se um fatorial 5 x 5 num delineamento inteiramente casualizado com 8 repetições. Para análise do parâmetro peso fresco, foram consideradas 3 repetições de cada tratamento, escolhidas aleatoriamente, e a comparação de médias foi efetuada pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. As observações relativas ao número de explantes vivos e número de explantes diferenciados em raízes foram feitas sobre o total de 8 repetições por tratamento.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Número de Explantes Vivos

Conforme a TABELA 1, ao final de 35 dias, dos 200 explantes usados houve uma sobrevivência de 166, ou seja, 83%. Na ausência dos dois reguladores, dos 8 explantes utilizados, sobreviveram apenas 4 (50%). Quando ANA e cinetina foram adicionados isolados ou em combinações, o número de explantes vivos foi de 84%, evidenciando a importância dos reguladores do crescimento na sobrevivência e longevidade dos explantes de soja. Estes resultados podem ser relacionados aos efeitos da citocinina no retardamento da senescência

TABELA 1

Número de Explantes Vivos de Soja, *Glycine max* (L.) Merrill, após 35 Dias de Cultivo em um Meio Modificado de Murashige e Skoog, Contendo 10% de Água de Coco e Diferentes Concentrações de Ácido α -Naftalenoacético e Cinetina. Fortaleza, Ceará, Brasil, 1988.

| Cinetina (mg/l) | Ácido α -Naftalenoacético (mg/l) | | | | | Total |
|--------------------|---|-----|-----|-----|-----|-------|
| | 0,0 | 1,0 | 2,0 | 3,0 | 4,0 | |
| | | | | | | 36 |
| | | | | | | 31 |
| | | | | | | 37 |
| | | | | | | 32 |
| | | | | | | 30 |
| | 34 | 33 | 33 | | | |

em tecidos vegetais, segundo relato de van OVERBEEK¹⁹, LETHAM¹³, HELGESON⁹, WEAVER²², HALL⁸, SABATER & RODRIGUEZ¹⁸ e GROSSMAN & LESHEM⁷. O efeito da auxina também pode ser mencionado como um fator que contribui no retardamento da senescência, pois, segundo NOODÉN & THIMANN¹⁷, há evidências de sua ação na indução e formação de novas enzimas e proteínas.

Na presença de apenas cinetina, o número de explantes vivos foi de 97%, enquanto somente com ANA a sobrevivência foi de 100%. Tais resultados devem-se, provavelmente, à influência exercida pela presença da água de coco que, de acordo com ALMEHDI³, possui efeitos reguladores em cultura de tecidos, além de elementos nutrientes.

Verifica-se ainda na TABELA 1 que, a partir de 3,0 mg/l de cinetina em combinação com ANA, há uma tendência de redução do número de explantes vivos a medida que aumenta a concentração de cinetina. Tais resultados estão de acordo com os obtidos por ARAGÃO⁴ e ALBUQUERQUE².

Diferenciação em Calos

Ao final de 35 dias, 100% dos explantes vivos estavam diferenciados em calos. Esse resultado pode ser atribuído à importância da água de coco para a manutenção e crescimento dos explantes, pois, mesmo na ausência de ANA e cinetina houve diferenciação em calo. Segundo van OVERBEEK *et alii*²⁰ e BORREBAECK & LINSEFORS⁵, a água de coco promove o crescimento de embriões, em cultura de tecidos e contém hormônio endógeno, respectivamente.

Número de Calos Diferenciados em Raízes

Os dados da TABELA 2 mostram que, ao final de 35 dias, 16% dos explantes formaram raízes. Observa-se, também, que, na ausência dos dois reguladores de crescimento, não houve a formação de raízes, concordando com os resultados obtidos por JAYOS-RIOS¹¹ em cultura de calo de *Zea mays* L. A cinetina na ausência de ANA não induziu a diferenciação em raízes. No entanto, quando ANA foi adicionado na ausência de cinetina, 72% dos explantes

tes diferenciados em calos formaram raízes. Com o aumento da concentração de ANA até 3,0 mg/l, houve aumento no número de explantes diferenciados em raízes, com redução a partir deste nível.

TABELA 2

Número de Calos de Soja, *Glycine max* (L.) Merrill, Diferenciados em Raízes, após 35 Dias de Cultivo em um Meio Modificado de Murashige e Skoog, Contendo 10% de Água de Coco e Diferentes Concentrações de Ácido α -Naftalenoacético e Cinetina. Fortaleza, Ceará, Brasil, 1988.

| Cinetina (mg/l) | Ácido α -Naftalenoacético (mg/l) | | | | | Total |
|--------------------|---|-----|-----|-----|-----|-------|
| | 0,0 | 1,0 | 2,0 | 3,0 | 4,0 | |
| | | | | | | 23 |
| | | | | | | 3 |
| | | | | | | 0 |
| | | | | | | 0 |
| | | | | | | 0 |
| | 0 | | | 10 | 6 | |

Peso Fresco dos Explantes

A análise de variância do peso fresco dos explantes, conforme a TABELA 3, evidencia a existência de efeitos significativos para cinetina, ANA e a interação ANA x cinetina.

