

## Anais da I Jornada de Iniciação Científica da Embrapa Amazônia Ocidental



# ***Documentos 35***

## **Anais da I Jornada de Iniciação Científica da Embrapa Amazônia Ocidental**

Levy de Carvalho Gomes  
José Jackson Bacelar Nunes Xavier  
Marcos Vinícius Bastos Garcia  
Eduardo Lleras Pérez  
Luadir Gasparotto  
Adônis Moreira

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

**Embrapa Amazônia Ocidental**

Rodovia AM-010, km 29, Estrada Manaus/Itacoatiara

Caixa Postal 319

Fone: (92) 621-0300

Fax: (92) 3621-0320 / 3621-0317

www.cpa.embrapa.br

sac@cpaa.embrapa.br

**Comitê de Publicações da Unidade**

Presidente: José Jackson Bacelar Nunes Xavier

Membros: Adauto Maurício Tavares

Cíntia Rodrigues de Souza

Edsandra Campos Chagas

Francisco Célio Maia Chaves

Gleise Maria Teles de Oliveira

José Clério Rezende Pereira

Maria Augusta Abtibol Brito

Maria Perpétua Beleza Pereira

Paula Cristina da Silva Ângelo

Raimundo Nonato Vieira da Cunha

Sebastião Eudes Lopes da Silva

**Revisor de texto:** Maria Perpétua Beleza Pereira

**Normalização bibliográfica:** Maria Augusta Abtibol Brito

**Diagramação e arte:** Gleise Maria Teles de Oliveira

**Capa:** Doralice Campos Castro

**1ª edição**

**Todos os direitos reservados.**

**A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte,  
constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).**

**Cip-Brasil. Catalogação-na-publicação.  
Embrapa Amazônia Ocidental.**

---

Gomes, Levy de Carvalho et al.

Anais da I Jornada de Iniciação Científica da Embrapa Amazônia Ocidental / (editado por) Levy de Carvalho Gomes et al.

- Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2004.

137 p. (Embrapa Amazônia Ocidental. Documentos; 35).

ISSN 1517-3135

1. Pesquisa. 2. Ciência. I. Título. II. Série.

CDD 501

# Estabelecimento de protocolo para o cultivo *in vitro* do guaraná [*Paullinia cupana* (Mart.) Ducke]

Crystianne Bentes Barbosa<sup>(1)</sup> e Larissa Alexandra Cardoso Moraes<sup>(2)</sup>.

<sup>(1)</sup>Bolsista CNPq/Pibic; <sup>(2)</sup>Embrapa Amazônia Ocidental, Rodovia AM 010, km 29, Zona Rural, Caixa Postal 319, 69010-970. Manaus - AM. E-mail: larissa@cpaa.embrapa.br

**Resumo** - O desenvolvimento de protocolo que permita o cultivo do guaraná *in vitro* poderá contribuir para a redução dos custos de manutenção da conservação de germoplasma e ainda elevar a taxa de germinação e de sobrevivência das plântulas obtidas por meio de seleção recorrente. Para tal, foram inoculados, em diferentes meios de cultura, explantes obtidos de mudas estabelecidas em viveiro e segmentos de sementes contendo o embrião. No estabelecimento dos explantes, o tratamento com fungicida e antibiótico (benlate- 50 mg L<sup>-1</sup> e agrimicina- 150 mg L<sup>-1</sup>) apresentou taxa de 100% de contaminação pelos microorganismos endógenos e, ainda, alta em explantes previamente estiolados (74%). A maior taxa de germinação de sementes, que, em média, ocorreu aos 18 dias após a inoculação, foi de 25% (tratamento sem reguladores), sendo esse baixo valor atribuído à alta taxa de contaminação (75% - 95%). As plântulas obtidas foram transferidas para meios de multiplicação, obtendo-se brotação das gemas laterais apenas nos tratamentos com quebra da dominância apical. Houve taxa de 100% de enraizamento utilizando-se metade da concentração dos sais do meio de crescimento de Murashigue & Skoog no meio de crescimento, suplementado com 0,2 mg L<sup>-1</sup> de ácido indol acético.

