



Desinfestação de Sementes de Amendoim (*Arachis hypogaea*) Cultivadas *In Vitro*

Julita Maria Frota Chagas Carvalho¹
Cristiane Miranda Furtado²
Juliana Pereira de Castro³
Tatiana da Silva Santos⁴
José Wellington dos Santos⁵
Humberto Silva⁶

A cultura do amendoim (*Arachis hypogaea*) *in vitro* está sujeita ao ataque de inúmeros patógenos transmitidos, na maioria das vezes, através das sementes. A necessidade do desenvolvimento de protocolos para desinfestação das sementes se faz bastante necessário devido à ação de microrganismos que as atacam, reduzindo significativamente sua porcentagem de germinação.

No cultivo *in vitro* o elevado grau de assepsia é condição limitante em qualquer situação, já que fungos e bactérias encontram, no meio nutritivo utilizado, ambiente apropriado para se desenvolver rapidamente, culminando com a morte das culturas (TEXEIRA e TORRES, 1998). A assepsia das sementes pode ser realizada através de substâncias como o etanol e compostos à base de cloro (hipoclorito de sódio ou de cálcio), além de outros, como ácido clorídrico, cloreto de mercúrio e cloreto de benzalcônio (HOFFMANN, et al., 1998). A adição de detergente, como o tween 20, aumenta a penetração do desinfectante no tecido e a dilatação dos poros do propágulo, facilitando a penetração da solução de desinfectante (PASQUAL et al., 1997).

Com o presente trabalho, objetiva-se protocolar uma metodologia eficiente de desinfestação de sementes de amendoim, utilizando-se ou não álcool a 70%, e posterior imersão em hipoclorito de sódio em diferentes concentrações, cultivando-se as sementes completas ou os eixos embrionários, para obtenção de plântulas sadias *in vitro*.

Sementes da cultivar de amendoim BR-1 foram inicialmente lavadas com água corrente e sabão e, em seguida, mergulhadas ou não em álcool a 70% por um minuto, como um pré-tratamento e, posteriormente, imersas em soluções de hipoclorito de sódio durante 20 minutos, ao qual se adicionou uma gota de Tween 20 para cada 100ml de solução por 20 minutos. Utilizaram-se as seguintes concentrações de hipoclorito de sódio com ou sem a realização do pré-tratamento: 1,2% de cloro ativo (T₁); pré-tratamento + 1,2% de cloro ativo (T₂); 1,4 de cloro ativo (T₃); pré-tratamento + 1,4 de cloro ativo (T₄); 1,6 de cloro ativo (T₅); pré-tratamento + 1,6 de cloro ativo (T₆); 1,8% de cloro ativo (T₇); pré-tratamento + 1,8% de cloro ativo (T₈), somando ao todo, 8 diferentes tratamentos. Após a

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

²Graduanda em Ciências Biológicas UEPB, Campina Grande PB. PIBIC/CNPQ/UEPB.

³Graduanda em Ciências Biológicas UEPB

⁴Graduada em Estatística UEPB

⁵Agr. M.Sc. em Estatística, Embrapa Algodão, e-mail: jwsantos@cnpa.embrapa.br

⁶Eng. Agr. Prof. Dr. em Biotecnologia, Dep. de Farmácia e Biologia da UEPB.

desinfestação as sementes foram lavadas quatro vezes em água bidestilada estéril ficando, na última vez imersas durante 4h.

Após os procedimentos de esterilização cultivaram-se sementes com cotilédone ou eixos embrionários excisados das sementes, providos de cada tratamento de desinfestação, em meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) suplementado com 30 g/L de sacarose e 0,55% de ágar, e o pH ajustado para 5,8 utilizando-se NaOH ou HCL antes da autoclavagem, a 120 °C; em seguida, os tubos de ensaio foram fechados com tampa de polietileno e vedados com parafilme. As culturas permaneceram no escuro durante 72 horas e, depois, foram mantidas pelo período de 18 dias a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, com um fotoperíodo de 16h de luz/8h de escuro e intensidade luminosa de $30\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, até a formação da planta matriz.

Utilizaram-se 24 repetições por tratamento de desinfestação, dentre as quais 12 sementes cultivadas com cotilédone e 12 sem cotilédone (apenas o eixo embrionário), com uma semente por tubo, avaliando-se o índice de contaminação para cada tratamento em sementes cultivadas completas e em eixos embrionários. A variável contaminação de sementes foi submetida ao fator quantitativo (concentração de hipoclorito de sódio) à regressão polinomial e aos dados qualitativos (pré-tratamento e semente) aplicou-se à 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).

