

INDUÇÃO DE CALLI EM EXPLANTES DE GUARANAZEIRO VISANDO A EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA

CALLI INDUCTION ON GUARANA PLANT EXPLANTS AIMING TO SOMATIC EMBRYOGENESIS

Paula Cristina da Silva Angelo^{1*}, Larissa Alexandra Cardoso Moraes², Nelcimar Reis Sousa², Regina Caetano Quisen²

RESUMO

O guaranazeiro (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*) é uma planta perene, nativa da Amazônia. As sementes torradas são insumos para a indústria de refrigerantes no Brasil e consumidas em pó pelo efeito estimulante. As cultivares clonais desenvolvidas pela Embrapa Amazônia Ocidental são propagadas por estaquia e o cultivo *in vitro* pode ser utilizado com a mesma finalidade, de multiplicar os genótipos selecionados. O meio MS modificado pela adição de fungicidas, antibióticos, antioxidantes e os reguladores do crescimento ácido indolacético, benzilaminopurina e ácido 2,4-diclorofenoxiacético foi testado para a indução, multiplicação e manutenção de *calli* formados sobre explantes retirados de mudas. *Calli* desorganizados foram observados mesmo em ausência de reguladores. O 2,4-D foi essencial para a obtenção de *calli* nodulares. Contaminação por fungos endofíticos e oxidação foram os principais problemas durante experimentos.

Palavras-chave: Amazônia; Sapindaceae; guaraná; liana; cultura de tecidos

ABSTRACT

Guarana plant (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*) is a perennial climbing species native to the Amazon rainforest. The roasted seeds are used to produce non-alcoholic carbonated drinks in Brazil and their powder is consumed as stimulant. The cultivars developed by Embrapa Western Amazon are propagated through rooted cuttings and *in vitro* multiplication could be used with the same objective. MS medium modified by the addition of fungicides, antibiotics, antioxidants and the plant growth regulators indolacetic acid, benzilaminopurine and 2,4 - dichlorophenoxy acetic acid was tested for induction, multiplication and maintainance of *calli* formed on explants taken from greenhouse plants. Disorganized *calli* were observed even in the absence of growth regulators and 2,4-D was essential to obtain nodular *calli*. Contamination by endophytic fungi and oxidation turned to be the worse problems along experimentation.

Key words: Amazon; Sapindaceae; guaraná; climbing plant; tissue culture

O guaranazeiro [*Paullinia cupana* (Kunth) var. *sorbilis* (Mart.) Ducke] é uma espécie nativa da floresta amazônica, incluída na tribo Paullinieae da família Sapindaceae, que reúne plantas escandentes que apresentam estípulas (HARRINGTON *et al.*, 2005). É uma liana no habitat natural e um arbusto, lenhoso, quando cultivado a pleno sol (ERICKSON *et al.*, 1984). As sementes secas são utilizadas por indústrias nacionais de refrigerantes e, em menor escala, para a produção de formulações consumidas com os objetivos de perder peso, melhorar o desempenho esportivo e sexual e melhorar a capacidade cognitiva (O'DEA, 2003; RAY *et al.*, 2005).

São recomendados para o cultivo genótipos selecionados por suas características superiores quanto à produtividade e resistência a doenças, que são propagados por meio de estaquia (PEREIRA, 2005). A propagação *in vitro* pode contribuir para a multiplicação rápida de plantas recém-selecionadas. Os objetivos dos experimentos aqui relatados foram desenvolver processos para a desinfestação de explantes, indução e manutenção *in vitro* de *calli* de *Paullinia cupana* var. *sorbilis*, visando a embriogênese somática.

Para a obtenção de explantes, mudas das cultivares clonais BRS-Amazonas, BRS-CG612 e BRS-Maués, selecionadas pela Embrapa Amazônia Ocidental, foram mantidas em casa de vegetação, submetidas à aspersão quinzenal com fungicida sistêmico, agrimicina e adubo foliar. Os explantes foram coletados em solução de ácidos ascórbico (150mg L⁻¹) e submetidos à assepsia em álcool 70% (30 segundos) e água sanitária a 30% por cinco e 15 minutos. Cinco experimentos para indução e multiplicação de *calli* foram realizados, utilizando o meio de cultivo MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) com 30g L⁻¹ de sacarose, suplementado com 150mg L⁻¹ de ácido ascórbico, 2g L⁻¹ de polivinilpirrolidona, 2g L⁻¹ de carvão ativado, MES a 4mM, pH ajustado para 5,8. O ágar (8g L⁻¹) foi utilizado para os experimentos I e II e o Phytigel (2,2g L⁻¹) para os experimentos restantes. Nestes últimos foram adicionados ao meio o cloridrato de cisteína (50mg L⁻¹), como antioxidante e, a partir do quarto mês, 100mg L⁻¹ de caseína hidrolisada. Os reguladores de crescimento e fungicidas e antibióticos utilizados estão descritos na Tabela 1.

