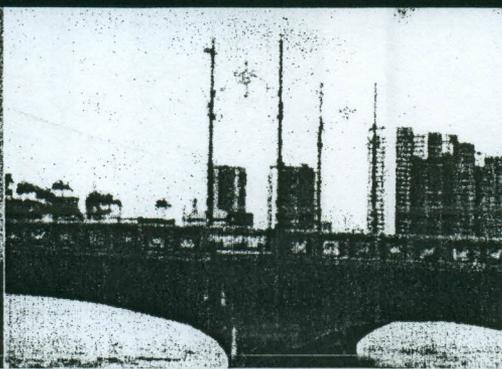
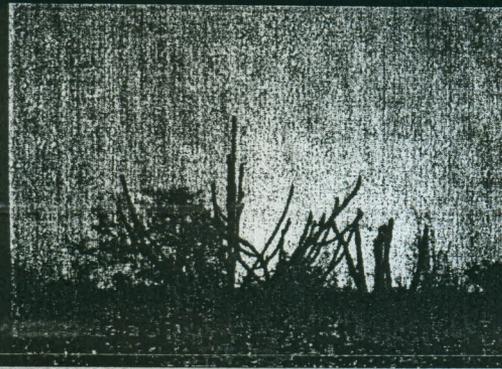


# Guia



# do

# Congressos



Estirolamento de Ramos visando o  
2005  
SP-S8500



CPAA-18316-1

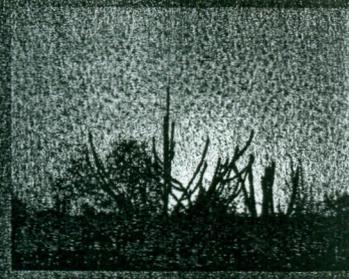
S  
8500

## X Congresso Brasileiro de Fisiologia

## XII Congresso Latino-Americano de Fisiologia

11 a 16 de setembro de 2005

Recife - Pernambuco - Brasil



640. INFLUÊNCIA DO MIMERCOTISMO NA PRODUÇÃO DE FRUTOS E SEMENTES DE *Solanum paludosum* MORIC - Rodrigues, M. F. V.; Almeida-Cortez, J. S.; Melo-de-Pinna, G. F. A.
641. INTERAÇÕES ENTRE FORMIGAS E *Solanum paniculatum* L. EM ÁREAS RUDERAIS DE FLORESTA ATLÂNTICA - Rodrigues, M. F. V.; Almeida-Cortez, J. S.; Melo-de-Pinna, G. F. A.
642. MINAS FOLIARES EM *Miconia ciliata* (RICH.) DC. (MELASTOMATACEAE) SÃO SENSÍVEIS A SAZONALIDADE CLIMÁTICA? - Braga, D. V.; Brito-Ramos, A.; Almeida-Cortez, J. S.
643. PHYTOACTIVITY OF SECONDARY COMPOUNDS IN AROMATIC PLANTS BY VOLATILE AND WATER-SOLUBLE WAYS OF RELEASE - Dias, A. S.; Dias, L. S.
644. PRETRATAMIENTO OSMÓTICO E INOCULACIÓN CON *AZOSPIRILLUM* DE SEMILLAS DE *LACTUCA SATIVA* L. COMO HERRAMIENTA PARA MEJORAR LA EMERGENCIA E IMPLANTACIÓN - Esesumaga, A.; Carrozzi, L.E.; Creus, C. M.; Rattin, J.; Barassi, C. A.

