

Anais do I Seminário sobre Pesquisas com o Guaranazeiro na Amazônia



**I Seminário sobre Pesquisas com o
Guaranazeiro na Amazônia
6 e 7 de dezembro de 2005
Manaus - AM**

República Federativa do Brasil

Luiz Inácio Lula da Silva
Presidente

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Roberto Rodrigues
Ministro

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa

Conselho de Administração

Luis Carlos Guedes Pinto
Presidente

Silvio Crestana
Vice-Presidente

Alexandre Kalil Pires
Cláudia Assunção dos Santos Viegas
Ernesto Paterniani
Hélio Tollini
Membros

Diretoria-Executiva da Embrapa

Silvio Crestana
Diretor-Presidente

José Geraldo Eugênio de França
Kepler Euclides Filho
Tatiana Deane de Abreu Sá
Diretores-Executivos

Embrapa Amazônia Ocidental

Aparecida das Graças Claret de Souza
Chefe-Geral

Sebastião Pereira
Chefe-Adjunto de Administração

José Jackson Bacelar Nunes Xavier
Chefe-Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento

Mirza Carla Normando Pereira
Chefe-Adjunto de Comunicação e Negócios

Anais do I Seminário sobre Pesquisas com o Guaranazeiro na Amazônia

José Clério Rezende Pereira
Mirza Carla Normando Pereira
Murilo Rodrigues de Arruda

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Amazônia Ocidental
Rodovia AM-010, km 29, Estrada Manaus/Itacoatiara
Caixa Postal 319, CEP 69011-970, Mauas - AM
Fone: (92) 3621-0300
Fax: (92) 3621-0322 / 3622-1100
www.cpa.embrapa.br
sac@cpaa.embrapa.br

Comissão organizadora:

Presidente:

José Clério Rezende Pereira

Membros:

Mirza Carla Normando Pereira

Murilo Rodrigues de Arruda

Diagramação e arte: Gleise Maria Teles de Oliveira

1ª edição

1ª impressão (2005): 1.000 exemplares

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.**

Seminário sobre Pesquisas com o Guaranazeiro na Amazônia
(1.:2005, Manaus).

Anais do I Seminário sobre Pesquisas com o
Guaranazeiro na Amazônia /editores José Clério Rezende
Pereira, Mirza Carla Normando Pereira e Murilo Rodrigues de
Arruda. - Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2005.
1 CD-ROM ; 4 ¾ pol. 242 p.

1.Guaraná. 2. Paullinia cupana. 3. Congresso. I. Pereira,
José Clério Rezende. II. Pereira, Mirza Carla Normando. III.
Arruda, Murilo Rodrigues de. IV. Título.

CDD 633.7

Editores

José Clério Rezende Pereira

D.Sc. em Fitopatologia, Eng. Agrôn.,
Embrapa Amazônia Ocidental.
Gasparotto@cpaa.embrapa.br

Mirza Carla Normando Pereira

M.Sc. em Produção Vegetal, Eng. Agrôn.,
Embrapa Amazônia Ocidental,
mirza@cpaa.embrapa.br

Murilo Rodrigues de Arruda

M.Sc. em Fertilidade do Solo e Nutrição
de Plantas, Eng. Agrôn., Embrapa
Amazônia Ocidental,
murilo@cpaa.embrapa.br

Indução de *Callus* em Explantes de Mudanças Estioladas de Guaranazeiro

Paula Cristina da Silva Angelo¹, Larissa Alexandra Cardoso Moraes¹, Nelcimar Reis Souza¹

Introdução

O Brasil é praticamente o único produtor de guaraná do mundo, excetuando-se pequenas áreas plantadas na Amazônia venezuelana e peruana, onde existe o cultivo comercial da espécie (Embrapa, 1998). O guaranazeiro (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*) é uma alternativa agronomicamente viável para a utilização do ecossistema denominado de "terra firme" (áreas não inundáveis) na Amazônia, porque adapta-se às terras degradadas e pode constituir-se em um componente para cultivos múltiplos. Estima-se que a produção nacional de amêndoas esteja em torno de 5.000 toneladas/ano, com possibilidades de expansão, e que pode contribuir para a economia nacional em razão da existência de um mercado potencial capaz de absorver quantidades superiores à ofertada (Embrapa, 2002).