^{1*} Pesquisadora, D.Sc., EMBRAPA Amazônia Ocidental, Rod. AM 010, Km 29, Zona Rural, Manaus, AM, CP 319, CEP: 69010-970. E-mail: Paula.angelo@cpaa.embra.br.

² Doutoranda em Fisiologia Vegetal, CENA/USP, Pesquisadora, EMBRAPA Amazônia Ocidental, Rod. AMA 010, Km 29, Zona Rural, Manaus, AM, CP 319, CEP: 69010-970.

(Recebido para publicação em 14/07/2008, aprovado em 03/02/2009)

Tabela 1 - Suplementos ao meio de cultivo MS utilizado para a indução de *calli* em guaranazeiro

EXPERIMENTO	REGULADORES	FUNGICIDAS E ANTIBIÓTICOS
I	AIA - 0,3; 1,5 e 3,0 mg L ⁻¹ BAP - 0,1; 0,3 e 0,9 mg L ⁻¹	tiofanato metílico - 2 g L ⁻¹ amoxicilina - 100 µg mL ⁻¹ cefotaxima - 100 µg mL ⁻¹
II	AIA - 0,3; 1,5 e 3,0 mg L ⁻¹ BAP - 0,1; 0,3 e 0,9 mg L ⁻¹	tiofanato metílico (atcl) - 2 g L ⁻¹ amoxicilina - 100 µg mL ⁻¹ cefotaxima - 100 µg mL ⁻¹
III	2,4-D - 0, 2, 4 ou 6 mg L ⁻¹ AIA - 3,0 mg L ⁻¹ BAP - 0,9 mg L ⁻¹	tiofanato metílico (atcl) - 3 g L ⁻¹ azoxitrobina (50% i.a. - atcl) - 0,75 mL L ⁻¹ amoxicilina - 100 µg mL ⁻¹ penicilina - 150 µg mL ⁻¹
IV	2,4-D - 0, 2, 4 ou 6 mg L ⁻¹ AIA - 3,0 mg L ⁻¹ BAP - 0,9 mg L ⁻¹	tiofanato metílico (atcl) - 3 g L ⁻¹ azoxitrobina (50% i.a. - atcl) - 0,75 mL L ⁻¹ amoxicilina - 100 µg mL ⁻¹ penicilina - 150 µg mL ⁻¹
V	2,4-D - 0, 2, 4 ou 6 mg L ⁻¹ AIA - 3,0 mg L ⁻¹ BAP - 0,9 mg L ⁻¹	tiofanato metílico (atcl) - 3 g L ⁻¹ azoxitrobina (50% i.a. - atcl) - 0,75 mL L ⁻¹

OBS: AIA = ácido indolacético; BAP = benzilaminopurina; 2,4-D = ácido 2,4-dicloro-fenoxiacético; atcl = autoclavado