## Sessão Metabolismo primário e secundário

645. EFEITO DO 1-METILCICLOPROPENO SOBRE OS POLISSACARÍDEOS DA PAREDE CELULAR DE SAPOTI - Morais, P. L. D.; Lima, L. C. O.; Alves, R. E.; Alves, J. D.; Silva, J. D.
646. EFEITO DO ÁCIDO SALICÍLICO E DA FITOBACTÉRIA *Ralstonia solanacearum* NA ATIVIDADE DA POLIFENOLOXIDASE E NA SÍNTESE DE FENILPROPANOÍDES EM CULTURAS *in vitro* DE *Baccharis trimera* (LESS). DC - Füller, T. N.; Figueiró, A. de A.; Astarita, L. V.
647. EFEITOS DA COUMARINA SOBRE A GERMINAÇÃO, O CRESCIMENTO INICIAL E O METABOLISMO ENERGÉTICO DE *BIDENS PILOSA* L. (PICÃO-PRETO) - Ishii-Iwamoto, E. L.; Pergo, E. M.; Silva, L. J.; Voll, E.; Abraham, D.
648. EFEITOS DA SACAROSE E DO ÁCIDO MÁLICO SOBRE A MULTIPLICAÇÃO E ENRAIZAMENTO *in vitro* DE EXPLANTES DE *Selenicereus setaceus* (Salm-Dyck) A. Berger ex Werderm (Cactaceae) - Soares, C. Q. G.; Mendes, G. C.; Braga, V. F.; Ribeiro, C.; Nascimento, A. da C.; Peixoto, P. H. P.
649. EFEITOS DA SACAROSE E DO ÁCIDO MÁLICO SOBRE A MULTIPLICAÇÃO E ENRAIZAMENTO *in vitro* DE EXPLANTES DE *Selenicereus setaceus* (Salm-Dyck) A. Berger ex Werderm (Cactaceae) - Soares, C. Q. G.; Mendes, G. C.; Braga, V. F.; Ribeiro, C.; Nascimento, A. C.; Peixoto, P. H. P.
650. EFEITOS DE MIMOSINA NO CRESCIMENTO DAS RAÍZES E NAS ATIVIDADES DE PEROXIDASE DE SOJA - Andrade, A. B.; Finger, A.; Ferrares, M. L. L.; Ferrarese-Filho, O.
651. EFEITOS DO CÁLCIO NA LIGNIFICAÇÃO DE RAÍZES DE SOJA - Finger, A.; Ferrarese, M. L. L.; Andrade, A. B.
652. EFEITOS DO FÓSFORO E DO NITROGÊNIO NA PRODUÇÃO DE MATÉRIA SECA DE AVEIA PRETA - Romualdo, L. M.; Prado, R. de M.; Rozane, D. E.; Vale, D. W. do; Leal, R. M.; Silva, E. T.
653. ESTIOLAMENTO DE RAMOS VISANDO O CONTROLE DE CONTAMINAÇÃO NO ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE GUARANAZEIRO - Barbosa, C. B.; Moraes, L. A. C.; Ângelo, P. C. da S.; Sousa, N. R.
654. ESTUDO BIOQUÍMICO DAS PROTEÍNAS DE RESERVA E AMINOÁCIDOS SOLÚVEIS DE SORGO - Vendemiatti, A.; Ferreira, R. R.; Berdejo, B. D. A.; Leo, P. J.; Azevedo, R. A.
