



CRIOPRESERVAÇÃO DE GENÓTIPOS DE MANDIOCA

Leonardo Augusto Zebral Rodrigues¹, Alfredo Augusto Cunha Alves², Luciano Vilela Paiva³, David Ellis⁴

¹Bolsista de Pós-Doutorado, Biotecnologia Vegetal, Universidade Federal de Lavras, leozebral@yahoo.com.br

²Pesquisador, Embrapa Labex-EUA, USDA-ARS National Center for Genetic Resources Preservation, Alfredo.Alves@embrapa.br

³Professor, Universidade Federal de Lavras, luciano@dqi.ufla.br

⁴Pesquisador, USDA-ARS National Center for Genetic Resources Preservation, David.Ellis@ars.usda.gov

Resumo: Mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é um alimento básico para a alimentação humana. É a terceira mais importante fonte de carboidratos nos trópicos, ocupando a sexta posição quando considerada a produção global. Nos últimos anos vários grupos de pesquisa têm relatado métodos para cultura de tecidos vegetais de mandioca, oferecendo importantes aplicações para as coleções de germoplasma, tais como a conservação, a facilidade de intercâmbio, micropropagação, erradicação de doenças, entre outros. Assim, um dos objetivos deste estudo foi ampliar essas investigações, avaliando os fatores associados à regeneração *in vitro* de duas cultivares de mandioca. Segmentos uninodais de plantas de mandioca crescidas *in vitro* foram cultivados até a obtenção de brotações axilares alongadas. Meristemas foram excisados e cultivados em quatro diferentes meios de cultura. A regeneração, o enraizamento e a formação de calos foram avaliados. Uma diferença significativa foi encontrada entre os meios de cultura testados. Para ambas as cultivares o melhor meio de cultura foi suplementado com 0,2 mg L⁻¹ de cinetina e 1,0 g L⁻¹ de carvão ativado. Em sequência a isso, vários métodos de criopreservação foram testados para o desenvolvimento de um protocolo de criopreservação eficiente para a conservação dessas cultivares. Usando a técnica de vitrificação, com uma solução de pré-tratamento modificada contendo 0,5% de Tween-20, alcançamos uma taxa de regeneração superior a 50% após exposição ao nitrogênio líquido.

Palavras-chave: Criopreservação, meristemas apicais, mandioca, conservação de germoplasma

Introdução

Recursos genéticos vegetais são um reservatório natural de genes com potencial de uso para a produção sustentável de elementos essenciais para a humanidade, tais como alimentos, fibras e medicamentos, bem como ser um meio de preservar o patrimônio genético de espécies ameaçadas de extinção. A maioria das culturas de sucesso são derivadas e dependentes de seus ancestrais selvagens.



No entanto, essa biodiversidade está sendo destruída a um ritmo alarmante devido ao crescimento desordenado e exploração descontrolada dos ecossistemas e recursos naturais. Recursos genéticos vegetais podem ser conservados no habitat natural de suas populações (*in situ*) ou fora deles (*ex-situ*). A criopreservação tem sido utilizada como a forma mais racional para a prevenção de eventos inesperados, como a ocorrência de novas pestes e doenças, e à perda de resistência de certas culturas resultantes do processo de erosão genética. É a melhor técnica disponível, com potencial para garantir a conservação a longo prazo do germoplasma de espécies vegetais.

Como em diversas culturas, as técnicas de cultivo *in vitro* e os protocolos de criopreservação em mandioca são genótipo-dependentes. Neste trabalho, realizamos um estudo com diferentes meios de cultura para avaliar o desempenho *in vitro* de meristemas apicais de duas cultivares de mandioca. Além disso, diferentes protocolos de criopreservação foram testados e, depois de adaptações, um desses protocolos mostrou-se eficiente para a criopreservação de ápices caulinares das duas cultivares de mandioca aqui estudadas.