Estes tratamentos foram acompanhados de placas com meio sem reguladores de crescimento (testemunhas), mantidas nas mesmas condições, ou seja, no escuro, em temperatura de 26 ± 2°C. Foi definida como repetição uma placa de Petri de 90 mm contendo 10 explantes e foram cultivados, para cada um dos experimentos I e II, 360 segmentos de pecíolos, pecíolulos ou ráquis das folhas; de nervuras de folíolos e de lâminas foliolas retirados das mudas da cultivar BRS-Amazonas, com quatro repetições para cada um dos nove tratamentos. Nos experimentos III e IV, 320 segmentos de pecíolos, pecíolulos ou ráquis das folhas e 320 explantes de nervuras, da cultivar clonal BRS-CG612, respectivamente, com oito repetições para cada um dos quatro tratamentos. No experimento V, 160 segmentos de pecíolos da cultivar clonal BRS-Maués, com quatro repetições para cada um dos quatro tratamentos. A variável analisada foi o número de explantes em que foi observada a formação de *calli* dividido pelo número de explantes viáveis (isentos de oxidação avançada e/ou contaminação) por placa. Os experimentos I e II foram acompanhados por três meses e os resultados foram submetidos conjuntamente à análise de regressão, utilizando o SYSTAT 11 ("trial version"). Os resultados submetidos à análise de variância nos experimentos III, IV e V referem-se ao primeiro e segundo meses. As testemunhas foram comparadas ao tratamento sem adição de 2,4-D dos experimentos III a V, pelo teste Z. O Sigma Stat 2 foi usado para estas últimas análises. *Calli* de BRS-Maués cultivados por quatro meses, em 0,9mg L⁻¹ de BAP e 3,0mg L⁻¹ de AIA, com e sem adição de 6,0mg L⁻¹ de 2,4-D, foram submetidos a análises histológicas. Para tal, foram fixados em formalina:ácido acético, desidratados em série de etanol; imersos em butanol terciário e em butanol:clorofórmio (3:1) e montados em parafina para a realização dos cortes em micrótomo. Os cortes foram desparafinados com xilol, reidratados em série de etanol, corados e preservados em bálsamo do Canadá. *Calli* de todos os experimentos foram mantidos em meio contendo 2mg L⁻¹ de 2,4-D. Os pesos de 10 destes *calli*, obtidos nos experimentos I e II, foram registrados por três meses consecutivos. O cultivo em meio MS contendo apenas citocininas [cinetina (KIN) ou tiodiazuron (TDZ)], sob luz, foi testado para indução de formação de parte aérea.

A análise dos dados dos experimentos I e II indicou que não houve diferença significativa entre as doses de AIA e de BAP testadas para induzir a produção de *calli*, mas que houve interação ($F_{(1,16)} = 8,57$; $P < 0,01$) entre os dois reguladores, com coeficiente baixo mas significativo ($R^2 = 0,35$; $P = 0,01$). Considerou-se que os reguladores fornecidos foram efetivos para a formação de *calli*, nas combinações de pelo menos 0,3mg L⁻¹ de BAP com 3,0mg L⁻¹ de AIA. Os *calli* obtidos nestes dois experimentos eram desorganizados, como aqueles representados na Figura 1A, e apresentaram ciclos mensais de renovação da proliferação celular e oxidação, por até quatro meses. Estes *calli* não eram embriogênicos e foram pouco úteis para a introdução em experimentos de organogênese (ANGELO *et al.*, 2005). Foram observados na superfície dos explantes cultivados em meio sem reguladores e, nos experimentos III a V, o número de explantes em que ocorreram não diferiu na presença de AIA e BAP (0mg L⁻¹ de 2,4-D) e na ausência de reguladores, pelo teste Z ($z = 0,676$; $P = 0,499$). Kakimoto (1996) relatou a indução de mutações em *A. thaliana* que resultaram na obtenção de *calli* que proliferaram rapidamente, enverdeceram sob luz e formaram partes aéreas na ausência de citocinina exógena. Por outro lado, West & Preece (2006) consideraram que o benomil produziu, sobre segmentos de caule e brotações de *Hibiscus*, efeito semelhante a doses baixas de citocininas. Portanto, apesar de antibióticos e fungicidas serem úteis como suplemento ao meio de cultivo – exemplo é a eliminação de 60% dos contaminantes endofíticos de material coletado *in situ* descrita por Pence (2005) - podem ter efeitos colaterais e ou serem fitotóxicos.

Em guaranazeiro, mesmo utilizando fungicidas, antibióticos e antioxidantes, contaminação e oxidação de explantes e *calli* foram entraves constantes para o estabelecimento e a manutenção dos experimentos. Explantes de nervuras contaminaram menos, mas foram mais propensos à oxidação. Foram eliminados por contaminação entre o terceiro e o quinto mês 54,86; 77,75; 63,00; 22,25 e 53,50% dos explantes nos experimentos I a V, respectivamente. A contaminação resultou predominantemente do crescimento de fungos endofíticos (GUIMARÃES, 1998). Atingiram o quinto mês, isentos de contaminantes e proliferando, apesar dos

sinais de oxidação, 254 *calli*, correspondendo a aproximadamente 14% dos explantes inoculados. Aos dois anos de cultivo, 10 *calli* das linhagens produzidas nos experimentos I e II e mantidas por repicagens mensais, ganharam $1,88 \pm 1,72\text{g}$ em dois meses, mais de duas vezes o peso médio inicial ($0,88 \pm 0,60\text{g}$) e isto foi considerado indício da manutenção da atividade celular.

