

**SOBREVIVÊNCIA DE ACESSOS DE AMENDOIM -  
*ARACHIS HYPOGAEA*,  
ATRAVÉS DE GERMINAÇÃO *IN VITRO***

**República Federativa do Brasil**

*Luiz Inácio Lula da Silva*  
Presidente

**Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**

*Roberto Rodrigues*  
Ministro

**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**

**Conselho de Administração**

*José Amauri Dimázio*  
Presidente

*Clayton Campanhola*  
Vice-Presidente

*Alexandre Kalil Pires*  
*Dietrich Gerhard Quast*  
*Sérgio Fausto*  
*Urbano Campos Ribeiral*  
Membros

**Diretoria-Executiva da Embrapa**

*Clayton Campanhola*  
Diretor-Presidente

*Gustavo Kauark Chianca*  
*Herbert Cavalcante de Lima*  
*Mariza Marilena T. Luz Barbosa*  
Diretores-Executivos

**Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**

*José Manuel Cabral de Souza Dias*  
Chefe -Geral

*Maurício Antonio Lopes*  
Chefe-Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento

*Maria Isabel de Oliveira Penteado*  
Chefe-adjunto de Comunicação e Negócios

*Maria do Rosário de Moraes*  
Chefe-Adjunto de Administração

***Boletim de Pesquisa  
e Desenvolvimento 57***

**SOBREVIVÊNCIA DE ACESSOS DE  
AMENDOIM - *ARACHIS HYPOGAEA*,  
ATRAVÉS DE GERMINAÇÃO *IN VITRO***

Gerson Renan de Luces Fortes

Fábio de Oliveira Freitas

Magali Ávila Fortes

José Francisco Montenegro Valls

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Serviço de Atendimento ao Cidadão

Parque Estação Biológica, Av. W/5 Norte (Final) –

Brasília, DF CEP 70770-900 – Caixa Postal 02372 PABX: (61) 448-4600 Fax: (61) 340-3624

<http://www.cenargen.embrapa.br>

e.mail:sac@cenargen.embrapa.br

### Comitê de Publicações

**Presidente:** *Maria Isabel de Oliveira Pentead*

**Secretário-Executivo:** *Maria da Graça Simões Pires Negrão*

**Membros:** *Arthur da Silva Mariante*

*Maria Alice Bianchi*

*Maria de Fátima Batista*

*Maurício Machain Franco*

*Regina Maria Dechechi Carneiro*

*Sueli Correa Marques de Mello*

*Vera Tavares de Campos Carneiro*

**Supervisor editorial:** *Maria da Graça S. P. Negrão*

Normalização Bibliográfica: *Maria Alice Bianchi e Maria Iara Pereira Machado*

**Editoração eletrônica:** *Maria da Graça S. P. Negrão*

1ª edição

1ª impressão (2004): 150 unidades

S 677 Sobrevivência de acessos de amendoim – *Arachis hypogaea*, através de germinação *in vitro* / Gerson Renan de Luces Fortes ... [et al.]. – Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2004. 15 p. – (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1676-1340; 57)

1. Amendoim. 2. Germinação *in vitro*. I. Fortes, Gerson Renan de Luces II. Série.

633.368 – CDD 21

**SOBREVIVÊNCIA DE ACESSOS DE  
AMENDOIM - *ARACHIS HYPOGAEA*,  
ATRAVÉS DE GERMINAÇÃO *IN VITRO***

*Gerson Renan de Lucas Fortes<sup>1, 2</sup>*

*Fábio de Oliveira Freitas<sup>1</sup>*

*Magali Ávila Fortes<sup>3</sup>*

*José Francisco Montenegro Valls<sup>1</sup>*

---

<sup>1</sup> Pesquisador da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

<sup>2</sup> Autor para correspondência

<sup>3</sup> Pós Graduanda da Universidade Federal de Pelotas

## Introdução

O amendoim (*Arachis hypogaea* L.) é uma leguminosa herbácea anual, de grande importância econômica ao país. O gênero *Arachis* possui sua origem em território brasileiro, sendo que a distribuição natural das espécies que o compõe se encontram todas em países da América do Sul, incluindo a espécie domesticada, cujo local de origem mais aceito atualmente é na região sul da Bolívia/ Norte da Argentina (KRAPOVICKAS e GREGORY, 1994).