**Termo para indexação:** guaraná, cultivo *in vitro*, micropropagação, melhoramento genético.

## Establishment of a protocol for the *in vitro* cultivation of guarana [*Paullinia cupana* (Mart.) Ducke]

**Abstract** - Establishment of a protocol for the *in vitro* cultivation of guarana (*Paullinia cupana*): the development of a protocol which enables the *in vitro* cultivation of guarana may contribute to the reduction the cost of germplasm maintenance and conservation as well as to increase the germination and survival rates of the seedling obtained through recurrent selection. For this purpose, expants from nursery plants and seed segments containing the embryo were inoculated in different cultivation media. In the establishment of explants, the treatment with fungicide plus antibiotic (benlate 50mg L<sup>-1</sup> and agrimicina 150 mg L<sup>-1</sup>) present 100% contamination with endogenous microorganisms and 75% with explants previously etiolated. The higher rate of seed germination, which occurred in average 18 days after inoculation, was 25% (treatment without growth regulators). This value being attributed to the high contamination rate (75%-95%). The seedling obtained were transferred to propagation media, the sprouting of lateral buds having occurred only with the suppression of the apical dominance. The rooting success was 100% with the use of half the salt concentration of the Murashigue Skoog in the growing medium supplemented with 0,2 mg L<sup>-1</sup> indolacetic acid.

**Index terms:** guaraná, *in vitro* culture, micropropagation, plant breeding.

## Introdução

O guaraná (*Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke) é uma espécie amazônica de relevante valor industrial, sendo o Brasil o único produtor comercial de guaraná do mundo, excetuando-se pequenas áreas de plantio na Venezuela e no Peru. Estima-se que a produção nacional esteja em torno de 2.492 toneladas/ano, das quais o Estado do Amazonas é responsável por aproximadamente 1.300 toneladas/ano. Atualmente, quase toda a produção nacional é consumida no mercado interno. Estima-se que da demanda nacional de amêndoas de guaraná cerca de 70% seja absorvida pelas fábricas de refrigerantes e o restante comercializado na forma de xarope, bastão, pó e extrato (Cravo, 2001).

O guaraná é uma cultura cultivada por pequenos e grandes produtores, destacando-se como um dos produtos de alto potencial econômico e de grande significado social no meio rural amazônico e nas outras regiões produtoras (Cravo, 2001).

O principal problema da cultura é a baixa produtividade, obtida com o uso de genótipos não melhorados. O programa de melhoramento obteve diversos clones, propagados por enraizamento de estacas, cuja utilização pode aumentar em até dez vezes os atuais índices de produtividade, além de serem genótipos com tolerância à principal doença do guaraná, a antracnose (Nascimento Filho et al., 2000). O programa de melhoramento dessa espécie consta de duas linhas de pesquisas: seleção recorrente intra-específica e seleções clonais, sendo a conservação de seu germoplasma, atualmente mantido *in vivo*, atividade fundamental como suporte a esse programa (Atroch, 2001).

A utilização da cultura de tecidos para a conservação de germoplasma tem sido especialmente útil para espécies propagadas vegetativamente, como batata (*Solanum tuberosum*), mandioca (*Manihot esculenta*) e alho (*Allium sativum*). Entre as vantagens do emprego dessa técnica inclui-se a redução dos custos e a facilidade do intercâmbio de germoplasma em condições assépticas (Torres, 1998).

O cultivo *in vitro* consiste em uma técnica

para desenvolver, em condições de laboratório, um segmento da planta chamado explante, partindo de um meio de cultura artificial, sólido ou líquido, sob condições ambientais controladas e total assepsia. Por meio dessa técnica é possível a obtenção de uma massa desorganizada de células em constante divisão e alongação, denominada calo. A formação de calo detém considerável importância como processo intermediário na organogênese, assim como em estudos de morfogênese, bioquímica, citologia, genética e etiologia de doenças nas plantas.