Os valores referentes ao peso fresco dos explantes são mostrados na TABELA 4. O exame à referida tabela evidencia que, na presença dos reguladores, o maior peso fresco total foi obtido com o maior nível de ANA, o qual, diferiu significativamente do nível 1,0 mg/l de ANA. De acordo com LEOPOLD & KRIEDMANN¹², o efeito da auxina no crescimento de calos *in vitro* é exercido através do alargamento celular e aumento não polar de volume. Já a água de coco, segundo VASIL & HILDEBRANDT²¹, é considerada uma excelente fonte de vários fatores do crescimento necessários para induzir a diferenciação em cultura de tecidos.

Com o aumento da concentração de cinetina, em combinação com ANA, observa-se uma tendência de redução do peso fresco dos explantes. Segundo WITHAM²³ este comportamento deve-se, provavelmente, ao fato de a auxina agir, inicialmente, como auxina e, secundariamente, estimular a síntese de citocinina, hipótese confirmada posteriormente por INOUE *et alii*¹⁰, trabalhando com tecidos de calos de arroz.

TABELA 3

Quadrados Médios da Análise de Variância, do Peso Fresco dos Explantes de Soja, *Glycine max* (L.) Merrill, Cultivados Durante 35 Dias, em um Meio Modificado de Murashige e Skoog, Contendo 10% de Água de Coco e Diferentes Concentrações de Ácido α -Naftalenoacético e Cinetina. Fortaleza, Ceará, Brasil, 1988.

| Fontes de Variação | G. L. | Q. M. |
|--------------------|-------|----------|
| | | 0,3758* |
| | | 0,4578** |
| | | 0,5566** |
| | | 0,1146 |
| Total | | |

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade.

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade

Quando cinetina foi adicionada na ausência de ANA, houve um aumento de peso fresco até a concentração de 2,0 mg/l, que embora não tenha diferido significativamente dos níveis mais altos, determinou uma redução no peso fresco, a partir desse nível. O teor de citocinina existente na água de coco provavelmente contribuiu para elevar os níveis de cinetina, não sendo portanto, necessários níveis mais altos para obtenção do máximo peso fresco.

Conforme os dados da TABELA 4, o maior peso fresco foi obtido quando se acrescentou apenas ANA, sendo a concentração de

3,0 mg/l aquela que proporcionou o maior peso. Para ALHOOWALIA¹, enquanto 2, 4-D é essencial nos primeiros estágios de regeneração da planta, a zeatina parece não ser importante senão no estágio de organogênese, indicando que, cada estágio parece ter um requerimento específico de reguladores de crescimento. Verificou-se, porém, que a adição dos dois reguladores ocasionou uma redução no peso fresco total, principalmente quando comparado ao peso fresco total observado com ANA e cinetina isoladamente. Provavelmente, esse efeito possa ter resultado de uma mudança de atividade fisiológica, ou seja, passou a haver maior atividade de divisão celular que de absorção, como conseqüência da adição de ANA e cinetina. Entretanto, a medida que a concentração dos reguladores foi aumentando até determinados níveis, houve uma resposta correspondente no aumento do peso fresco.

O maior peso fresco total foi observado quando os explantes foram tratados com somente ANA, onde verificou-se também um maior número de explantes diferenciados em raízes (TABELA 2). Esses resultados vão de encontro aos obtidos por GRINBLAT⁶, o qual observou uma relação inversa entre a quantidade de calos produzidos e o número de órgãos diferenciados. MATOS BRITO¹⁴ constatou também que os calos com maior crescimento pareciam mostrar menor tendência à diferenciação em órgãos.

TABELA 4

Peso Fresco (g) dos Explantes de Soja, *Glycine max* (L.) Merrill, após 35 Dias de Cultivo em um Meio Modificado de Murashige e Skoog, Contendo 10% de Água de Coco e Diferentes Concentrações de Ácido α -Naftalenoacético e Cinetina. Fortaleza, Ceará, Brasil. 1988.

| Cinetina (mg/l) | Ácido α -Naftalenoacético (mg/l) | | | | | Total |
|--------------------|---|-----|-----|-----|-----|----------|
| | 0,0 | 1,0 | 2,0 | 3,0 | 4,0 | |
| C | 0,477 b | | | | | 1,273 a |
| B | 0,278 b | | | | | 0,799 b |
| A | 1,644 a | | | | | 1,053 ab |
| A | 1,611 a | | | | | 0,994 ab |
| A | 0,968 ab | | | | | 0,932 ab |

Dois médias não seguidas pela mesma letra minúscula em cada coluna, ou não precedidas pela mesma letra maiúscula em cada linha, diferem significativamente, ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

