

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

P. C. da S. Angelo¹; L. A. C. Moraes¹; N. R. 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 a 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 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, no Amazonas, em 2000 para 55% do que foi registrado no ano de 1990, a produção aumentou mais de três vezes, durante o mesmo período, no Estado do Amazonas (IBGE, 2003). Parte deste progresso está, certamente, associado com os resultados dos programas de pesquisa conduzidos pela 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 quanto à produtividade, tolerância à

¹Pesquisador da Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus-AM, paula.angelo@cpaa.embrapa.br

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 (ácido indolacético) e BAP (benzilaminopurina) mais efetivas para induzir a formação de *calli* a partir de explantes de mudas estioladas de guaranazeiro.

Material e Métodos

Material vegetal: foram utilizados folhas, pecíolos e nervuras coletados de mudas do clone BRS-Amazons estioladas e tratadas semanalmente com fungicida ("thiophanate methyl"), mantidas em casa de vegetação na Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus - AM.

Assepsia: os explantes foram realizados com álcool etílico 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: os tecidos foram cultivados em meio MS (Murashigue & Skoog, 1962) modificado, com adição de amoxilina e cefotaxima (100 µg/ml), carvão ativado (2,5 g/L), BAP (benzilaminopurina) e AIA (ácido indolacético). O BAP foi acrescentado ao meio antes de autoclavar e o AIA depois de autoclavar. O experimento seguiu o arranjo 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, sendo 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 por fungos e bactérias, oxidados e que geraram *calli*, no período de 02 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 explantes com *calli* em cada experimento, utilizando o aplicativo GENES. O número de explantes com *calli* por tratamento foi dividido pelo total de cada experimento para obtenção do número relativo e, em seguida, as médias por tratamento foram calculadas. Estas médias foram submetidas ao teste t de Student para verificar a significância da diferença com relação à média geral. 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 aproximadamente 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 frequentes, que disseminaram mais rapidamente e mais danosos aos experimentos foram fungos.

A oxidação ocorreu em cerca de 26% dos explantes do G2 e em menor porcentagem no experimento 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 (5 minutos) com água sanitária tem sido útil para evitar oxidação, mas pode ser uma das causas da alta taxa 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 (Fig. 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 (Fig.s 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 daqueles 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 (Fig. 1C).

Fotos: Paula Angelo

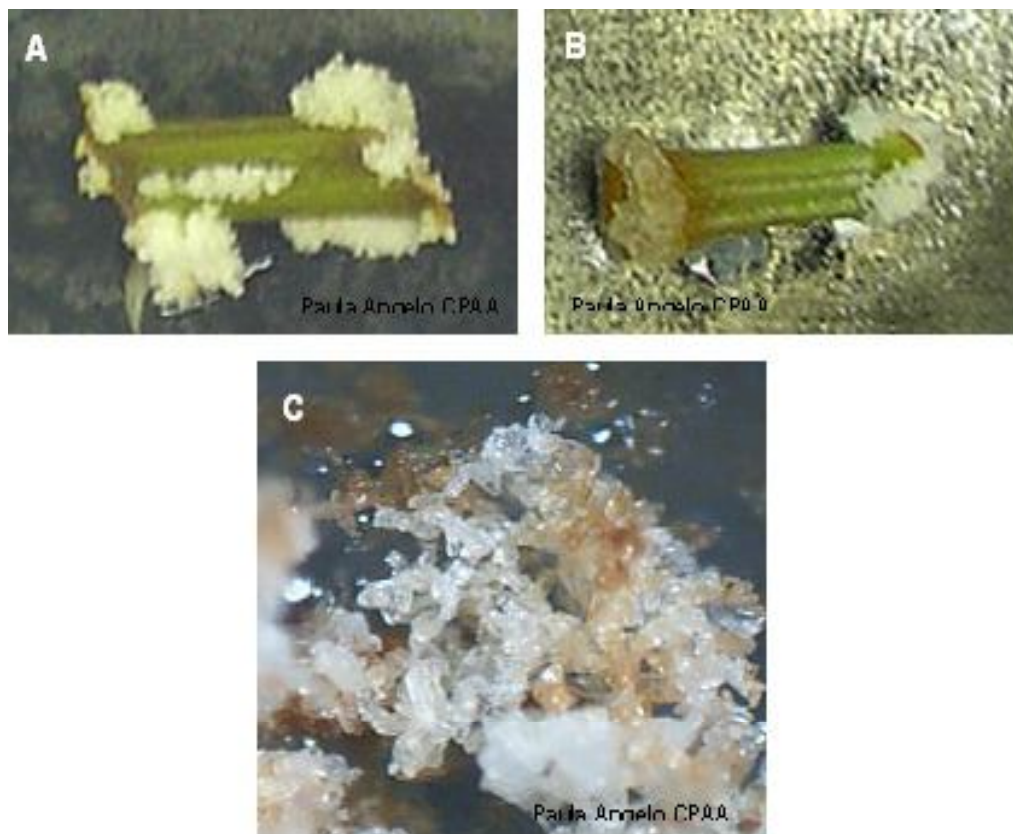


Fig. 1. Explantes do clone BRS-Amazons de guaranazeiro apresentando *calli* gerados *in vitro*. A - *calli* tipo I; B - *callus* tipo II na extremidade esquerda e tipo I na extremidade direita do explante; C - *callus* do tipo I, em aumento de aproximadamente 90 x. Em C observa-se algumas células com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

Nesses experimentos houve um maior número de explantes com *calli* do que havia sido anteriormente registrado (Barbosa *et al.*, 2005). O número de explantes com *calli* no experimento G2 e no G3 foi significativamente diferente (chi-quadrado 20,14; $P = 0,004$) e por isto foi utilizado o número relativo ao total por experimento para as análises em conjunto da efetividade dos tratamentos. 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 explantes do clone de guaranazeiro BRS-Amazonas que apresentaram *calli*, em dois experimentos de cultivo *in vitro* em meio contendo combinações de doses (mg/L) de hormônios (Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus, 2005).

| Trat | BAP | AIA | Explantes com <i>Calli</i> | |
|---------------|-----|-----|----------------------------|----------------|
| | | | 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 ($P = 0,05$).