Conforme Bottino (1981), o calo ocorre naturalmente como resposta a injúrias, infestação de insetos ou patógenos, na união de um enxerto, ou pode ainda ser induzido colocando-se um pedaço de tecido vegetal dissecado em contato com um meio de cultura apropriado. Hartman et al. (1990) afirmaram que o calo é produzido nos explantes cultivados *in vitro*, como resultado do ferimento ocorrido por ocasião da dissecação do tecido e em resposta a reguladores do crescimento endógeno ou supridos pelo meio de cultura. Segundo Pasqual (1985), teoricamente qualquer parte da planta pode ser utilizada para iniciar a cultura de tecidos, porém melhores resultados são alcançados com tecidos mais jovens e ativos, que são prontamente estimulados e têm maior potencial morfogênético.

Dentre os problemas enfrentados na fase inicial de estabelecimento do explante *in vitro* destacam-se a contaminação e a oxidação fenólica. A contaminação pode ser por bactérias e fungos presentes na superfície dos tecidos de folhas, gemas e segmentos nodais ou ainda por microorganismos presentes no interior dos tecidos, conhecida como contaminação endógena. Este tipo de contaminação é mais freqüente em explantes derivados de plantas cultivadas no campo. Órgãos e tecidos com contaminação endógena são de difícil desinfestação (Torres et al., 1998).

A oxidação fenólica é um dos sérios problemas que podem dificultar o estabelecimento inicial do cultivo *in vitro*. A liberação de compostos fenólicos ocorre por dano causado nas células durante a excisão dos explantes. Algumas enzimas oxidam os fenóis formando quinonas (Maier & Metzler,

causarem a inibição do crescimento e morte dos explantes em grande número de espécies (Monaco et al., 1977).

Existem substâncias naturais das plantas que possuem atividade antioxidante. O ácido ascórbico, considerado antioxidante biológico, está presente em altas concentrações em muitos compartimentos celulares, como o estroma dos cloroplastos (Larson, 1988). A prevenção à oxidação pode ser obtida ainda com o uso de cisteína, outro antioxidante, ou de adsorventes como carvão ativado e polivinil pirrolidona (PVP) (Torres et al., 1998).

O objetivo deste trabalho foi determinar, para a cultura do guaranazeiro, as condições para estabelecimento *in vitro* de explantes provenientes de mudas de viveiro e germinação *in vitro* de sementes obtidas de seleção recorrente.

## Material e Métodos

Os experimentos foram desenvolvidos no laboratório de cultura de tecidos da Embrapa Amazônia Ocidental.

### Obtenção de explantes

Estacas dos clones CMU 300 e CMU 613, caracterizados como clones produtivos, resistentes a antracnose e de fácil enraizamento, foram coletadas do Banco Ativo de Germoplasma localizado na Embrapa Amazônia Ocidental do km 29, Rodovia AM 010, no Município de Manaus-AM. As estacas foram tratadas por 20 minutos em solução de Benomyl (50 mg L<sup>-1</sup>) e mais 20 minutos em solução de Agrimicina (150 mg L<sup>-1</sup>) para reduzir os microorganismos endofíticos. As pontas inferiores das estacas foram colocadas em contato com um hormônio enraizador (AIB 2000 ppm) e em seguida plantadas em tubetes suspensos contendo como substrato areia mais vermiculita autoclavadas (2:1). Durante o período em que permaneceram na casa de vegetação receberam aplicação quinzenal dos produtos comerciais Benlate 500 (4 g L<sup>-1</sup>) e Agrimicina (12 g L<sup>-1</sup>).

## Estabelecimento *in vitro* do guaranazeiro

### Meio acrescido de antibiótico

Foram utilizados como explantes ápices caulinares e segmentos nodais das mudas estabelecidas em viveiro. Esses explantes foram submetidos inicialmente a pré-tratamento de desinfestação por meio de imersão em Benomyl (5 g L<sup>-1</sup>), seguido do processo de assepsia na câmara de fluxo laminar, em diferentes concentrações de solução de água sanitária e álcool comercial.

