

CRIOPRESERVAÇÃO DE GEMAS DE MANDIOCA 'VASSOURINHA'

CAMILA MÜLLER DALLMANN¹; MARISA TANIGUCHI²; ANDRIO SPILLER COPATTI²; ATHOS ODIN SEVERO DORNELES²; TALIS BASILIO DA SILVA²; LEONARDO FERREIRA DUTRA³

¹Universidade Federal de Pelotas – camilacmdbiotec@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – marisataniguchi@yahoo.com.br

²Universidade Federal de Pelotas – andriocopatti@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – athos_odin@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – talesbs28@gmail.com

³Embrapa Clima Temperado – leonardo.dutra@embrapa.br

1. INTRODUÇÃO

Os recursos genéticos vegetais são parte integrante da biodiversidade e essenciais para o desenvolvimento da agricultura e indústria (BETTONI, 2019). Atividades antropogênicas afetam diretamente esse patrimônio e a conservação da variabilidade genética de espécies se torna necessária.

Nativa da América do Sul, a mandioca (*Manihot esculenta Crantz*) ocupa a quinta posição como cultura alimentar e considerada rica fonte de carboidratos (CARDOSO et al., 2016; DIANTINA et al., 2016; HEDGE et al., 2017). Nas condições do Rio Grande do Sul os materiais propagativos não resistem ao inverno, então a manutenção de bancos de germoplasma no campo não é viável. O uso de técnicas de criobiologia são alternativa para conservação a longo prazo de recursos genéticos e proporcionam tempo indeterminado de armazenamento em pequenos espaços físicos, estabilidade genética e mimetização da erosão genética (CEBALLO et al., 2017; COPELAND, 2010; SAKAI et al., 2008; SANTOS et al., 2015).

Dentre as várias técnicas, tem-se a vitrificação. Esta consiste na passagem do estado físico líquido para o estado amorfo estável, evitando a formação de cristais de gelo que danificam a membrana celular. CHAROENSUB et al. (2003) relatam um protocolo de vitrificação aplicado com sucesso a 10 cultivares de mandioca. SAKAI et al. (2007) abordam a importância das etapas do desenvolvimento do protocolo da técnica e de derivados da mesma, como o encapsulamento-vitrificação e vitrificação em gotas. DUMET et al (2013) e SANTOS et al. (2015) inferem sobre métodos para armazenamento de recursos vegetais em criobancos, resultado de estudos realizados nos últimos anos, gerando avanços significativos na criogenia de células e sistemas vegetais (GONZALEZ-ARNAO et al., 2008). Uma etapa crucial do procedimento está na adição de osmoprotetores, dentre os quais se pode citar o sorbitol, o glicerol e a sacarose (SANTOS et al., 2007; GONZALEZ-ARNAO et al. 2013). O objetivo do presente trabalho é criopreservar gemas de mandioca 'Vassourinha', testando diferentes concentrações de osmoprotetores.

2. METODOLOGIA

Gemas com aproximadamente 2mm foram isoladas de plântulas da cultivar vassourinha multiplicadas in vitro, inoculadas em meio de pré-cultivo MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) com 0,3M de sacarose e mantidas na ausência de luz por 24 horas. Posteriormente, os explantes foram submetidos a cinco diferentes tratamentos de soluções de carregamento (LS): sem adição de solução LS (T1); 0,4M L⁻¹ de sacarose + 2,0M L⁻¹ de glicerol (T2); 0,8M L⁻¹ de sacarose +

2,0M L⁻¹ de glicerol (T3); 0,4M L⁻¹ de sorbitol + 2,0M L⁻¹ de glicerol (T4); e 0,8M L⁻¹ de sorbitol + 2,0M L⁻¹ de glicerol (T5).