Material e Métodos

Foram utilizadas plantas *in vitro* de mandioca, variedades CM 507-37 e COL 1468, oriundas do Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT, Cali, Colômbia) e mantidas no meio de cultura em meio de cultura 12A₃, desenvolvido pelo CIAT, baseado no MS (Murashige e Skoog, 1962) e suplementado com 0,2 mg L⁻¹ de cinetina, 3% de sacarose, carvão vegetal 1,0 g L⁻¹ (Sigma C6289), 7,0 g L⁻¹ de ágar (Sigma A7002), pH 5,7-5,8 (Velasquez e Mafla, 1999). Culturas foram transferidas a cada 2 meses e cultivadas a 25° C, sob um fotoperíodo de 16 h e com uma irradiância de 50 μmol s⁻¹ m⁻².

Os meristemas apicais excisados foram imediatamente inoculados para evitar a desidratação em quatro diferentes meios de cultura para testar a influência do meio sobre o crescimento e desenvolvimento dos meristemas. Os quatro meios testados foram:

1. CIAT 4E (Roca et al., 1991), contendo MS sais; 0,04 mg L⁻¹ 6-benzylaminopurine (BAP); 0,05 mg L⁻¹ Giberellic acid (GA₃); 0,02 mg L⁻¹ naphthaleneacetic acid (NAA); 1,0 mg L⁻¹ thiamine HCl; 100 mg L⁻¹ inositol; 2% sucrose; agar e pH 5,7;
2. CIAT 12A₃ (Velasquez e Mafla, 1999), contendo MS sais; 0,2 mg L⁻¹ kinetin; 1,0 mg L⁻¹ thiamine HCl; 100 mg L⁻¹ inositol; 1,0 g L⁻¹ activated charcoal; 3% sucrose; agar e pH 5,7;
3. MS + IAA (Murashige and Skoog, 1962), contendo MS sais; 1,0 mg L⁻¹ indole-3-acetic acid (IAA); 1,0 mg L⁻¹ thiamine HCl; 100 mg L⁻¹ inositol; 3% sucrose; agar e pH 5,6;



4. Charoensub et al. (2003), contendo MS sais; 0,02 mg L⁻¹ BAP; 0,1 mg L⁻¹ GA₃; 0,01 mg L⁻¹ NAA; 1,0 mg L⁻¹ thiamine HCl; 100 mg L⁻¹ inositol; 3% sucrose; agar e pH 5,6.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, 2 x 4 x 2 fatorial (duas cultivares, quatro meios de cultura e dois tamanhos de meristemas), sendo cada repetição constituída de 5 meristemas colocados em cada placa de Petri (55 x 15 mm) contendo 10 ml de meio. Observações semanais sobre sobrevivência do explante com base na presença de um broto verde, crescimento da raiz e frequência de formação de calos foram avaliadas.

No segundo experimento, onde os meristemas foram submetidos a criopreservação, utilizou-se um fatorial 1 x 2 x 4 x 2 (uma cultivar, dois meios de cultura para regeneração, quatro tempos de exposição ao PVS2, e dois tratamentos de Tween (presença e ausência), sendo cada repetição constituída de 15 meristemas colocados em três placas de Petri (55 x 15 mm) (10 ápices por placa de Petri) contendo 10 ml de meio. Cada experiência foi replicada três vezes. A cada 15 dias foram feitas observações sobre a sobrevivência dos explantes, crescimento da raiz e frequência de calos. Os dados foram analisados por uma análise de variância (ANOVA), utilizando o programa SISVAR e a média dos tratamentos foi comparada pelo teste de Tukey 5%.

Resultados e Discussão

A regeneração dos meristemas foi maior no meio de cultura CIAT 12A₃ para as duas cultivares (CM 507-37 95% e COL 1468 82%). Não houve diferenças significativas no crescimento para a cultivar CM 507-37 cultivada nos meios CIAT 12A₃ (95%), 4E CIAT (93%) e Charoensub (87%). Em contraste, para cultivar COL 1468 o meio de cultura CIAT 12A₃ foi significativamente melhor do que os outros (67% Charoensub, 65% CIAT-4E e 62% MS+IAA) (**Figura 1**).