**Número relativo de explantes com *calli* (explantes por 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 ($r^2 = 0,348$; $P = 0,01$). 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.

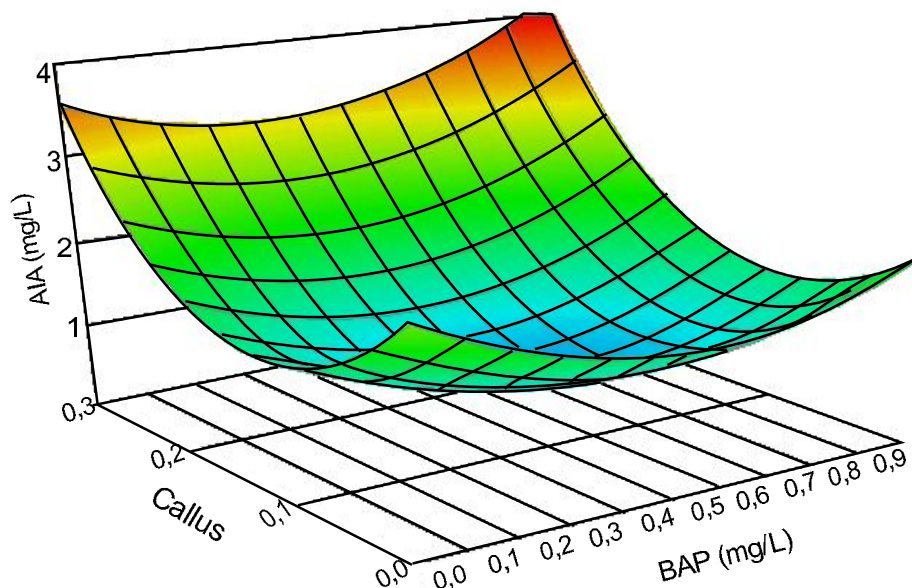


Fig. 2. Representação gráfica do resultado da combinação de concentrações de AIA e BAP para a geração de *calli* oriundos de explantes de tecidos do clone BRS-Amazonas de guaranazeiro. As curvas de regressão foram construídas com a inclusão da dose 0 (zero) dos hormônios (Embrapa Amazônia Ocidental,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

Nos experimentos aqui descritos, explantes submetidos ao cultivo sem adição de hormônios (tratamento 10) produziram *calli* e com média superior a dos tratamentos 7 e 8. Tomando o resultado dos testes de Student (Tabela 2) e a conformação da curva de regressão na Figura 2 verifica-se, ainda, que a adição de hormônios em concentrações muito baixas (tratamento 1) e nas concentrações mais altas testadas (tratamento 9) geraram resultados semelhantes. 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 (*callus* do tipo I), independentemente da adição de reguladores ao meio de cultivo, resultado anteriormente observado no Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Amazônia Ocidental (Barbosa *et al.*, 2005). Aparentemente, portanto, parte dos *calli* observados em cada tratamento formou-se à revelia dos reguladores fornecidos no meio de cultura.

Por outro lado, a interação entre os dois reguladores fornecidos parece ter sido relativamente mais efetiva nos tratamentos em que foram adicionados 3 mg/L de AIA e pelo menos 0,3 mg/L de BAP, o que explicaria a média alcançada pelos explantes submetidos ao tratamento 6, quando comparado ao tratamento 4 e ao 5 e ao tratamento 9, quando comparado ao 7

e ao 8. Nestes casos (6 e 9), supôs-se que houve alguma sensibilidade aos hormônios exógenos.

Do que foi dito, depreende-se que será necessário testar doses mais altas dos reguladores AIA e BAP e/ou introduzir nos experimentos outros reguladores de crescimento para que a indução de *calli* possa ser efetivamente correlacionada aos tratamentos dispensados aos explantes, o que deve permitir melhor controle da fase de indução e das fases seguintes dos experimentos que visam a micropropagação do guaranazeiro.

Conclusão

Entre as combinações de AIA e BAP testadas para controlar ou seja, induzir realmente, a formação de *calli* em explantes oriundos de mudas estioladas do clone BRS-Amazonas de guaranazeiro, foram efetivas aquelas que incluíram incluíram pelo menos 3,0 mg/L de AIA e 0,3 mg/L de BAP, em meio MS modificado.

Agradecimentos

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

Literatura Consultada

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

IBGE Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Sistema IBGE de Recuperação Automática (SIDRA)**, 2004. Disponível em: <www.ibge.gov.br> . Acesso em: 01 mar. 2004.

Murashige, T.; Skoog, F. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. **Physiol. Plant.**, 15: 473-97. 1962.