Desta forma, o guaraná se destaca como um dos produtos de alto potencial econômico e de grande significado social no meio rural amazônico, merecendo dedicação das instituições de pesquisa ao conhecimento da espécie, o que deve possibilitar a geração de tecnologia para seu cultivo racional. Atualmente, toda a produção nacional é consumida no mercado interno, sendo irrisória a quantidade exportada. Da oferta nacional de amêndoas de guaraná, cerca de 70% é absorvida pelos fabricantes de refrigerantes, enquanto os 30% restantes são comercializados sob a forma de xarope, bastão, pó e extrato.

Apesar dos revezes de mercado, que provocaram a diminuição da área plantada em 2.000 para 55% do que foi registrado no ano de 1.990, a produção aumentou mais de três vezes, durante o mesmo período, no Estado do Amazonas (dados do IBGE). Parte deste progresso está, certamente, associado com os resultados dos programas de pesquisa conduzidos pela UEPAE/Embrapa, desde a década de 70 (Atroch, 2001).

A tecnologia desenvolvida, no entanto, ainda é parcamente aproveitada. O domínio da técnica de clonagem por estaquia e o desenvolvimento de clones melhorados para produtividade, tolerância à antracnose e teor de cafeína, que foram recomendados pela Embrapa Amazônia Ocidental, foi um passo importante que pode ser complementado por um processo que possibilite a multiplicação mais rápida destes clones *in vitro*.

Objetivo

Definir combinações de AIA e BAP mais efetivas para induzir a formação de *calli* a partir de explantes de mudas estioladas de guaranazeiro.

¹Pesquisadora Embrapa Amazônia Ocidental. C.P. 319, CEP. 69011-970 Manaus, Amazonas. paula@cpaa.embrapa.br

Material e Métodos

Material vegetal: folhas, pecíolos e nervuras coletados de mudas do clone BRS-Amazonas estioladas e tratadas semanalmente com fungicida ("thiophanate methyl")

Assepsia: álcool a 70% por 30 segundos seguido de água sanitária (2% de cloro ativo) a 30% por 5 minutos.

Meios de cultura, arranjo experimental e análise estatística: MS (Murashigue & Skoog, 1962) modificado, com adição de amoxicilina e cefotaxima (100 µg/ml), carvão ativado (2,5 g/L), BAP (benzilaminopurina) e AIA (ácido indolacético). Os BAP foi acrescentado ao meio antes de autoclavar e o AIA depois de autoclavar. O experimento seguiu o arranjo em esquema fatorial com três níveis de BAP (0,1; 0,3 e 0,9 mg/L) e três níveis de AIA (0,3; 1,5 e 3,0 mg/L) e um tratamento controle onde não foram adicionados hormônios, sendo testados 401 explantes no experimento G2 e 400 explantes no experimento G3, 10 em cada placa de Petri de 90 mm de diâmetro. O "thiophanate methyl" foi adicionado ao meio de cultura nos dois experimentos, na concentração de 2 g/L, sem autoclavar no experimento G2 e depois de ser autoclavado no experimento G3. Foram anotados o número de explantes contaminados, oxidados e que geraram *calli*, no período de 2 de agosto a 17 de novembro de 2005. O teste do chi-quadrado de Pearson foi aplicado para determinar a significância da diferença entre a taxa de contaminação e o número total de *calli*

formados em cada experimento, utilizando o aplicativo GENES. O número de *calli* formados em cada tratamento foi dividido pelo total de *calli* de cada experimento para obtenção do número relativo de *calli* por tratamento e as médias por tratamento para os dois experimentos foram calculadas. Estas médias foram submetidas ao teste t de Student para verificar a significância da diferença com relação à média geral dos dois experimentos. Modelos de regressão foram submetidos à análise estatística para explicar o efeito de cada um dos hormônios e a interação entre eles, utilizando o aplicativo SYSTAT 11 ("trial version").

