

Micropropagação do Guaranazeiro

*Paula Cristina da Silva Angelo
Regina Caetano Quisen
Larissa Alexandra Cardoso Moraes
Nelcimar Reis Sousa*

Descrição da ação

As mudas dos clones recomendados para cultivo são oriundas de estacas das matrizes mantidas nos bancos de germoplasma. Muitos clones selecionados são plantas com entrenós muito longos, o que obriga, para a confecção de mudas, a retirada de parte representativa da copa da planta. As técnicas da cultura de tecidos serão utilizadas para acelerar o processo de obtenção de mudas, reduzindo a exploração das plantas matrizes. Essa atividade está incluída no Plano de Ação "Biotecnologias", do projeto de Melhoramento Genético do Guaranazeiro.

Objetivo

Os experimentos de cultura de tecidos têm como objetivo principal a produção de grande quantidade de plantas micropropagadas dos clones recomendados para cultivo, facilitando o fornecimento de mudas, que são atualmente formadas a partir de estacas retiradas das matrizes do Banco de Germoplasma Clonal. A clonagem in vitro pode contribuir para a obtenção de plantas, principalmente dos genótipos que estão em fase de avaliação e não são cultivados comercialmente.

Metodologia

Os explantes, segmentos nodais apicais, subapicais e folhas jovens, têm sido obtidos de estacas enraizadas dos clones 300, 505, 612, 611 e 871, mantidas em casa de vegetação na Embrapa Amazônia Ocidental (Manaus, AM), onde recebem, além da adubação adequada, pulverizações periódicas, de 15 em 15 dias, com solução dos agentes sistêmicos benomyl e terramicina com sulfato de estreptomicina, a fim de controlar os microrganismos endógenos não expostos aos agentes desinfestantes. Para a desinfestação dos explantes, têm sido testadas soluções com diferentes concentrações de álcool etílico, água sanitária e cloreto de mercúrio, e outros agentes antibióticos como cloreto de benzalcônio, variando-se também o tempo de exposição. Além disso, fungicidas e antibióticos (benomyl, tiofanato-metílico, azoxitrobina e polimixina e penicilina G) têm sido adicionados aos meios de cultivo (MS e WPM), utilizados para manutenção e indução de organogênese e embriogênese. Agentes para controle da oxidação (ácido ascórbico, carvão ativado, cisteína-HCl e polivinilpirrolidona) também têm sido testados em diferentes concentrações. Os reguladores de crescimento utilizados são as auxinas 2,4-D, ANA e AIA e as citocininas BAP, cinetina e TDZ, principalmente, em diferentes concentrações e combinações, dependendo do objetivo dos experimentos. O encapsulamento em alginato para a desinfestação foi testado, e o cultivo de segmentos de epicótilo e hipocótilo de plântulas germinadas *in vitro* também estão sendo realizados. As culturas têm sido mantidas no escuro em câmaras de B.O.D. a uma temperatura constante de 27 °C, ou em fotoperíodo de 16 horas, com temperaturas de 25 °C – 2 °C, e avaliadas quanto ao vigor e porcentagem de explantes contaminados e que geraram “calli”.

Principais resultados

Experimentos de cultura de tecidos utilizando explantes retirados de mudas clonadas por estaquia foram iniciados em 2004, em projeto coordenado pela Embrapa Amazônia Ocidental e financiado pela Fapeam. A análise dos resultados daqueles experimentos levou às seguintes conclusões: 1) a contaminação e a oxidação dos tecidos foram controlados, mas não eliminados pelos processos de estiolamento e adição de antioxidantes e fungicidas ao meio de cultivo; 2) explantes de pecíolo apresentaram-se mais resistentes à oxidação e propícios à produção de “calli” nodulares; 3) “calli” mantidos por mais de 10 meses

continuam proliferando e podem ser induzidos a produzir pigmentos verdes e a tornarem-se friáveis por exposição à luz, em meio contendo cinetina ou TDZ. Os "calli" de pecíolos e nervuras da cultivar clonal BRS Amazonas foram mantidos e multiplicaram-se por mais de 24 meses no Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Amazônia Ocidental. A produção de clorofila tem sido mantida em meio com cinetina, sob luz, mas não há morfogênese de órgãos completos. Combinações de cinetina e auxinas e alteração na fonte de carbono estão sendo testadas. Algumas das linhagens de "calli" foram utilizadas para indução de embriogênese em suspensão celular (meio líquido suplementado com 2,4-D e cinetina). Os resultados estão sendo analisados. A contaminação continua representando um entrave considerável para o estabelecimento e a manutenção dos experimentos com explantes de cultivares clonais, especialmente experimentos que visam a obter a organogênese direta via cultivo de segmentos nodais. Sendo assim, segmentos nodais de mudas dos clones BRS Amazonas, 505, BRS Maués e 612 continuam sendo mantidos em viveiro, sob tratamento quinzenal com fungicida. Uma tentativa de descontaminação por encapsulação em alginato foi realizada, após assepsia em 0,5% de cloreto de mercúrio, 30" álcool 70 + Tween, manutenção dos explantes em ascórbico 150 mg/L, até a encapsulação. A encapsulação ou peletização foi feita em alginato com 2 g/L de Cercobin e 0,5% de PPM por 24 horas, 5 e 8 dias. Os tratamentos resultaram em 90, 100 e 90% de contaminação, respectivamente, até o 13º dia depois da transferência para a luz. Tratamento com alginato sem adição dos fungicidas/antibióticos resultaram em 60%, 40% e 60% de contaminação, até a mesma data. Toda contaminação observada foi causada por fungos endofíticos, provavelmente do gênero *Penicillium*. A assepsia com cloreto de mercúrio a 0,1% foi testada, mais de uma vez, para explantes de pecíolos e peciólulos, retirados de mudas mantidas em casa de vegetação. Houve controle um pouco melhor da contaminação por fungos, mas a oxidação dos explantes foi muito mais extensa do que o observado para assepsia mais branda, realizada com água sanitária comercial, quando foi registrada contaminação de até 77% dos inóculos, que, no entanto, apresentaram aspecto mais saudável, verdes por mais tempo, sendo um maior número deles induzido à formação de "calli". Além de explantes de mudas clonadas por estaquia, estão sendo utilizados segmentos de hipocótilo e epicótilo de plântulas oriundas de sementes germinadas in vitro e embriões: explantes inoculados em meio WPM suplementado com fitagel, sacarose e os reguladores de crescimento BAP (0,1 mg/L), KIN (0,1 mg/L), TDZ (0,1 mg/L) e tratamento controle (sem regulador), observados por subculturas de

20-30 dias cada. Os resultados demonstraram não existir diferença entre os tratamentos aplicados quanto ao número médio de brotações novas emitidas por explante, que foram de 0,5; 0,33; 0,5 e 0,5 brotações, respectivamente, para os tratamentos 1; 2; 3 e 4. Esse material segue em avaliação.