A morfologia dos *calli* induzidos na ausência (Figura 1A) e presença de 2,4-D foi diferente (Figura 1B), assim como sua anatomia interna. A proliferação celular observada em meio sem reguladores de crescimento ou com $0,9\text{mg L}^{-1}$ de BAP e $3,0\text{mg L}^{-1}$ de AIA, ocorreu, aparentemente, no parênquima, logo abaixo das células epidérmicas e provocou o rompimento

da epiderme, nos pontos de formação dos *calli* desorganizados (Figura 1C e E). Com a adição do 2,4-D (experimentos III a V), houve a formação de nódulos, que recobriram totalmente os explantes (Figura 1B) com células opacas e simétricas (Figura 1D), bem diferentes daquelas transparentes e alongadas observadas dos *calli* desorganizados (Figura 1E). Cada nódulo ficou revestido por algumas fileiras de células com paredes mais densas e menores, como que tendendo à individualização (Figura 1D). Portanto, com a adição do 2,4-D, houve multiplicação de camadas externas e desorganização dos tecidos internos próximos aos feixes vasculares (Figuras 1D e F, setas), o que, por vezes, prenuncia a embriogênese (FÉHER *et al.*, 2003).

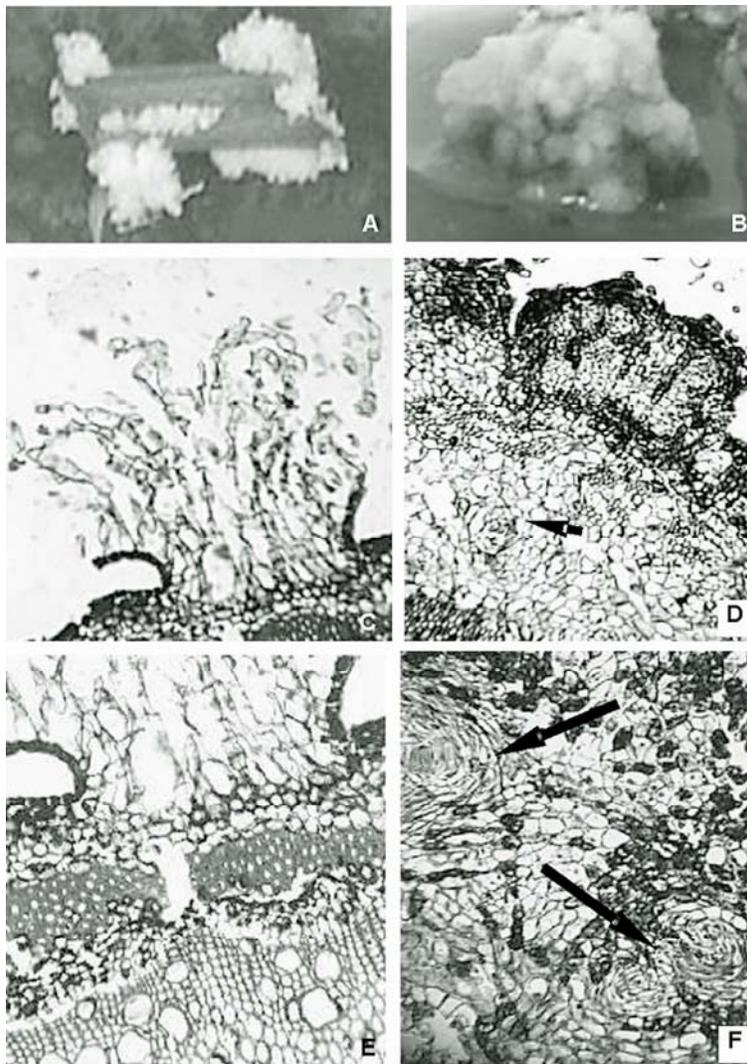


Figura 1 - *Calli* induzidos em explantes de guaranazeiro BRS-Maués, na ausência (A, C e E) e na presença (B, D e F) de 2,4-D. A e B, explante e *callus* com eixo maior medindo aproximadamente 1,5cm. Observa-se o rompimento da epiderme do explante com a formação dos *calli* desorganizados, em C (25X) e E (63X) e, em D (25X) e F (63X), a formação dos nódulos na superfície dos *callus* e a reorganização das células na proximidade dos feixes vasculares (setas)