655. ESTUDO DO METABOLISMO DE COMPOSTOS NITROGENADOS EM TECIDOS DE *Lonchocarpus muehlergianus* EM RESPOSTA AO NITRATO - Bueno, D. R.; da Silva, T. G.; de Paula, J. A. C.; Azevedo, R. A.; Camargos, L. S.; Aguiar, L. F.
656. EXOGENOUS POLYAMINES AND ENDOGENOUS BIOCHEMICAL AND PHYSIOLOGICAL CHANGES IN *Araucaria angustifolia* EMBRYOGENIC CULTURES - Steiner, N.; Santa Catarina, C.; Floh, E. I. S.; Handro, W.; Guerra, M. P.
657. EXPRESSÃO DA ATIVIDADE DE POLIFENOLOXIDASE EM FOLHAS DE CAFÉ (*Coffea arabica*) E SUA RELAÇÃO COM RESISTÊNCIA A PRAGAS - Melo, G. A.; Mazzafera, P.
658. EXSUDAÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS POR DOIS CULTIVARES DE ARROZ (*Oryza sativa* L.), SUBMETIDOS A NÍVEIS TÓXICOS DE ALUMÍNIO - Alves, R. M. M.; Cambraia, J.; Cano, M. A. O.; Oliveira, J. A.
659. FENILPROPANOÍDES EM PLÂNTULAS *IN VITRO* DE *Piper solmsianum* - Balbuena, T. S.; Marques, J. V.; Santa-Catarina, C.; Silveira, V.; Kato, M. J.; Floh, E. I. S.
660. FLUTUAÇÃO DE CARBOIDRATOS NO CAQUIZEIRO "RAMA FORTE" EM CLIMA TROPICAL - Corsato, C. E.; Scarpare Filho, J. A.
661. FORMAS DE TRANSPORTE DO NITROGÊNIO EM PLANTAS JOVENS DE SERINGUEIRA - Alves, E. M.; Oliveira, L. E. M.; Mesquita, A. C.; Delú Filho, N.
662. IDENTIFICAÇÃO DE PORTA-ENXERTO CÍTRICO HÍBRIDO MELHOR ADAPTADO AO ECOSISTEMA DOS TABULEIROS COSTEIROS - Oliveira, J. G.; Matos, F. S.; Cerqueira, E. C.; Castro Neto, M. T.; Santos Filho, W. S.; Ledo, C. A. S.; Peixoto, C. P.
663. ÍNDICES DE ÁREAS FOLIARES EM VARIEDADES DE CANA-DE-AÇÚCAR EM FUNÇÃO DOS GRAUS DIAS ACUMULADOS E DA PRECIPITAÇÃO - Almeida, A. C. S.; Souza, J. L.; Moura Filho, G.; Teodoro, I.; Barbosa, G. V. S.; Cantalice-Souza, R.; Oliveira, M. W.; Brito, J. E. D.; Benatti, A. B.; Toledo Filho, M. R.
664. INDUÇÃO DE COMPOSTOS SECUNDÁRIOS EM *Hypericum perforatum* L. - Figueiró, A. de A.; Santarém, E. S.
665. INFLUÊNCIA DE FONTES DE NITROGÊNIO E LUZ SOBRE A ATIVIDADE DA NITRATO REDUTASE EM PLANTAS JOVENS DE MILHO - Carvalho, M. A. P.; Nascimento, R.; Tessmer, M.
666. INFLUÊNCIA DO SISTEMA DE CULTIVO ORGÂNICO SOBRE O TEOR DE SÓLIDOS TOTAIS E VITAMINA C EM FRUTOS DE MAMÃO (*CARICA PAPAYA* L.) - Giovannini, K. F. R.; Oliveira, J. G.; Souza, M. S.; Filho, A. G.; Berili, S. S.