Sendo um gênero tipicamente sul-americano, a coleta e conservação de amostras de suas espécies se faz não apenas necessária, como também é uma atitude estratégica. A Embrapa possui acessos de amendoim conservados em câmaras de baixa temperatura em diversos centros, onde suas sementes ficam disponibilizadas para caracterização morfológica e agrônômica e uso em programas de melhoramento genético.

Devido a problemas técnicos, durante alguns meses no ano de 1998, perdeu-se o controle da umidade interna de uma das câmaras de conservação de germoplasma de médio prazo, localizada na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, onde se encontravam ao redor de 800 acessos desta espécie oriundos de diferentes locais e datas de coleta.

Sem o controle efetivo da umidade da câmara ela chegou ao nível de 70% no seu interior, fazendo com que as amostras de sementes, que normalmente se encontravam com umidade ao redor de 10%, tivessem seu teor de umidade interno elevado. Associado a isto, períodos com falta de energia fizeram com que a temperatura interna da câmara se elevasse, estimulando fisiologicamente as

sementes a germinarem, e ativando também a ação de fungos e bactérias. Ambos processos foram inibidos com o retorno da temperatura aos níveis de conservação adequados.

Este choque de umidade e temperatura, durante aquele período, acarretou perdas do poder germinativo para os acessos conservados. Muitos deles, ao serem colocados para germinar, através de procedimentos padrões via papel umedecido em câmaras de germinação, ou não germinaram ou iniciaram a germinação mas foram drasticamente atacados por fungos e bactérias, matando as sementes.

Desta forma, este trabalho apresenta uma metodologia, através de técnicas de cultura de tecidos, com o intuito de resgatar parte daqueles acessos que não germinaram pelos métodos convencionais de germinação, assim como a apresentação dos resultados do trabalho de resgate e regeneração deste material.

### **Material e Métodos**

Trabalhou-se com amostras de sementes de 29 acessos de *Arachis hypogaea* provenientes da câmara de conservação de médio prazo, localizada na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Estas sementes foram originalmente procedentes de quatro países, Brasil, Bolívia, Colômbia e Peru e foram coletadas num período de abrangência de 19 anos (1980 à 1998). As sementes provenientes do Brasil foram coletadas nas mais diversas regiões abrangendo uma faixa que se estendia do Rio Grande do Sul ao Acre (Tabela 1).

**Tabela 1:** Acessos de germoplasma de amendoim usados nos testes de germinação e cultivo *in vitro* . Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

Nº	Acesso	Nome*	BRA-	País	Estado	Município	Localidade	Coleta	Observações
1	AW 3109	A H - -	039217	BRA	BA	Brumado		22.11.87	
2	AsW 433	A H - -	029530	BRA	RO	Guajará Mirim	PI Guaporé	16.12.88	Índios Jabuti, Tupari e Macurap
3	BdZa 487	A H - -	028428	BRA	SC			---	
4	Ct 1	A H - -	013005	BRA	GO	Niquelândia	Fazenda Delgado	---	
5	F.Lopes Coelho 1	A H H H	039241	BRA	PI	Santa Maria		22.10.87	
6	F.Lopes Coelho10	A H - -	039268	BRA	PI	Lage da Pedra	Bom que Dói	30.10.87	
7	Hp 1	A H - -	024970	BRA	SC	Xavantina		09.10.86	
8	Hp 2	A H - -	024961	BRA	SC	Xavantina		09.10.86	
9	MdSv 76	A H F F	010146	BRA	AC	Tarauacá	Colônia Cajueiro	05.05.80	
10	MdSv 136	A H F F	010201	BRA	AC	Rio Branco	(Mercado)	05.05.80	
11	MdSv 843	A H - -	039292	BRA	GO	Ceres (Bom Jesus)	Faz. Córrego do Café	07.08.85	
12	MdSv 908	A H - -	039322	BRA	GO	Colinas de Goiás	(Feira)	18.08.85	
13	MdW 996	A H H -	023078	BRA	RO	Ouro Preto d'Oeste		21.09.85	
14	Pr 1	A H - -	015148	BRA	RS	Osório	Itati	15.02.82	Campo Experimental Brazisul
15	R. Pimentel s/n-A	A H - -	039225	BRA	PA	Santarém	Feira de Produtores	19.04.91	
16	SvGr 250	A H H H	012025	BRA	MT	Barra do Garças	Aldeia Kukuene	01.08.81	
17	SvGr 251	A H H H	012033	BRA	MT	Barra do Garças	Aldeia Kukuene	01.08.81	
18	Sv 402 (A)	A H - -	032999	PER	LO	Iquitos		22.01.84	
19	Sv 451	A H F -	033081	COL		Corpor. Araraquara	Com.Ind.Hitotu-Curmani	11.03.84	Margem esquerda rio Caquetá
20	Sv 657	A H - -	023604	BRA	GO	Aurilândia		08.07.86	
21	Sv 2488	A H - -	038458	BRA	RN	Pau dos Ferros	(Mercado)	12.08.94	Produzido em São Miguel, RN
22	SvRb 4002	A H - -	036781	BRA	MA	Santa Inês		09.05.98	
23	SvRb 4071	A H - -	036811	BRA	MA	Presidente Dutra		13.05.98	
24	Vi 286	A H - -	015610	PRY	SP	Felipe Matienda ?		07.03.83	
25	Vi 308	A H - -	016586	BRA	MA	Santa Inês	Reserva Ind. Pindaré	03.09.83	Índios Guajajaras
26	Vi 309	A H H H	016594	BRA	MA	Santa Inês	Reserva Ind. Pindaré	03.09.83	Índios Guajajaras
27	Wi 631-b	A H F F	027685	BRA	AC	Cruzeiro do Sul	(ex-Mundo Novo, MS)	13.10.87	
28	Wi 698	A H H H	028720	BOL	SC	Ñuflo de Chávez	Yotaú	22.09.88	
29	Wi 763	A H F F	028924	BOL	LP	Iturrealde	Comunidad Napashi	21.10.88	Índios Tacana / rio Enadere