Os ápices caulinares e os segmentos nodais foram seccionados em torno de 1,5 cm de comprimento inoculados em tubo de ensaio contendo 10 mL de meio. Nessa fase, foi testado o meio de cultura MS (Murashigue & Skoog, 1962), acrescido de 3% de sacarose, solidificado com 0,6% de ágar, pH 5,8, 250 g L<sup>-1</sup> de ácido ascórbico e Benomyl (0 g L<sup>-1</sup>, 1 g L<sup>-1</sup> e 2 g L<sup>-1</sup>), suplementado com 6-benzilaminopurina (BAP) (0 mg L<sup>-1</sup> e 0,1 g L<sup>-1</sup>). O experimento teve delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2 x 3 x 2 (dois explantes x três dosagens de Benomyl x duas dosagens de BAP), com 15 repetições por tratamento, sendo cada tubo uma unidade amostral contendo um explante. Ao final de 15 a 20 dias, as culturas foram avaliadas quanto ao vigor e porcentagem de explantes contaminados.

### Explante com estiolamento induzido

Folíolos jovens das mudas estabelecidas na casa de vegetação receberam uma cobertura em dupla camada de TNT da cor preta para induzir o estiolamento (Karam & Al-Majathoub, 2000) (Figura 1). Após duas semanas foram coletados e imersos em solução 5% de água sanitária.



Fotos: Larissa A. C. Moraes



**Figura 1.** Estiolamento de folíolo de muda de guaraná: a) cobertura com TNT; b) folíolo estiolado. Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus-AM, 2004.

Na câmara de fluxo laminar foram transferidos para solução de água sanitária 50% por 10 minutos e em seguida para solução de álcool 70% por 30 segundos e lavados três vezes com água destilada autoclavada.

Esses explantes foram segmentados em pecíolo e limbo foliar, sendo então imersos em solução de ácido ascórbico (0,2% e 1%) por 20 minutos. A inoculação foi feita em meio MS, contendo carvão ativado 0,025% e suplementado com 0,1 mg L<sup>-1</sup> de AIA. O experimento teve delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2 x 2 (dois explantes x duas dosagens de ácido ascórbico), com 28 repetições por tratamento, sendo cada tubo uma unidade amostral contendo um explante. Após 15 a 20 dias, as culturas foram avaliadas quanto ao vigor e porcentagem de explantes contaminados.

### Germinação in vitro de sementes de guaraná

As sementes receberam o mesmo tratamento de desinfestação descrito no item *Meio acrescido de antibiótico*. Na câmara de fluxo laminar, essas sementes tiveram parte de seu endosperma eliminado, em seguida foram inoculadas em tubo de ensaio contendo 10 mL de meio de germinação da seguinte composição sais e vitaminas de MS, 0,5% de carvão ativado e GA<sub>3</sub> (giberelina) (0 mg L<sup>-1</sup>, 1 mg L<sup>-1</sup> e 2 mg L<sup>-1</sup>). O experimento foi inteiramente casualizado com três tratamentos (diferentes dosagens de giberelina) e 15 repetições por tratamento, sendo cada tubo uma unidade amostral contendo um explante. As culturas foram avaliadas quanto à porcentagem de embriões germinados e porcentagem de contaminação.

### Multiplicação in vitro de plântulas de guaraná

A multiplicação foi induzida na parte aérea das plântulas germinadas no item anterior (Figura 2) pela inoculação em meio MS, acrescidos de 3% de sacarose, solidificado com 0,6% de ágar, pH 5,8 e suplementado com BAP (0 mg L<sup>-1</sup>, 0,5 mg L<sup>-1</sup>, 1 mg L<sup>-1</sup>, 2 mg L<sup>-1</sup> e 5 mg L<sup>-1</sup>). Foram realizados subcultivos a cada 30 dias. No segundo subcultivo foram retirados os ápices de metade das repetições de cada tratamento a fim de induzir a brotação das gemas laterais. As culturas foram mantidas a um fotoperíodo de 16 horas de luz/8 horas de escuro, sob intensidade luminosa de 3.000 lux e temperatura de 28°C ± 2°C. Foi observado o número de brotações por tratamento. O desenho experimental adotado será inteiramente casualizado com 10 tratamentos e 20 repetições.