Os explantes foram tratados com LS por 20 minutos e, em seguida, desidratados por 50 minutos na solução de PVS2 (Plant Vitrification Solution 2), a 25 °C. Em seguida, foram colocados em criotubos e imersos em nitrogênio líquido, onde permaneceram por 24 horas. Decorrido este período, os explantes foram descongelados em banho-maria por 38 ± 2 °C, expostos à solução de descarregamento (sacarose 1,2 M L⁻¹) por 20 minutos e inoculados em placas com meio de regeneração MS + 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, sendo o pH ajustado para 5,8 antes da inclusão do ágar (7,5 g L⁻¹) + 0,05 mg L⁻¹ BAP + 0,1 mg L⁻¹ ANA + 0,2 mg L⁻¹ GA₃ + 2% sacarose, permanecendo 3 dias em ausência de luz em sala de crescimento. Posteriormente, foram expostos à luz durante 30 dias para avaliação da sobrevivência, sob fotoperíodo de 16 horas de luz, irradiância de 36 μmol m⁻² s⁻¹ e temperatura de 25 ± 2 °C.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com três repetições, compostas por uma placa contendo 10 explantes cada. A variável analisada foi a sobrevivência do material vegetal após a vitrificação.

Os dados foram submetidos à análise de variância, e as médias, comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de significância utilizando-se o software estatístico SISVAR[®] (FERREIRA, 2014).

2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Houve baixa sobrevivência das gemas nos tratamentos T2 e T4 com criopreservação de 6,67% e 13,34%, após 30 dias da vitrificação (Tabela 1), respectivamente. Nos tratamentos controle, com a aplicação das soluções de LS, sem a imersão em nitrogênio líquido, a sobrevivência de explantes variou de 36 a 66%. A porcentagem encontrada no trabalho foi muito próxima do relatado por Diantina et al. (2016), os quais obtiveram 8,75% de explantes de mandioca utilizando as mesmas concentrações de osmoprotetores do tratamento T2, com um protocolo semelhante ao aplicado para a 'Vassourinha'. Ocorreu a formação de calos nos tratamentos T2 e T4. Possivelmente, os reguladores de crescimento adicionados no meio de regeneração aliados aos hormônios endógenos dos explantes promoveram um balanço hormonal, favorecendo, dessa forma, a formação de calos e pouca recuperação do material. Os tratamentos com criopreservação T1 sem LS, T3 e T5 com LS, em seguida, expostos à solução de PVS2 e imersos em nitrogênio líquido, não sobreviveram, apresentando coloração esbranquiçada. Mesmo ocorrendo a sobrevivência nos tratamentos T2 e T4, não houve diferença significativa entre todos os tratamentos submetidos à técnica. Não ocorreu contaminação em nenhum tratamento, tanto naqueles com ou sem criopreservação.

Tabela 1. Sobrevivência de gemas de 'vassourinha' submetidas à técnica de vitrificação com diferentes tratamentos de solução LS. Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS, 2019.

Tratamentos	Sobrevivência (%)	
	Com criopreservação	Sem criopreservação
T1	0 Ba	36,67 Ab
T2	13,34 Ba	36,67 Ab
T3	0 Ba	66,67 Aa
T4	6,67 Ba	43,34 Ab
T5	0 Ba	50,00 Ab

Médias seguidas por letras, maiúsculas na linha e minúsculas na coluna, diferem pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

SAKAI et al. (2002) e CHAROENSUB et al. (2003) obtiveram taxas médias de 80% e 70%, respectivamente, utilizando o tratamento T2, sendo que este último aborda um protocolo semelhante aplicado com sucesso a 10 cultivares de mandioca, podendo inferir que a 'Vassourinha' não respondeu como o esperado em comparação com as outras cultivares em relação ao mesmo LS do tratamento T2. SANTOS et al. (2015) obtiveram 72% de sobrevivência dos explantes, sem a adição de LS. A diferença entre as taxas de sobrevivência deste trabalho em relação aos demais trabalhos citados pode estar relacionada com diferentes materiais genéticos submetidos à vitrificação. Ressalta-se que não há na literatura trabalhos de criopreservação com a 'Vassourinha'.

De acordo com os resultados obtidos, sugere-se que a criopreservação da cultivar Vassourinha passe por adaptações na metodologia, testando-se outras concentrações de crioprotetores e tempos de exposição.