\*Nome: **A H** = *Arachis hypogaea*; **A H H** = *A. hypogaea* subsp. *hypogaea*; **A H H H** = *A. hypogaea* subsp. *hypogaea* var. *hypogaea*; **A H F** = *A. hypogaea* subsp. *fastigiata*; **A H F F** = *A. hypogaea* subsp. *fastigiata* var. *fastigiata*

O ensaio foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos (LCT1) da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia onde as sementes foram submetidas a uma desinfestação após um pré-tratamento com uma solução de sacarose 10% por 16 horas sob agitação, para induzir o desenvolvimento dos microrganismos tornando-os sensíveis a ação do desinfestante. Em seguida processou-se a desinfestação destes acessos com o emprego de hipoclorito de sódio a 2% de concentração por 20 minutos, seguido de um triplice enxágüe em água esterilizada (destilada e autoclavada). Cada acesso foi representado por uma amostra de dez sementes.

Em câmara de fluxo laminar contínuo procedeu-se a extração dos embriões que, em seguida, foram inoculados em tubos de ensaio (150 x 20 mm), com 5 mL do meio de cultura contendo sais de MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) adicionados das vitaminas B5 (GAMBORG et al., 1968), além de mio - inositol (100 mg/l), benzilamino purina (BAP) (2,0 mg/L), sacarose (20g/L) e ágar (7g/L).

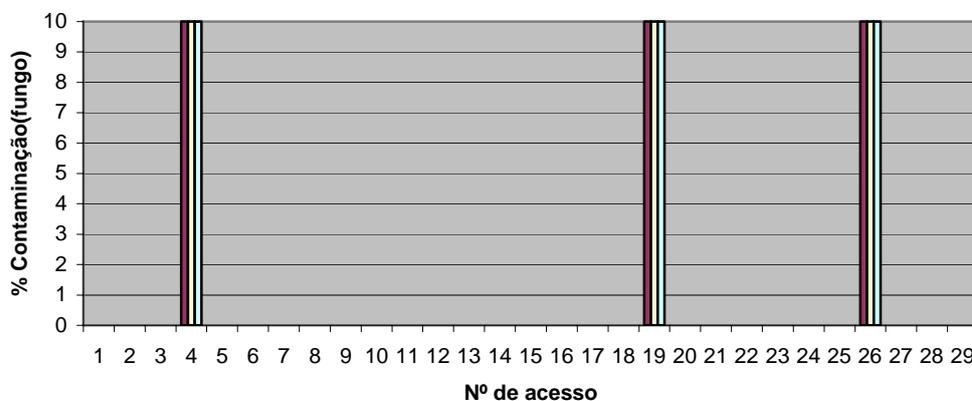
Após inoculação, todo material foi levado para sala de crescimento com temperatura de  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , fotoperíodo de 16 horas e luminância de aproximadamente 2000 lux.

As variáveis observadas foram: percentagem de contaminação por fungos; percentagem de contaminação por bactérias e percentagem de germinação (desenvolvimento dos embriões).