Fotos: Larissa A. C. Moraes



**Figura 2.** Parte aérea de sementes de guaraná germinadas in vitro. Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus-AM, 2004.

### Enraizamento in vitro de plântulas de guaraná

As brotações obtidas no item anterior foram transferidas para os meios MS e ½ MS acrescidos de 0,025% de carvão ativado e suplementados com 0,1 mg L<sup>-1</sup> de AIA.

## Resultados e Discussão

### Estabelecimento in vitro do guaranazeiro

#### Meio suplementado com antibiótico

Os tratamentos utilizados não promoveram o efeito esperado, uma vez que, em 100% do experimento, não foi possível controlar a contaminação. Comprovadamente essa espécie apresenta número elevado de microorganismos endófitos (Cantarin et al., 1996), o que provavelmente contribuiu para a perda total do experimento.

#### Explante com estiolamento induzido

A taxa de contaminação foi alta em todos os tratamentos (74%). O tratamento segmentos foliares na ausência de ácido ascórbico apresentou perda adicional de 10% por oxidação, indicando a necessidade de tratamento antioxidante para esse tipo de explante, uma vez que o corte facilita a liberação de compostos fenólicos, provocando oxidação e morte do tecido vegetal.

Na Figura 3 estão representados os dois tipos de explantes em condições de serem

Fotos: Larissa A.C. Moraes

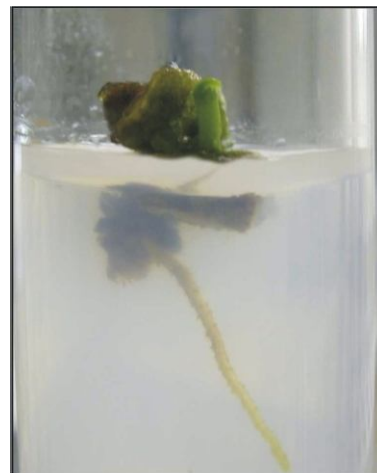


**Figura 3.** Explantes previamente estiolados, inoculados em meio MS. a) segmento de pecíolo com formação de calo na extremidade (seta); b) segmento de folíolo. Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus-AM, 2004.

### Germinação in vitro de sementes de guaraná

A germinação dos embriões ocorreu aos 18 dias após a inoculação, em todos os tratamentos, com percentagem de germinação mais alta (75%) no tratamento constituído de MS acrescido de 0,5% de carvão ativado, o que demonstra que a espécie não necessita de suplementação com

fitorreguladores indutores de germinação. Na Figura 4 pode-se notar o desenvolvimento inicial da plântula.



Fotos: Larissa A.C. Moraes

**Figura 4.** Embrião germinado aos 18 dias após a inoculação. Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus-AM, 2004.

### Multiplicação in vitro de plântulas de guaraná

Os tratamentos com as doses mais altas de BAP ( $1 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $2 \text{ mg L}^{-1}$  e  $5 \text{ mg L}^{-1}$ ) mostraram sintomas de toxidez, provavelmente pela alta concentração do regulador utilizado (Torres et al., 1998), com perda de 70% a partir do segundo subcultivo. Essa alta taxa de perda levou à eliminação desses tratamentos nas etapas seguintes do trabalho.

As brotações laterais ocorreram nos tratamentos cujos ápices foram decapitados, com ou sem a presença do BAP, indicando a pouca influência desse regulador no processo de indução de multiplicação.

### Enraizamento in vitro de plântulas de guaraná

O tratamento com metade das concentrações dos sais de MS promoveu 100% de enraizamento (Figura 5), enquanto o tratamento MS completo foi de 0%.