# ESTIOLAMENTO DE RAMOS VISANDO O CONTROLE DE CONTAMINAÇÃO NO ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE GUARANAZEIRO

Crystianne Bentes Barbosa<sup>1</sup>; Larissa Alexandra Cardoso Moraes<sup>2</sup>, Paula Cristina da Silva Angelo<sup>2</sup>,  
Nelcimar Reis Sousa<sup>2</sup>

## INTRODUÇÃO

O guaranazeiro (*Paullinia cupana* var *sorbilis* (Mart.) Ducke) é uma espécie amazônica de relevante valor industrial, devido aos elevados níveis de cafeína nas sementes. As propriedades estimulantes e energéticas da cafeína natural motivaram a expansão do mercado de produtos derivados de guaraná e a exploração agrícola da espécie. A produção nacional de guaraná está estimada em 3.744 toneladas de sementes/ano (IBGE, 2003) e atende as demandas de matéria-prima para indústrias de refrigerantes e elaboração de produtos artesanais.

A conservação de germoplasma *in vivo* é uma atividade de alto custo, porém constitui a base genética dos programas de melhoramento de espécies com sementes recalcitrantes, como o guaranazeiro. A aplicação da cultura de tecidos para a conservação *in vitro* acrescenta algumas vantagens, como a redução dos custos e a facilidade do intercâmbio de germoplasma em condições assépticas. A contaminação por microorganismos e a oxidação fenólica destacam-se entre os principais problemas na fase inicial de estabelecimento de explantes *in vitro* (Torres et al., 1998).

O guaranazeiro apresenta elevado número de isolados endofíticos (Guimarães, 1998) e considerável conteúdo de compostos fenólicos (Carlson & Thompson, 1998), isso implica na necessidade de estudos adicionais para reduzir a interferência destas características no sucesso do estabelecimento *in vitro* da espécie. Benson (2000) destaca o excesso de compostos fenólicos e sua oxidação como os principais responsáveis pela recalcitrância *in vitro* (incapacidade de resposta a cultura de tecidos) de algumas espécies.

Os problemas de contaminação *in vitro* têm sido resolvidos com antibióticos e fungicidas, porém Ando & Murasaki (1983) sugerem que a contaminação causada por microorganismos endógenos também pode ser controlada pelo estiolamento da planta-matriz. Os efeitos do estiolamento incluem a coloração clara, alongamento dos internódios e aumento da suculência, proporcionando decréscimo na barreira mecânica dos tecidos do caule em consequência da menor lignificação, suberificação e espessura das paredes celulares (Maynard & Bassuk, 1996) predispondo esse tecido a uma desdiferenciação, condição ideal para uma proliferação celular anárquica levando à formação de calos friáveis (Kouadio et al., 2004).

---

(1) Bolsista CNPQ/PIBIC; (2) Pesquisadora, Embrapa Amazônia Ocidental, Cx. Postal 319, CEP 69 011 970  
([nelcimar@cpaa.embrapa.br](mailto:nelcimar@cpaa.embrapa.br))

Os objetivos deste trabalho foram testar preliminarmente o efeito do estiolamento nos ramos fornecedores de explantes e avaliar explantes de ramos estiolados na presença e ausência de antibiótico, visando o controle da contaminação no estabelecimento *in vitro* do guaranazeiro.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Três experimentos preliminares foram desenvolvidos no Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Amazônia Ocidental. O material vegetal utilizado foi o clone CMU 300, caracterizado como produtivo e resistente a antracnose. Inicialmente, foram testados dois tratamentos: ramos com e sem estiolamento como fonte de explantes (Experimento 1). Os ramos jovens receberam uma cobertura em dupla camada de TNT da cor preta durante quinze dias para indução de estiolamento. Os explantes não estiolados foram ápices caulinares e segmentos nodais, enquanto que segmentos de folha e de pecíolo foram os explantes estiolados. Os explantes foram imersos em uma solução de Benomil ( $5 \text{ gL}^{-1}$ ) para desinfestação, seguido de assepsia na câmara de fluxo laminar, com imersão em solução de álcool 70% por 30 segundos e em solução de água sanitária 50% por 10 minutos e, finalmente, lavados três vezes com água destilada e autoclavada.

A inoculação dos explantes foi em tubo de ensaio contendo 10 ml de meio de cultura MS (Murashigue & Skoog, 1962), contendo carvão ativado 0,025%, 3% de sacarose,  $250 \text{ mgL}^{-1}$  de ácido ascórbico, Benomil  $1 \text{ gL}^{-1}$  e solidificado com 0,6% de ágar, pH ajustado para 5,8. O delineamento foi inteiramente casualizado com 15 repetições por tratamento, sendo cada explante por tubo uma unidade amostral. Aos 20 dias, as culturas foram avaliadas quanto às porcentagens de explantes contaminados e não contaminados.