## **Resultados e Discussão**

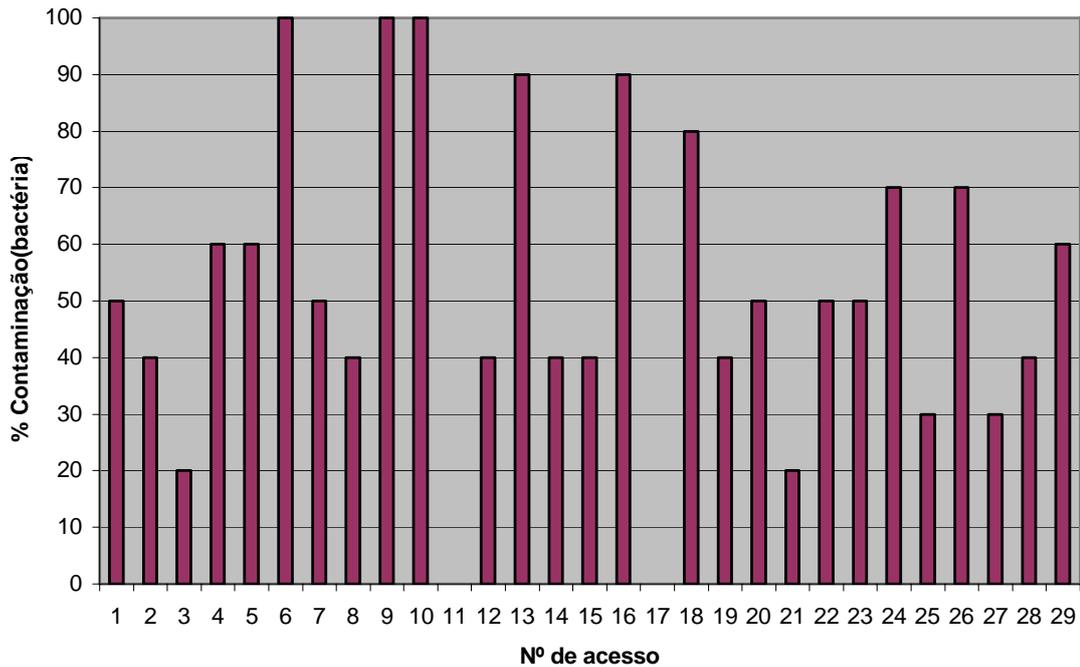
Na Figura 1, pode-se observar que a contaminação por fungo foi praticamente inexpressiva. Apenas três acessos (4, 19 e 26), o que corresponde a

cerca de 10% do total de acessos estudados, apresentaram uma contaminação de 10% na avaliação final. Este valor não variou desde a primeira observação aos três dias de instalado o ensaio. Danby e Leifert (1994) mostraram que em cultivo *in vitro*, este tipo de agente contaminante apesar de presente e causar danos não é tão importante como as bactérias. Fortes (1992) mostrou também que o emprego de hipoclorito de sódio no processo de desinfestação tem mostrado ser eficiente no controle de fungos no cultivo *in vitro*.



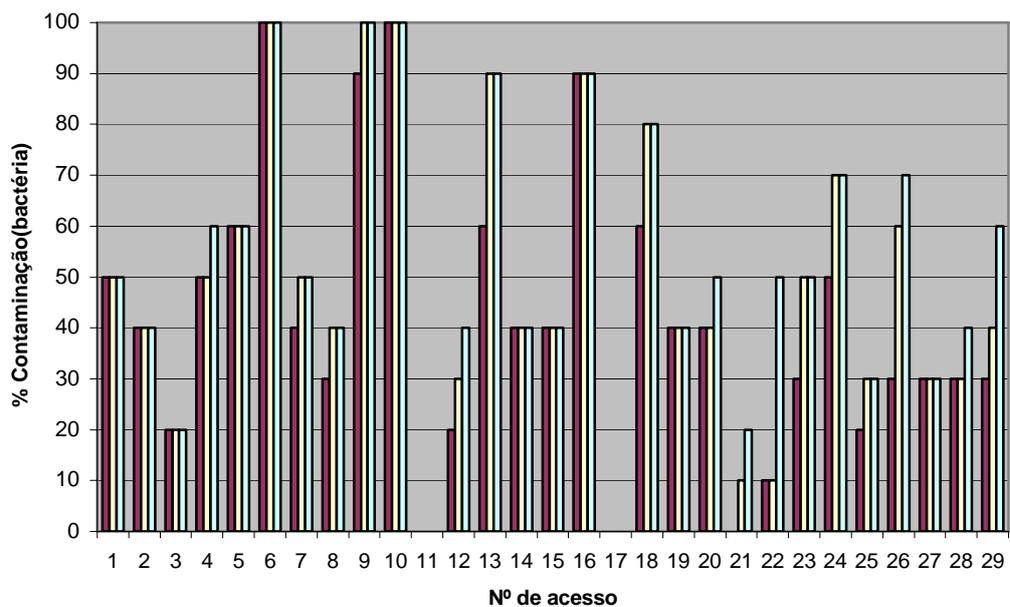
**Figura 1-** Percentagem de contaminação por fungos dos acessos de *Arachis* conforme observações aos 3, ( ) 6, ( ) 10 ( ) dias.