O desempenho de um cultivo *in vitro* é o resultado de uma interação complexa de fatores envolvendo o estado fisiológico da planta, o genótipo e as condições de cultivo. De acordo com os resultados deste estudo podemos concluir que o meio de cultura mais adequado para a multiplicação de genótipos de mandioca CM 507-37 e COL 1468 é o meio CIAT12A₃. Usando esse meio obtivemos a melhor indução de brotações, com um excelente crescimento, desenvolvimento e uniformidade das plântulas. Além disso, este meio proporcionou uma boa frequência de enraizamento e completa ausência de calos para as duas cultivares.

Para a etapa de criopreservação, os meristemas excisados foram pré-tratados com meio MS líquido suplementado com 0,3 M de sacarose durante 16-24 horas para aumentar a osmotolerância. Este pré-tratamento não apresentou efeitos prejudiciais sobre o crescimento dos meristemas.

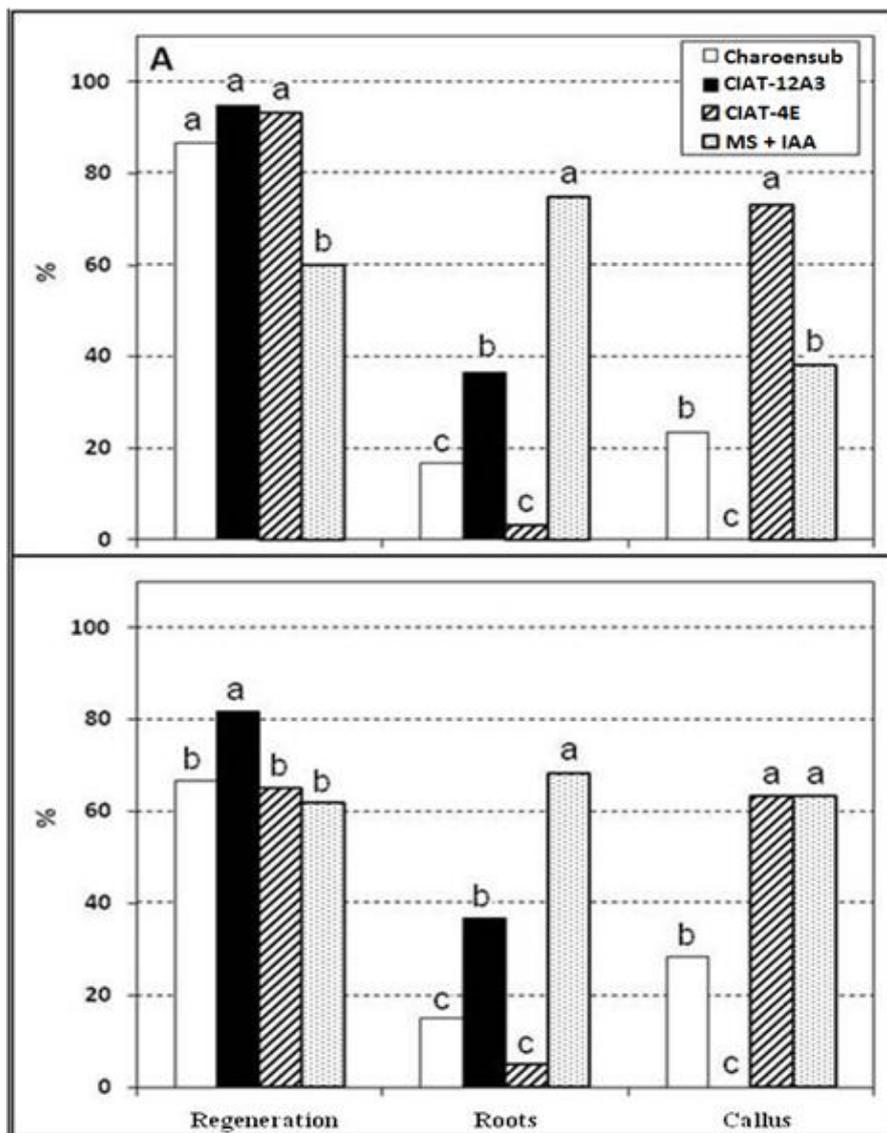


Figura 1 - Efeito de diferentes meios de cultura na formação da parte aérea, raiz e calos após 30 dias do isolamento dos meristemas para cultivares de mandioca CM 507-37 (A) e COL 1468 (B). Barras com a mesma letra indicam que não há diferença significativa com base no teste de Tukey ($P < 0,05$).

Sabe-se que a folha de mandioca tem uma epiderme com depósitos de cera e outros lípidos e parede celular com cutina. Esses atributos contribuem para que os meristemas flutuem nas soluções LS e PVS2 impedindo o bom contato com as soluções. Isso pode resultar em um potencial osmótico inadequado não oferecendo quaisquer efeitos protetores para os meristemas durante a exposição a ultra baixas temperaturas.

Há relatos de uma interação positiva entre Tween com tecidos vegetais ricos em cera. Neste sentido, um experimento foi montado para testar o efeito de Tween 20 em solução LS. Verificou-se que tratamento dos meristemas com uma baixa concentração e um curto período de tempo propiciou um melhor contato dos meristemas com a solução LS, e, por conseguinte, uma melhor osmoproteção.

O próximo passo foi determinar o tempo ótimo de exposição do tecido vegetal à solução de PVS2. Meristemas foram excisados, pré-tratados com e sem tween-20 e submetidos a diferentes