CONCLUSÕES

- Após 35 dias, o número de explantes vivos diminuiu com o aumento da concentração de cinetina em combinação com ANA, e a maior porcentagem de explantes vivos foi observada com cinetina na concentração de 2,0 mg/l em combinação com os diferentes níveis de ANA;
- Na ausência dos reguladores não houve a formação de raízes, enquanto que, na ausência de cinetina, o enraizamento foi induzido em todos os níveis de ANA e
- O maior peso fresco foi obtido na ausência de cinetina e maiores concentrações de ANA.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AHLOOWALIA, B. S. Plant Regeneration from Callus Culture in Wheat. *Crop Science*, **22**: 405-10, 1982.
2. ALBUQUERQUE, M. C. F. Crescimento e Diferenciação de Tecidos de Feijão-de-Corda, "*Vigna sinensis*" (L.) Savi. in Vitro. Fortaleza, Universidade Federal do Ceará, (Tese de Mestrado), 1979. 72 p.
3. AL-MEHDY, A. A. Tissue Culture of Papaya, *Carica papaya* var. solo. Arizona, The University of Arizona, (M. S. Thesis), 1976, 61 p.
4. ARAGÃO, R. G. M. Growth and Morphogenesis of Jojoba, *Simmondsia chinensis* (Link) Schneid Shoot Tips in Vitro. Arizona, The University of Arizona, (Ph.D Dissertation), 1976. 114 p.
5. BORREBAECK, C. A. K. & LINSEFORS, L. Hormonal Regulation of Lectin Biosynthesis in Callus Culture of the *Phaseolus vulgaris* Plant. *Plant Physiol.*, **79**: 659-62. 1985.
6. GRINBLAT, U. Differentiation of Citrus Stem in Vitro. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, **97** (5): 599-603, 1972.
7. GROSSMAN, S. & LESHEM, Y. Y. Lowering of Endogenous Lipoxigenase Activity in *Pisum sativum* Foliage by Cytokinin as Related to Senescence. *Physiol. Plant.*, **43**: 359-62, 1978.
8. HALL, R. H. Cytokinins as a probe of Developmental Processes. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **24**: 415-44, 1973.
9. HELGESON, J. P. The Cytokinins. *Science*, **161**: 974-81, 1968.
10. INOUE, M., MAEDA, E., YOSHIDA, R. & ORITANI, T. On the Occurrence of a High Content of Cytokinins in Rice Callus Tissues. *Plant & Cell Physiol.* **20** (5): 917-24, 1979.
11. JAYOS-RIOS, E. Effets de Divers Traitements Phytohormonaux sur l'organogénese de Colonies Tissulaires du *Zea mays* L. *Annales des Sciences Naturelles*, Botanique, Paris, 13 Série 7: 55-62, 1985.
12. LEOPOLD, A. C. & KRIEDMANN, P. E. *Plant Growth and Development*. New York, Mc Grow-Hill, 1975. 545 p.
13. LETHAM, D. S. Chemistry and Physiology of Kinetin-Like Compounds. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **18**: 349-64, 1967.
14. MATOS BRITO, A. E. R. Estudos Sobre a Regeneração de Plantas de "*Vigna unguiculata*" (L.) Walp. ("*V. sinensis*" (L.) Savi ex Hassk a Partir de Suspensões Celulares. Fortaleza, Universidade Federal do Ceará (Tese de Mestrado), 1980. 70 p.
15. MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays With Tobacco Tissues Cultures. *Physiol. Plant.*, **15**: 473-97, 1962.
16. NOGGLE, G. R. & FRITZ, G. J. *Introductory Plant Physiology*. New Jersey, Prentice-Hall, 1976, 688 p.
17. NOODÉN, L. D. & THIMANN, K. V. Inhibition of Protein Synthesis and of Auxin-Induced Growth by Chloramphenicol. *Plant Physiol.*, **40** (1): 193-201, 1964.
18. SABATER, B. & RODRIGUEZ, M. T. Control of Chlorophyll Degradation in Detached Leaves of Barley and Cat Through Effect of Kinetin on Chlorophyllase Levels. *Physiol. Plant.* **43**: 274-6, 1978.
19. van OVERBEEK, J. Plant Hormones and Regulators. *Science*, **152**: 721-31, 1966.
20. van OVERBEEK, J., CONKLIN, M. E. & BLAKESLEE, A. F. Cultivation in Vitro of Small Datura Embryos. *American Journal of Botany*, **29**: 472-7, 1942.
21. VASIL, I. K. & HILDEBRANDT, A. C. Variations of Morphogenetic Behavior in Plant Tissue Cultures. I *Cichorium endivia*. *American Journal of Botany*, **53** (9): 860-9, 1966.
22. WEAVER, R. J. *Plant Growth Substances in Agriculture* San Francisco, W. H. Freeman, 1972, 594 p.
23. WITHAM, F. H. Effect of 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid on the Cytokinin Requirement of Soybean Cotyledon and Tobacco Stem Pith Callus Tissues. *Plant Physiol.*, **43**: 1455-7, 1968.