A contaminação bacteriana foi bem mais intensa (Figura 2). Vinte e sete acessos (cerca de 93% dos acessos estudados) apresentaram algum nível de contaminação, sendo que na maioria do material estudado, a contaminação variou de 10-90%. Os acessos 6 e 10 estavam 100% contaminados já na primeira avaliação, que ocorreu cinco dias após a inoculação. De um modo geral este tipo de contaminação é a que mais ocorre nos cultivos *in vitro*. Isto foi também observado por Danby et al. (1994) onde eles mencionaram que a grande incidência de contaminação no processo de cultivo *in vitro* se deve às bactérias.



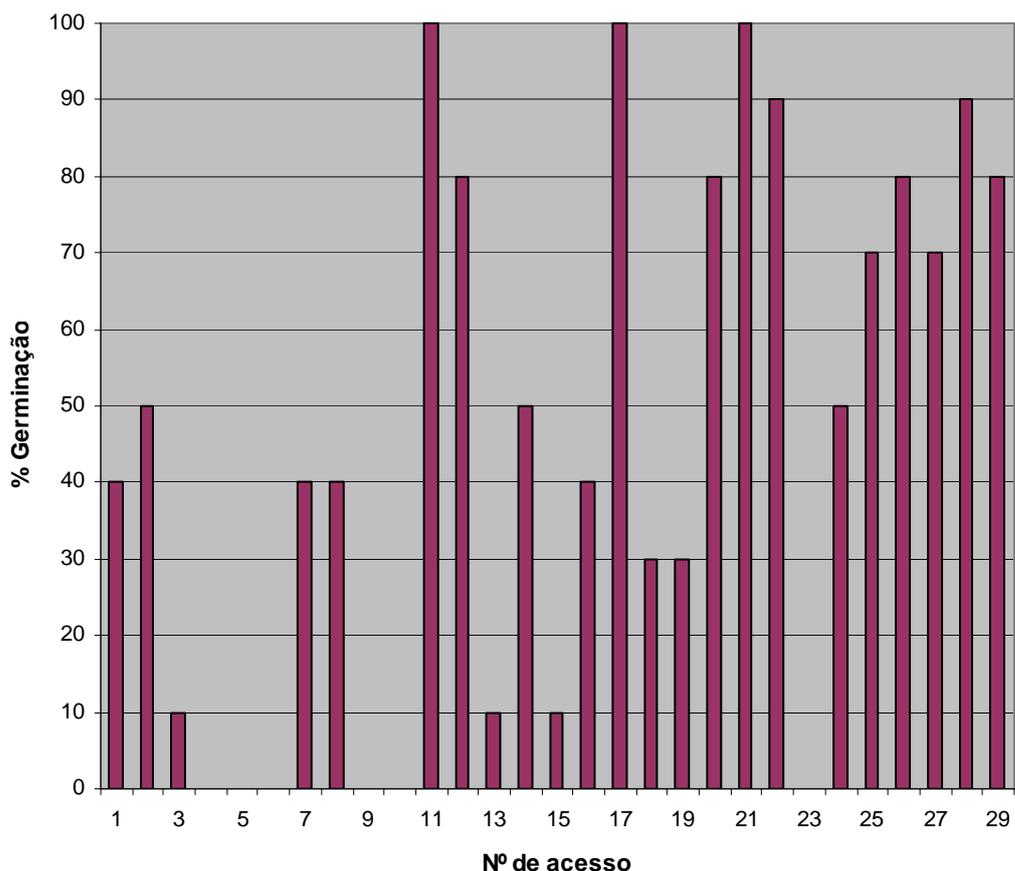
**Figura 2-** Percentagem de contaminação por bactérias de acessos de *Arachis* observados no final do ensaio (aos 10 dias).