tempos de exposição a PVS2 (0, 10, 20, 30, 45 e 60 minutos). Os resultados indicaram que a exposição a PVS2 maior que 30 minutos é letal para os dois cultivares de mandioca testados. Além disso, os tempos de exposição PVS2 inferiores a 20 minutos houve uma redução significativa no crescimento dos meristemas durante o período de 30 dias.

Conclusões

De acordo com os resultados deste estudo podemos concluir que o meio de cultura mais adequado para a multiplicação de genótipos de mandioca CM 507-37 e COL 1468 é o CIAT 12A₃. Usando esse meio obtivemos a melhor indução de brotações, com um excelente crescimento, desenvolvimento e uniformidade das plântulas. Além disso, este meio permitiu uma boa frequência de enraizamento e completa ausência de calos para as duas cultivares.

Na parte de criopreservação os resultados mostraram que a solução LS modificada contendo Tween-20 0,5% (v/v) foi superior ao padrão propiciando a regeneração de mais de 50% dos meristemas criopreservados.

Agradecimentos

Os autores agradecem o apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq, da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CAPES, da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais e ao apoio da EMBRAPA LABEX-EUA e USDA-ARS/NCGRP.

Referências Bibliográficas

- CHAROENSUB, R.; PHANSIRI, S.; YONGMANITCHAI, W.; SAKAI, A. Routine cryopreservation of in vitro-grown axillary apices of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) by vitrification: importance of a simple monodal culture. **Scientia Horticulturae**, v.98, p.485-492, 2003.
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962.
- ROCA, W.M.; NOLT, B.; MAFLA, G.; ROA, J.C.; REYES, R. Eliminación de virus y propagación de clones en la yuca (*Manihot esculenta* Crantz). In: Roca, W.M. & Mroginski, L.A. **Fundamentos y aplicaciones**, p.403-421, 1991.
- VELAZQUEZ, E.; MAFLA, G. Conservación in vitro una alternativa segura para preservar especies silvestres de *Manihot* spp (Euphorbiaceae). In: Congresso Nacional de Conservación de la biodiversidad, Bogota, Colombia, p.1-14, 1999.