Nos experimentos seguintes, os tratamentos foram explantes de ramos estiolados na presença e ausência de antibiótico, sendo cada tipo de explante um experimento: segmentos de folha (Experimento 2) e segmento de pecíolo (Experimento 3). Os procedimentos de coleta, desinfestação e assepsia foram os mesmos descritos para o Experimento 1.

O meio de cultivo foi o MS (Murashigue & Skoog, 1962), contendo carvão ativado 0,025%, 3% de sacarose e solidificado com 0,6% de ágar em pH 5,8. Os antibióticos adicionados foram rifampicina, polimixina e cefatoxima na forma de discos de antibiograma, imersos em 20 mL de água destilada e autoclavada por 20 minutos. A solução passou por filtro de esterilização e foi acrescida ao meio após autoclavagem. O delineamento foi inteiramente casualizado com 70 repetições por tratamento, sendo cada explante por tubo uma unidade amostral. Aos 30 dias, os explantes foram avaliados quanto a percentagem de sobrevivência, contaminação e oxidação.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

---

Os explantes retirados de ramos sem estiolamento tiveram percentuais máximos de contaminação. Por outro lado, verificou-se que não houve a contaminação total nos explantes que foram submetidos a estiolamento, obtendo-se percentuais de não contaminados de 15% para segmento de folhas e 39% para segmento de pecíolo (Tabela 1). O efeito do estiolamento no controle de contaminação de cultivos *in vitro* foi estudado por (Murasaki & Tsurushima, 1988; Karam & Al-Majathoub, 2000), que conseguiram eliminar completamente a contaminação por microorganismos endógenos em explantes estiolados de pecíolo da espécie ornamental silvestre *Cyclamen persicum* Mill.

Apesar de a contaminação persistir, os resultados sinalizaram a possibilidade da utilização do estiolamento associado a outros tratamentos na tentativa de reduzir ao máximo a taxa de contaminação dos explantes no processo de estabelecimento *in vitro* do guaranazeiro.

TABELA 1 – Porcentagem de contaminados e não contaminados em dois tratamentos dos ramos fornecedores de explantes para o estabelecimento *in vitro* de guaranazeiro.

TRATAMENTOS	EXPLANTES			
	Ápices caulinares (%)		Segmentos nodais (%)	
RAMOS SEM ESTIOLAMENTO	Contaminados	Não Contaminados	Contaminados	Não Contaminados
		100	0	100
RAMOS COM ESTIOLAMENTO	Segmento de Folha (%)		Segmento de Pecíolo (%)	
	Contaminados	Não Contaminados	Contaminados	Não Contaminados
	85	15	61	39

O percentual de explantes sobreviventes (calo + sem calo) na combinação estiolamento de ramos na presença de antibiótico foi superior nos dois tipos de explantes, sendo 35% para segmento de folha contra 91% dos segmentos de pecíolos. No entanto, a presença de antibiótico não eliminou totalmente a contaminação dos explantes coletados em ramos estiolados, restando uma taxa de contaminados de 4% para segmentos de folha e 9% para segmentos de pecíolo (Tabelas 2 e 3).

TABELA 2 – Porcentagem de segmentos de folha, sobreviventes e descartados, no estabelecimento *in vitro* de guaranazeiro meio MS com e sem antibiótico.

TRATAMENTOS	SOBREVIVENTES (%)		DESCARTADOS (%)		TOTAL
	Com Calos	Sem Calos	Contaminados	Oxidados	
MS COM ANTIBIÓTICO	35	0	4	61	100

MS SEM ANTIBIÓTICO	0	0	0	100	100
--------------------	---	---	---	-----	-----

Além da contaminação, notou-se a ocorrência de elevadas taxas de oxidação, principalmente quando os explantes de ramos estiolados foram inoculados em meio sem antibiótico, com 100% de segmentos de folha e 76% de segmentos de pecíolo oxidados. No tratamento com antibiótico, os segmentos de folha também apresentaram 61% de oxidados, provavelmente pela maior concentração de compostos fenólicos em relação ao pecíolo (Tabelas 2 e 3).