Setores embriogênicos desenvolveram-se sobre *calli* primários de folhas de café (*Coffea arabica*) com a adição de 2,4-D ($2,21\text{mg L}^{-1}$), 2-isopentenil-adenina e ácido idolbutírico (TEIXEIRA *et al.*, 2004). Para estaminódios de cacau (*Theobroma cacao*) protocolos em que o 2,4-D foi combinado com citocininas resultaram em *calli* embriogênicos (LOPEZ-BAEZ *et al.*, 1993; LI *et al.*, 1998). Zimmerman (1993) relata a manutenção da capacidade de

embriogênese em *calli* induzidos por 2,4-D e mantidos por até dois anos. Michalczuk, *apud* Feher *et al.* (2003) considerou que o 2,4-D fornecido no meio de cultivo estimula o acúmulo de AIA endógeno, que a competência para a embriogênese nas células de cenoura está relacionada com este acúmulo e que o 2,4-D atua, principalmente, como um fator causador de estresse, perturbando o metabolismo das auxinas endógenas. Feher

et al. (2003) registram também que entre as auxinas sintéticas usadas para induzir a embriogênese somática, o 2,4-D tem sido a mais eficiente e mais utilizada. Para o guaranazeiro, entretanto, ao longo dos experimentos aqui relatados, não foi observada a formação de *calli* friáveis embriogênicos.

Além disto, apesar de ter resultado em alterações morfológicas e anatômicas, a adição do 2,4-D ao meio de cultivo não produziu alterações significativas no número de explantes com *calli* (Tabela 2, vide observação) e 2 ou 4mg L⁻¹ de 2,4-D foram igualmente efetivos para a indução de *calli* nodulares. *Calli* foram mais frequentes em pecíolos do que em nervuras (Tabela 2).

Tabela 2 - Porcentagem de explantes de pecíolo e de nervura da cultivar de guaranazeiro BRS CG612 que geraram *calli* sob efeito do 2,4-D (Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus/AM)

2,4 - D	PECÍOLO	NERVURA	MÉDIA
0 mg L ⁻¹ *	77,27 a A	0 a B	33,66 ab
2 mg L ⁻¹	59,25 abA	16,67 a B	37,96 ab
4 mg L ⁻¹	82,69 a A	12,90 a B	44,73 a
6 mg L ⁻¹	34,04 b A	15,00 a B	25,29 b
MÉDIA	63,61 A	14,86 B	

Diferenças significativas (P ≤ 0,05) são representadas por letras maiúsculas diferentes nas linhas e letras minúsculas diferentes nas colunas. * *calli* desorganizados, formados em presença de AIA e BAP

Não houve diferença significativa (F_(1, 47) = 1,41; P = 0,24) quanto ao número de *calli* observados em explantes de pecíolos das cultivares BRS-Maués (74,65% de explantes com *calli*) e BRS-CG612 (63,61%) e entre diferentes concentrações do 2,4-D aplicadas a pecíolos destas duas cultivares (F_(3, 47) = 1,74; P = 0,17).

A exposição à luz de *calli* nodulares da cultivar BRS-CG612 cultivados por 10 meses, em meio suplementado com KIN (5mg L⁻¹), induziu enverdecimento, friabilidade e multiplicação rápida. Estruturas morfológicamente similares às observadas por Tarré *et al.* (2004) em berinjala, que também é planta escandente, e que eram embriões somáticos incompletos, germinando sem o polo radicular, ocorreram sob estas condições. A exposição ao TDZ (0,25 ou 0,5mg L⁻¹) sob luz resultou em efeito similar, restrito às camadas externas de células. No entanto, *calli* tratados com KIN mantiveram-se verdes e ativos por seis meses, enquanto o tratamento com TDZ levou à oxidação e morte em dois ou três meses. Este resultado foi bastante diferente do observado por Thomas & Maseena (2006), que utilizaram o 2,4-D para indução de *calli* organogênicos em *Cardiospermum halicacabum* e o TDZ para regeneração de parte aérea a partir destes *calli*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANGELO, P.C.S.; MORAES, L.A.C.; SOUSA, N.R. Indução de *callus* em explantes de mudas estioladas de guaranazeiro. In: SEMINÁRIO SOBRE PESQUISAS COM O GUARANAZEIRO NO AMAZONAS, 1., 2005, Manaus, **Anais...** Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental - SEBRAE, 2005, p.42-46.