Resultados e Discussão

A taxa de contaminação de explantes foi de cerca 55% para o experimento G2 e 78% para o experimento G3. Estes resultados foram significativamente diferentes (Tabela 1) e o aumento da taxa de contaminação no G3 pode ter resultado da submissão do fungicida à autoclavagem.

Tabela 1. Teste do chi-quadrado para a taxa de contaminação de explantes do clone de guaranazeiro BRS-Amazonas, em dois experimentos de cultivo *in vitro* (Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus, 2005).

Experimento	Contaminados	Não contaminados	Probabilidade
G2	220	181	< 0,001
G3	311	89	< 0,001
	531	270	< 0,001

Apesar das mudas estarem recebendo aplicação de fungicida semanalmente, de estarem estioladas (Barbosa *et al.*, 2005) e de terem sido adicionados ao meio de cultivo fungicida e

antibióticos, as taxas de contaminação foram muito altas, o que obrigou à transferência dos explantes aparentemente axênicos para meio de cultura fresco em placas de Petri recém-preparadas, sempre que necessário para evitar a disseminação da contaminação. Os contaminantes mais freqüentes, que disseminaram mais rapidamente e mais danosos aos experimentos foram fungos.

A oxidação ocorreu em cerca de 26% dos explantes do G2 e ocorreu em menor percentagem no G3. Esta taxa é aceitável mas pode estar sendo mantida às custas de propiciar-se uma assepsia externa mais drástica ao material antes de inocular *in vitro*. O tratamento rápido com água sanitária tem sido útil para evitar oxidação, mas pode ser uma das causas da taxa alta de contaminação. Os sintomas de oxidação foram mais perceptíveis nos explantes oriundos de folhas. Uma boa parte deles e

dos explantes de nervuras e pecíolos, ainda que apresentando sintomas de oxidação, geraram *calli* do tipo II (Figura 1B, à esquerda do explante), que apresentam crescimento lento, são constituídos de células grandes de coloração esverdeada, são mais compactos mas não são secos, crescem a partir das extremidades dos explantes e são, uma vez formados, menos suscetíveis à oxidação.

A grande maioria dos *calli* obtidos foi, no entanto, do tipo I (Figuras 1A, 1B à direita do explante). Estes são extremamente friáveis, a proliferação das células não tem padrão definido e ocorre por toda a superfície dos explantes, principalmente dos explantes oriundos de pecíolo. Não são, aparentemente, gerados a partir de uma ou poucas células e apresentam tendência à oxidação muito acentuada. São constituídos de células pequenas, de conteúdo pouco denso e alongadas (Figura 1C).