TABELA 3 – Porcentagem de segmentos de pecíolo, sobreviventes e descartados, no estabelecimento *in vitro* de guaranazeiro meio MS com e sem antibiótico.

TRATAMENTOS	SOBREVIVENTES (%)		DESCARTADOS (%)		TOTAL
	Com Calos	Sem Calos	Contaminados	Oxidados	
MS COM ANTIBIÓTICO	30	61	0	0	100
MS SEM ANTIBIÓTICO	12	4	8	76	100

É importante salientar a formação de calos nos explantes de ramos estiolados mesmo sem a utilização de regulador de crescimento, principalmente nos tratamentos em que o estiolamento esteve associado à presença de antibiótico, observando-se a formação de calos em 35% em segmento de folha e 30% em segmento de pecíolo. A aplicação do estiolamento de explantes como indutor de calogênese tem sido comum no processo de propagação *in vitro* de algumas espécies. Cultura de pecíolos estiolados produziu calos mais vigorosos comparados aqueles provenientes de pecíolos não estiolados em *Cyclamen persicum* Mill. (Karam & Al-Majathoub, 2000).

## CONCLUSÕES

1. Houve uma redução na perda por contaminação com a utilização de explantes de ramos estiolados e aumento da perda por oxidação na maioria dos tratamentos.
2. O estiolamento dos ramos fornecedores do explante segmento de pecíolo eliminou totalmente a contaminação e oxidação quando o meio de cultura foi acrescido de antibiótico.
3. Estudos mais completos envolvendo a combinação dos tratamentos estiolamento de ramos, antibióticos e antioxidantes serão necessários para a obtenção de conclusões definitivas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDO, T.; MURASAKI, K. In vitro propagation of *Cyclamen* by the use of etiolated petioles. **Technical Bulletin of Faculty of Horticulture**, Chiba University, v. 32, p. 1-5. 1983.

BENSON, E. E. In vitro plant recalcitrance: an introduction. **In vitro Cellular and Development Biology - Plant**, v.36, n. 3, p. 141-148. 2000.

CARLSON, M.; THOMPSON, R.D. Liquid chromatographic determination of methylxanthines and catechins in herbal preparations containing guaraná. **Journal of AOAC**, v. 81, n. 4, p. 691-701. 1998.

GUIMARÃES, V. C. Isolamento de fungos endofíticos do hospedeiro (*Paullinia cupana* var *sorbilis* (Mart.) Ducke) e análise da variabilidade genética, detectada por marcadores RAPD, no endófito *Glomerella cingulata*. 1998. 115f. Dissertação (Mestrado em Genética, Evolução e Biologia Evolutiva) - Universidade Federal de São Carlos/Universidade do Amazonas, Manaus, 1998.

IBGE. **Produção agrícola municipal 2003**. Disponível em <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em 30 mai. 2005.

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

KOUADIO, J. Y.; KONÉ, M.; DJÈ, Y.; D'ALMEIDA, M. A.; ZOUZOU, M.L'étiolement est un facteur d'induction de l'embryogenèse somatique au cours de la callogenèse chez deux variétés récalcitrantes de cotonnier (*Gossypium hirsutum* L.) cultivées en Côte d'Ivoire. **Biotechnol. Agron. Soc. Environ.** v. 8, n. 3, p.155-162. 2004.

MAYNARD, B.K.; BASSUK, N.L. Effects of stock plant etiolation, shading, banding and shoot development on histology and cutting propagation of *Carpinus betulus*. **Journal of the American Society Horticultural Science**, v. 121, n 5, p. 853-860. 1996.

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.

MURASAKI, K.; TSURUSHIMA, H. Improvement on clonal propagation of cyclamen in vitro by the use of etiolated petioles. **Acta Horticulturae**, v.226, p. 721-724. 1988.

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