Na Tabela 1 tem-se os resultados obtidos em relação à variável contaminação de sementes de amendoim, da variedade BR-1, utilizando-se de diferentes metodologias de desinfestação.

De acordo com os resultados, pode-se comprovar que a realização do pré-tratamento com álcool a 70% não interfere no processo de desinfestação das sementes, apresentando-se estatisticamente não-significativo (Tabela 1.). Quanto à utilização de diferentes concentrações de hipoclorito de sódio, observou-se que à medida em que se aumentou a concentração de hipoclorito de sódio, reduziu-se o número de contaminação, sendo os melhores

Tabela 1. Valores Médios de Contaminação de Sementes da Cultivar de Amendoim BR-1 conduzida em diferentes tratamentos

Fatores	Médias ¹
Concentração	
1,2	1,164
1,4	1,147
1,6	1,095
1,8	1,026
Pré-tratamento	
Sem álcool	1,129 a
Com álcool	1,086 a
Semente	
Com cotilédone	1,164 a
Eixo embrionário	1,052 b

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

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

resultados providos do tratamento em que se utilizou a concentração 1,8% de cloro ativo (Figura 1.).

Na Tabela 1. observa-se, também, que a extração do eixo embrionário auxiliou no processo de desinfestação, possibilitando menor contaminação por microrganismos do que quando utilizado a semente completa, além de acelerar o processo de germinação. Estes resultados confirmam o estudo de Prasada Rao et al., 1995 com sementes de amendoim, onde ao utilizar o embrião maduro de

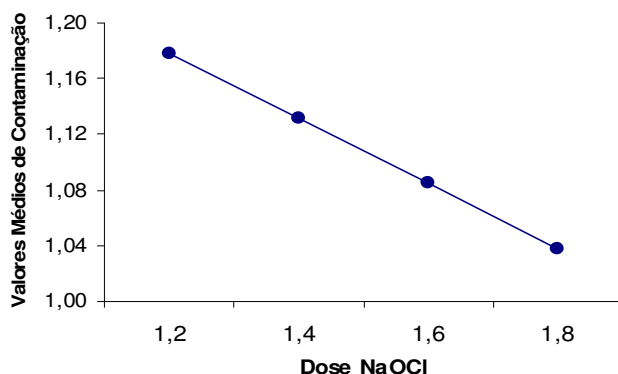


Fig.1. Representação gráfica dos valores médios de contaminação em função de dosagem crescente de NaOCl

amendoim, possibilitou a sua regeneração *in vitro* e a eliminação de vírus ao descartar os cotilédones.

Conclusões

- Os tratamentos em que se utilizou o pré-tratamento com álcool a 70%, não diferem estatisticamente dos tratamentos sem a presença do mesmo.
- Hipoclorito de sódio na concentração de 1,8% resultou em um pequeno índice de contaminação das sementes e, conseqüentemente, em maior obtenção de plântulas sadias.
- Ao se retirar o eixo embrionário das sementes, o índice de contaminação diminuiu consideravelmente.

Referências Bibliográficas

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

HOFFMANN, A.; PASQUAL, M.; CARVALHO, G.R.; CHALFUN, N.N.L.; RAMOS, J.D. **Aplicações na propagação de plantas**. Lavras, MG: UFLA/FAEPA, p. 50-55. 1998

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**. v. 15. p. 473-497. 1992.

PASQUAL, M.; HOFFMANN, A.; RAMOS, J.D. **Cultura de tecidos, tecnologia e aplicações**. Lavras, MG: UFLA/FAEPA, 1997. 159p.

PRASADA RAO, R.D.V.J.; PIO-RIBEIRO, G.; PITTMAN, R.; REDDY, D.V.R.; DEMSKI, J.W. *In vitro* culture to eliminate peanut stripe virus from peanut seed. **Peanut Science**, v. 22, p.54-56. 1995.

TEXEIRA, S.L.; TORRES, A.C. Organização do laboratório de cultura de tecido de plantas. IN: TORRES, A. C., CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de Tecido e Transformação Genética**. Brasília: Embrapa-SPI / Embrapa-CNPq, v.1. p. 71-86. 1998.

Comunicado Técnico, 248

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Algodão
Rua Osvaldo Cruz, 1143 Centenário, CP 174
58107-720 Campina Grande, PB
Fone: (83) 3315 4300 Fax: (83) 3315 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: Cristina Schetino Bastos
Fábio Akiyoshi Suinaga
Francisco das Chagas Vidal Neto
Gilvan Barbosa Ferreira
José Américo Bordini do Amaral
José Wellington dos Santos
Nair Helena Arriel de Castro
Nelson Dias Suassuna

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