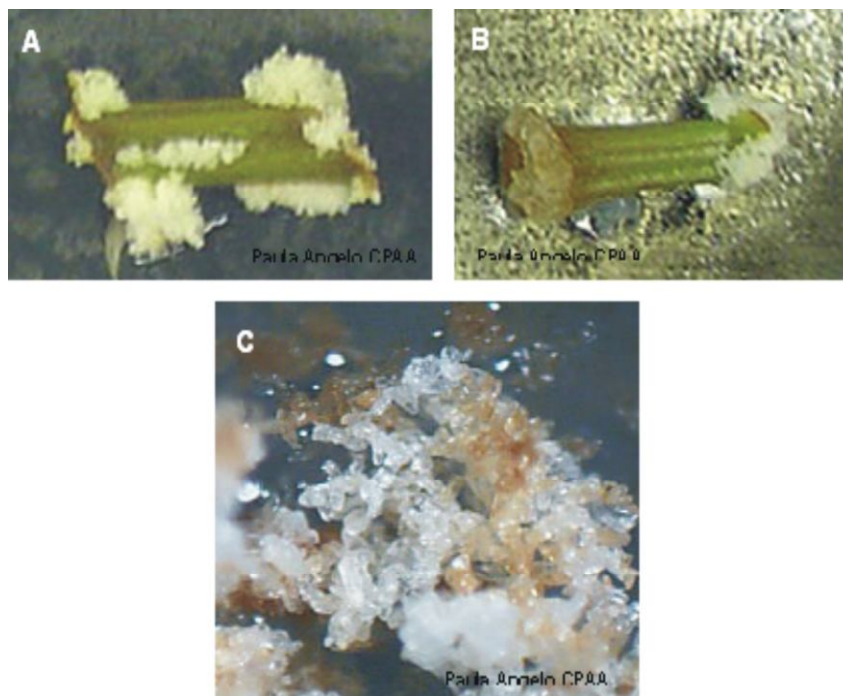


Figura 1 Explantes do clone BRS-Amazonas de guaranazeiro apresentando *calli* gerados *in vitro*. A - *calli* tipo I; B - *callus* tipo II na extremidade esquerda e tipo I na extremidade direita do explante; C - *callus* do tipo II, em aumento de aproximadamente 90 x. Em C observa-se algumas células com sintomas de oxidação (Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus, 2005).

Estes experimentos induziram *calli* em um maior número de explantes de mudas estioladas do BRS-Amazonas do que havia sido anteriormente registrado (Barbosa *et al.*, 2005). O número de *calli* produzidos foi significativamente diferente para os dois experimentos (chi-quadrado 20,14; P= 0,004) e por isto foi utilizado o número relativo ao total produzido em cada experimento para as análises em conjunto (Tabela 2). A média dos tratamentos 1, do 6 e do 9 foi superior à média geral e a média dos tratamento 7 e do 8 foi inferior (Tabela 2).

Tabela 2. Número total e relativo de *calli* produzidos por explantes do clone de guaranzeiro BRS-Amazonas, em dois experimentos de cultivo *in vitro* em meio contendo combinações de doses de hormônios (Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus. 2005).

TRAT	BAP	AIA	CALLI	
			Total	No. Relativo**
1	0,1	0,3	19	0,20769 *
2	0,1	1,5	6	0,09231
3	0,1	3,0	7	0,11538
4	0,3	0,3	6	0,09538
5	0,3	1,5	8	0,09846
6	0,3	3,0	21	0,16154 *
7	0,9	0,3	4	0,03077 *
8	0,9	1,5	1	0,04000 *
9	0,9	3,0	13	0,18615 *
10	0	0	5	0,07692
total			90	1,105
média			9,00	0,11046
desvio padrão			6,57	0,05865

*Valores significativamente diferentes da média (P=0,05)

**Média da quantidade relativa de *calli* dos experimentos

A regressão foi testada para explicar o efeito do BAP, do AIA e da interação entre os dois hormônios. O modelo só foi significativo para a interação (P = 0,01). A probabilidade de tratar-se de interação não-linear foi de 0,041. Aplicando a hipótese de que a interação entre os hormônios poderia ser explicada por um modelo quadrático foi

gerado o gráfico apresentado na Figura 2. As curvas foram limitadas à amplitude dos dados e ajustadas para cobrir o intervalo de confiança de 95% de variação entre o número relativo de *calli* obtidos por tratamento em cada experimento.