4. CONCLUSÕES

Na criopreservação da cultivar de mandioca 'Vassourinha' obteve-se até 13% de sobrevivência de gemas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BETTONI, J.C. Criopreservação: uma ferramenta para conservação de recursos genéticos de videira. **Agropecuária Catarinense**, Florianópolis, v. 32, n. 2, p. 92-97, 2019.

CARDOSO, M.N.; DE ARAUJO, A.G.; DA SILVA, A.V.C.; DE OLIVEIRA, L.A.R.; & DA SILVA LÉDO, A. Influência de luz e sacarose no crescimento in vitro de mandioca. **Nucleus**, Ituverava, v. 15, n. 1, p. 85 a 93, 2018.

CEBALLOS, H.; HERSHEY, C.H. Cassava (*Manihot esculenta Crantz*). In Genetic Improvement of Tropical Crops. Springer, Cham. Springer International Publishing AG, Part of Springer **Nature**, p. 129-180, 2017.

CHAROENSUB, R. PHANSIRI, S. YONGMANITICHAI, W. SAKAI, A. Routine cryopreservation of in vitro-grown axillary apices of cassava (*Manihot esculenta Crantz*) by vitrification: importance of a simple mononodal culture. **Scientia Horticulturae**, v. 98, n. 4, p. 485-492, 2003.

COPELAND, K.K. **Estudos fisiológicos e bioquímicos para criopreservação de embriões zigóticos de Coqueiro Anão Verde de Jiqui do Brasil**. 2010. 52f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Curso de Pós-graduação em Biotecnologia em Recursos Naturais, Universidade Federal de Sergipe.

DIANTINA, S.; EFENDI, D.; MARISKA, I. Response of two cassava accessions on vitrification and modification of vitrification techniques. **AIP Conference Proceedings**, p. 020057, 2016.

DUMET, D.; DIEBIRU, E.; ADEYEMI, A.; AKINYEMI, O.; GUEYE, B.; & FRANCO, J. Cryopreservation for the 'in perpetuity' conservation of yam and cassava genetic resources. **CryoLetters**, v 34, n. 1, p. 107-118, 2013.

FERREIRA, D.F. Sisvar: A computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras. v. 35, n. 6, p. 1039- 1042, dez. 2014.

GONZALEZ-ARNAO, M.T.; ENGELMANN, F. **Crioconservation de plantas en America Latina y el Caribe**. San Jose: Caribe, IICA, 2013.

GONZALEZ-ARNAO, M.T. PANTA, A; ROCCA, W.M.; ESCOBAR, R.H.; ENGELMANN, F. Development and large scale application of cryopreservation techniques for shoot and somatic embryo cultures of tropical crops. **Plant Cell Tissue Organic Culture**, v. 92, n. 1 p. 1-13, 2008.

HEGDE, V.; MAKESHKUMAR, T.; SHEELA, M.N.; CHANDRA, Visalakshi, C.; KOUNDINYA, A.V.V.; ANIL, S.R.; MUTHURAJ, R; DARSHAN, S. Production of synthetic seed in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Journal of Root Crops**, v. 42, n. 2, p. 5-9, 2017.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

SAKAI, A.; MATSUMOTO, T.; HIRAI, D.; CHAROENSUB, R. Sobrevivência de ápices tropicais resfriados a -196 C por vitrificação. In: **Resistência ao frio da planta**. Springer, Boston, MA, 2002. p. 109-119.

SAKAI, A.; HIRAI, D.; NIINO, T. Development of PVS-Based Vitrification and Encapsulation-Vitrification Protocols. *Plant Cryopreservation: A Practical Guide*. New York, NY: Springer, 2008. Cap. 3, p. 33-57.

SAKAI, A.; ENGELMANN, F. Vitrification, encapsulation-vitrification and droplet-vitrification: a review. **CryoLetters**, v 28, n. 3, p. 151-172, 2007.

SANTOS, I.R.; SALOMÃO, A.N.; **Criopreservação de germoplasma vegetal**. Recursos genéticos vegetais, Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, p. 545-573, 2007.

SANTOS, I.R.I.; SALOMAO, A.N.; MUNDIM, R.C. Avaliação da tolerância de ápices caulinares de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) à criopreservação. **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia-Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento (INFOTECA-E)**, 2015.