ERICKSON, H.T.; CORRÊA, M.P.F.; ESCOBAR, J.R. Guaraná (*Paullinia cupana*) as a commercial crop in Brazilian Amazonia. **Economic Botany**, v.38, p.273-286, 1984.

FÉHER, A.; PASTERNAK, T.P.; DUDITS, D. Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.74, p.201-228, 2003.

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***. Manaus, 1998. 115p. Dissertação (Mestrado em Genética, Evolução e Biologia

Evolutiva) - Universidade Federal de São Carlos/Universidade do Amazonas.

HARRINGTON, M.G.; EDWARDS, K.J.; JOHNSON, S.A. *et al.* Phylogenetic inference in *Sapindaceae sensu lato* using plastid matK and rbcL DNA sequences. **Systematic Botany**, v.30, p.366-382, 2005.

KAKIMOTO, T. CK11, a histidine kinase homolog implicated in cytokinin signal transduction. **Science**, v.274, p.982-985, 1996.

LI, Z.J.; TRAORE, A.; MAXIMOVA, S. *et al.* Somatic embryogenesis and plant regeneration from floral explants of cacao (*Theobroma cacao* L.) using thiodiazuron. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v.34, p.293-299, 1998.

LOPEZ-BAEZ, O.; BOLLON, H.; ESKEA, A. *et al.* Somatic embryogenesis and plant-regeneration from flower parts of cocoa (*Theobroma cacao* L.). **Comptes Rendus de la Academie des Sciences Serie III – Sciences de La Vie**, v.316, p.579-584, 1993.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F.A. A revised medium for rapid growth and biosays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.5, p.473-497, 1962.

O'DEA, J.A. Consumption of nutritional supplements among adolescents: usage and perceived benefits. **Health Education Research**, v.18, p.98-107, 2003.

PENCE, V.C. *In vitro* collecting (IVC). I. The effect of collecting method and antimicrobial agents on contamination in temperate and tropical collections. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v.41, p.324-332, 2005.

PEREIRA, J.C.R. (Ed.). **Cultura do guaranazeiro no Amazonas**. 4.ed., Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2005. 40p. (Embrapa Amazônia Ocidental. Sistemas de Produção, 2).

RAY, S.; PHADKE, S.; PATEL, C. *et al.* Short-term and long-term in vivo exposure to an ephedra- and caffeine-containing

metabolic nutrition system does not induce cardiotoxicity in B6C3F1 mice. **Archives of Toxicology**, v.79, p.330-340, 2005.

TARRÉ, E.; MAGIOLI, C.; MARGIS-PINHEIRO, M. *et al.* *In vitro* somatic embryogenesis and adventitious root initiation have a common origin in eggplant (*Solanum melongena* L.). **Revista Brasileira de Botânica**, v.27, p.79-84, 2004.

TEIXEIRA, J.B.; JUNQUEIRA, C.S.; PEREIRA, A.J.P.C. *et al.* **Multiplicação clonal de café (*Coffea arabica* L.) via embriogênese somática**. Brasília – DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2004. 39p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Documentos, 121).

THOMAS, T.D.; MASEENA, E.A. *Callus* induction and plant regeneration in *Cardiospermum halicacabum* Linn. an important medicinal plant. **Scientia Horticulturae**, v.108, p.332-336, 2006.

WEST, T.P.; PREECE, J.E. Use of acephate, benomyl and alginate encapsulation for eliminating culture mites and fungal contamination from *in vitro* cultures of hardy hibiscus (*Hibiscus moscheutos* L.). **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plan**, v.42, p.301-304, 2006.

ZIMMERMAN, J.L. Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plants. **The Plant Cell**, v.5, p.1411-1423, 1993.