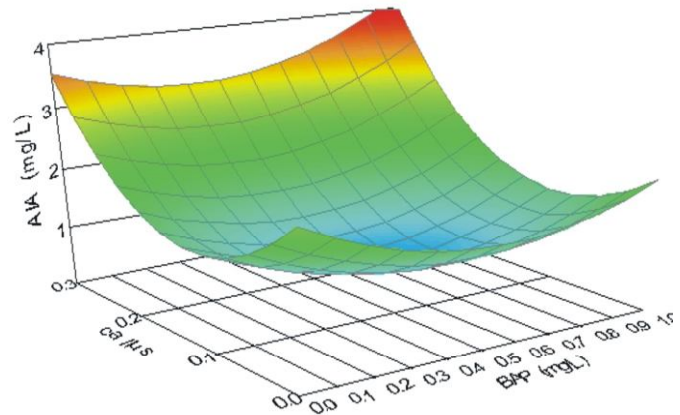


Figura 2. Representação gráfica do resultado da combinação de concentrações de AIA e BAP para a geração de *calli* oriundos de explantes de tecidos do clone BRS-Amazonas de guaranzeiro. As curvas de regressão foram construídas com a inclusão da dose 0 (zero) dos hormônios (Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus. 2005).

Nos experimentos aqui descritos, explantes submetidos ao cultivo sem adição de hormônios (tratamento 10) produziram *calli* e com média superior à dos tratamentos 7 e 8. Considerou-se, então, que explantes de mudas estioladas do BRS-Amazonas adquiriram competência para a geração de *calli in vitro*, ou, pelo menos, para suportar a proliferação de células não diferenciadas, independentemente da adição de reguladores ao meio de cultivo, resultado já extensivamente observado no Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Amazônia Ocidental (Barbosa *et al.*, 2005).

Tomando o resultado dos testes de Student e a conformação da curva de regressão concluiu-se que a adição de hormônios em concentrações muito baixas (tratamento 1) e nas concentrações mais altas testadas geraram resultados

semelhantes. A superação do balanço endógeno de hormônios, que possibilita o aparecimento de *calli* espontaneamente pode ter ocorrido onde pelo menos 0,3 mg/L de BAP foi fornecido no meio de cultivo e a interação entre os dois reguladores fornecidos foi mais efetiva sempre que a concentração mais alta de AIA foi testada, o que explicaria a média alcançada pelos explantes submetidos ao tratamento 9. Excetuando-se o resultado do tratamento 1, observou-se que os tratamentos mais efetivos (6 e 9, Tabela 2) foram aqueles em que o AIA foi utilizado em concentração de 3,0 mg/L.

Sugere-se que a utilização de meio de cultivo com concentração muito baixa de BAP e AIA não alterou a competência adquirida pelos explantes para a produção de *calli*, o que explicaria a média superior do tratamento 1.

Conclusão

Combinações de hormônios efetivas para induzir, em explantes oriundos de mudas estioladas do clone BRS-Amazonas de guaranazeiro, a formação de *calli*, devem incluir pelo menos 0,3 mg/L de BAP e 3,0 mg/L de AIA, em meio MS modificado.

Agradecimentos

Fapeam pelo apoio financeiro (processo 924/03). Jeferson Chagas da Cruz, Rosimar de Souza Carvalho e Hilma Alessandra Rodrigues do Couto, Laboratoristas.

Literatura Citada

BARBOSA, C.B.; MORAES, L.A.C.; ANGELO, P.C.S.; SOUSA, N.R. 2005. Estiolamento de ramos visando o controle de contaminação no estabelecimento in vitro de guaranazeiro. **X Congresso de Fisiologia Vegetal**, resumo 653.

ATROCH, A. Situação atual da cultura do guaraná no Estado do Amazonas. In: **1a. Reunião Técnica da Cultura do Guaraná. Embrapa Amazônia Ocidental**. Manaus/AM: Embrapa Amazônia Ocidental, 2001. p.16-27. (Série Documentos, no. 16).

EMBRAPA Amazônia Ocidental (Manaus, AM). **Agricultura familiar na Amazônia Brasileira: clones de guaraná, tecnologia sustentável para a Amazônia**. Manaus, 2002. 2p.

EMBRAPA. Centro de Pesquisa Agroflorestral da Amazônia Ocidental (Manaus, AM). **Sistema de produção para o guaraná**. Manaus, 1998. 34p. (Série Documentos, no. 13).