Fotos: Larissa A.C. Moraes

**Figura 5.** Formação de uma raiz sem ramificações secundárias. Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus-AM, 2004.

## Conclusão

O estabelecimento *in vitro* do guaraná poderá ser obtido com menor taxa de contaminação a partir de explantes obtidos de ramos estiolados de mudas enviveiradas.

É possível se reduzir o tempo de germinação de sementes de guaraná em 80% com a técnica de germinação *in vitro* sem a adição de reguladores de crescimento.

## Referências Bibliográficas

ATROCH, A. L. Principais resultados de pesquisa com a avaliação de clones de guaranzeiro no período de 1985 a 1994. In: REUNIÃO TÉCNICA DA CULTURA DO GUARANÁ, 1., 2001, Manaus, AM. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2001. p. 26-37. (Embrapa Amazônia Ocidental. Documentos, 16).

BOTTINO, P. J. **Methods in plant tissue culture.** Kensington, Maryland: Maryland Kemtec Educational Corporation, 1981. 74 p.

CANTARIN, V. G.; ASTOLFI FILHO, S.; PEREIRA, J. O. Variabilidade genética dos fungos endofíticos do guaraná: In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA DE MICROORGANISMOS, 1996, Caxambu. **Anais...** Caxambu: SBG, 1996. 1 CD.

CRAVO, M. S. Programa de pesquisa com a cultura do guaraná da Embrapa Amazônia Ocidental. In: REUNIÃO TÉCNICA DA CULTURA DO GUARANÁ, 1., 2001, Manaus, AM. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2001. p. 11-25. (Embrapa Amazônia Ocidental. Documentos, 16).

GEORGE, E. F.; SHERRINGTON, P. D. **Plant propagation by tissue culture: handbook and directory of Commercial Laboratories.** Basingstone: Exegetics Limited, 1984. 709 p.

HARTMANN, T. H.; KESTER, D. E.; DAVIES JR., F. T. **Plant propagation: principles and practices.** 5. ed. New Jersey: Englewood Cliff, 1990. 647 p.

HUSSEY, G. Problems and prospects in the *in vitro* propagation of herbaceous plants. In: WITHERS, L. A.; ALDERSON, P. G. **Plant tissue culture and its agricultural applications.** London: Butterworths, 1986. p. 69-84.

KARAM, N. S.; AL-MAJATHOUB, M. *In vitro* shoot regeneration from mature tissue of wild *Cyclamen persicum* Mill. **Scientia Horticulturae**, v. 86, n. 4, p. 323-333, 2000.

LARSON, R. A. The antioxidants of higher plants. **Biochemistry**, v. 27, n. 4, p. 969-978, 1988.

MAIER, V. P.; METZLER, D. M. Changes in individual date polyphenols and their relation to browning. **J. Food Sci.**, v. 30, p. 747, 1965.

LLOYD, G.; MCCOWN, B. Commercially Feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. **Comb. Proc. Intl. Plant Prop. Soc.** v. 30, p. 421-426, 1980.

MONACO, L. C. et al.. Applications of tissue culture in the improvement of coffee. In: REINERT, J.; BAJAJ, Y. P. S. **Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue, and organ culture.** Berlin: Springer-verlag, 1977. p. 109-126.

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

NASCIMENTO FILHO, F. J.; ATROCH, A. L.; CRAVO, M. S. **Melhoramento genético do guaranazeiro, resultados de ensaios de avaliação de clones, fase produtiva 1985 a 1994**. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2000. 54 p. (Embrapa Amazônia Ocidental. Boletim de Pesquisa, 7).

PASQUAL, M. Obtenção de plantas por cultura de tecidos. **Informe Agropecuário**, v. 11, n. 124, p. 63-68, 1985.

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: SPI, 1998. p. 864.

VASIL, I. K. Developing cell and tissue culture systems for the improvement of cereal and grap crops. **Journal of Plant Physiology**, Stultgart, v. 128, p. 193-218, 1987.