Nestes casos, a evolução do nível da contaminação entre a primeira até a última avaliação (sete dias) foi pouco expressiva para a maioria dos acessos estudados (Figura 3). Ficou nítido que a contaminação, tanto por fungo, quanto por bactéria, se expressa nos primeiros dias de cultivo. Lengeler et al. (1999) mostraram que o desenvolvimento de culturas bacterianas em cultivos *in vitro* pode ser detectado de 15 horas à 1(um) dia após início do estabelecimento do cultivo.



**Figura 3-** Percentagem de contaminação por bactérias de acessos de *Arachis* conforme observações feitas aos 3, (■) 6, (■) e aos 10 (■) dias.

Os acessos 11, 17 e 21 apresentaram nítida evolução dos embriões com crescimento e desenvolvimento da parte aérea e sistema radicular como pode ser visto pelo percentual de desenvolvimento dos embriões (Figura 4). Mesmo com contaminação bacteriana em 20% dos tubos o acesso 21 conseguiu desenvolver-se.



**Figura 4-** Percentagem de germinação (desenvolvimento dos embriões) dos acessos de *Arachis* conforme observação realizada aos 10 dias.

Não houve desenvolvimento algum para os acessos 4, 5, 6, 9, 10 e 23. Nos dois primeiros a contaminação atingiu 60% dos embriões e nos quatro últimos 100%. Para os acessos 4 e 5 pode-se dizer que as sementes não estavam viáveis, pois, os embriões não contaminados não se desenvolveram. O tempo de armazenagem teve uma influência marcante para os acessos 5, 6, 9 e 10, acessos estes com 15 à 21 anos de conservação. Porém, os acessos 16 e 17 com 21 anos de conservação apresentaram 40 e 60% de germinação, respectivamente. Isto mostra de forma clara que a conservação de *Arachis* é função das condições ambientais mas também do genótipo, e, possivelmente, das condições das sementes quando do armazenamento. Desta forma, alguns acessos que estão sendo conservados,

necessitam de maiores cuidados ou de um período menor de permanência em câmaras de conservação conforme as informações deste ensaio experimental. As amostras 9 e 10 eram as mais antigas presentes na câmara com 22 anos de armazenadas. O tempo de armazenamento, associado ao problema na câmara pode estar influenciando na regeneração do germoplasma e indicando que as sementes de amendoim cultivado podem apresentar problemas naturais de conservação por períodos muito longos neste tipo de câmara de conservação a médio prazo, 5° C de temperatura e sem controle de umidade. A metodologia empregada para resgate de embrião com sementes armazenadas nas condições adversas mencionadas foi bem sucedida.

### **Agradecimentos**

Os autores são gratos à laboratorista Luciene Dionísio Cardoso pela ajuda na instalação do ensaio bem como na coleta dos dados.

### **Referências Bibliográficas**

DANBY, S.; BERGER, F.; HOWITT, D. J.; WILSON, A. R.; DAWSON, S.; LEIFERT, C. Fungal contaminants of Primula, Coffea, Musa and Iris tissue cultures. In: LUMSDEN, P. J.; NICHOLAS, J. R.; DAVIES, W. J. (Ed.). **Physiology, growth and development of plants in culture**. Dordrecht: Kluwer Academic Pub., 1994. p. 397-403.

DANBY, S.; LEIFERT, C. Latent bacterial infections: epiphytes and endophytes as contaminants of micropropagated plants. In: LUMSDEN, P. J.; NICHOLAS, J. R.; DAVIES, W. J. (Ed.). **Physiology, growth and development of plants in culture**. Dordrecht: Kluwer Academic Pub., 1994. p. 379-396.

FORTES, G. R de L. **Calogênese e organogênese *in vitro* de macieira (*Malus spp.*) afetadas por fatores físicos, químicos e biológicos**. 1992. 163 p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

GAMBORG, O. L.; MILLER, R. A.; OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. **Experimental Cell Research**, v. 50, p. 151-158, 1968.

KRAPOVICKAS, A.; GREGORY, W. C. Taxonomía del género *Arachis* (Leguminosae). **Bonplandia**, v. 8, p. 1-186, 1994.

LENGELER, J. W.; DREWS, G.; SCHLEGER, H. G. **Biology of the procaryotes**. London: Thieme, 1999. 955 p.

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