

**Avaliação da Tolerância de
Ápices Caulinares de Mandioca
(*Manihot esculenta* Crantz) à
Criopreservação**

Foto: Izulmé Rita Imaculada Santos e Antonieta Nassif Salomão



ISSN 0102-0110
Novembro, 2015

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 314

Avaliação da Tolerância de Ápices Caulinares de Mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) à Criopreservação

Izulmé Rita Imaculada Santos
Antonieta Nassif Salomão
Rosângela Caldas Mundim

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Brasília, DF
2015

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Endereço: Parque Estação Biológica – PqEB – Av. W5 Norte
Caixa Postal 02372 – Brasília, DF – Brasil – CEP: 70770-917
Fone: (61) 3448-4700 / Fax: (61) 3340-3624
Home page: <http://www.cenargen.embrapa.br/>
E-mail (sac): sac@cenargen.embrapa.br

Comitê Local de Publicações

Presidente: Maria Isabela Lourenço Barbirato
Secretário-Executivo: Thales Lima Rocha
Membros: Daniela Aguiar de Souza Kols
 Lígia Sardinha Fortes
 Lucas Machado de Souza
 Márcio Martinelli Sanches
 Rosameres Rocha Galvão
Suplentes: Ana Flávia do Nascimento Dias Côrtes
 João Batista Tavares da Silva

Revisão de texto: José Cesamildo Cruz Magalhães
Normalização bibliográfica: Rosameres Rocha Galvão
Edição eletrônica: José Cesamildo Cruz Magalhães

1ª edição (online)

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**

Santos, Izulmé Rita Imaculada

Avaliação da tolerância de ápices caulinares de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) à criopreservação. Izulmé Rita Imaculada Santos, Antonieta Nassif Salomão e Rosângela Caldas Mundim – Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2015.

22 p.: il. – (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 314).

1. *Manihot esculenta* Crantz. 2. Mandioca – Criopreservação. I. Salomão, Antonieta Nassif. II. Mundim, Rosângela Caldas. III. Série.

633.682 – CDD 21

Sumário

Resumo.....	.05
Abstract.....	.07
Introdução.....	.09
Material e Métodos.....	.10
Resultados e Discussão.....	.16
Conclusões.....	.19
Referências Bibliográficas.....	.20

Avaliação da Tolerância de Ápices Caulinares de Mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) à Criopreservação

Izulmé Rita Imaculada Santos¹
Antonieta Nassif Salomão²
Rosângela Caldas Mundim³

Resumo

A mandioca, *Manihot esculenta* Crantz, família Euphorbiaceae, é um arbusto perene tropical com raízes tuberosas que armazenam altos teores de amido e por isso são utilizadas como alimento por milhões de pessoas em diversos países. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da criopreservação sobre a sobrevivência de ápices caulinares de mandioca (acessos BGM 603 e CG 1489–23) com a utilização de encapsulamento-desidratação, encapsulamento-vitrificação e vitrificação. Ápices caulinares (1,0 - 2,0 mm) foram isolados de plantas em crescimento *in vitro* em meio MS-62, tratados com encapsulamento-desidratação, encapsulamento-vitrificação e vitrificação e submersos em nitrogênio líquido (-196°C) por 60 minutos. Os ápices caulinares foram descongelados em banho-maria a $40 \pm 2^\circ\text{C}$ e transferidos para placas de Petri contendo MS-62 básico para regeneração. Ápices caulinares do acesso BGM 603 apresentaram 72% sobrevivência após a vitrificação e 33% de sobrevivência após o encapsulamento/vitrificação. A sobrevivência de ápices caulinares

do acesso CG 1489-23 foi de 80% e 73% após a vitrificação e o encapsulamento-vitrificação, respectivamente. Estes resultados indicam que a criopreservação por meio da metodologia de vitrificação é promissora para a preservação de ápices caulinares de mandioca. Esta metodologia deverá ser testada em outros acessos para verificar sua aplicabilidade em larga escala.

Termos para indexação: ápices caulinares, criopreservação, encapsulamento-desidratação, encapsulamento-vitrificação, mandioca, *Manihot esculenta* Crantz, vitrificação.

¹ Bióloga, Ph.D., Pesquisadora, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

² Engenheira Florestal, MsC, Pesquisadora, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

³ Geógrafa, Graduação, Técnica, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

Evaluation of Tolerance of Shoot Tips of Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) to Cryopreservation

Abstract

Cassava, *Manihot esculenta* Crantz, Euphorbiaceae family, is a tropical perennial shrub that produces tubers with high starch content which are used as food by millions of people in many countries. The objective of this work was to access the effect of cryopreservation on survival of cassava shoot tips (accessions BGM 603 e CG 1489–23) using encapsulation-dehydration, encapsulation-vitrification and vitrification. Shoot tips (1,0 - 2,0 mm) were excised from plants growing in vitro on solid basic MS-62, treated with encapsulation-dehydration, encapsulation-vitrification and vitrification and plunged in liquid nitrogen (-196°C) for 60 minutes. After warming in a water bath (40±2°C) shoot tips were transferred into Petri dishes containing basic MS-62 for regeneration. Shoot tips of accession BGM 603 showed 72% survival after vitrification alone and 33% survival after encapsulation-vitrification. Survival of shoot tips of accession CG 1489-23 was 80% and 73% following vitrification and encapsulation-vitrification, respectively. These results show that cryopreservation by vitrification is a viable approach for preservation of cassava shoot tips. This methodology will be tested with other genotypes to access its

large scale applicability.

Index terms: cassava, cryopreservation, encapsulation-dehydration, encapsulation-vitrification, *Manihot esculenta* Crantz, shoot tips, vitrification.

Introdução

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é um arbusto tropical perene da família Euphorbiaceae. Esta espécie produz raízes tuberosas com alto teor de amido, as quais são utilizadas como alimento por milhões de pessoas em diversos países (SILVA et al., 2010/11). A mandioca também tem papel importante na alimentação animal e como matéria-prima para a produção de inúmeros produtos industriais, o que gera emprego e renda. Atualmente a demanda por fécula de mandioca pelo setor industrial tem crescido de forma substancial, principalmente pela utilização de fécula na mistura de farinha de trigo para fabricação de pães, objetivando reduzir as importações de trigo, e também pelo uso das raízes para a produção de etanol (MANDIOCA..., [S.d.]). Estima-se que nas fases de produção primária e no processamento industrial são gerados milhões de empregos diretos e receita bruta anual de muitos milhões de dólares. O Brasil ocupa atualmente a segunda posição entre os produtores mundiais de mandioca, com produção estimada de 24 milhões de toneladas de raízes frescas de mandioca em aproximadamente dois milhões de hectares (IBGE, 2015).

Em virtude da sua importância socioeconômica para diversos países, a conservação de recursos genéticos dessa espécie é considerada prioritária (INTERNATIONAL..., 1994). Programas de conservação e coleções de germoplasma de *M. esculenta* foram estabelecidos em vários países, entre eles a Colômbia, a Tailândia e o Brasil. Como a principal forma de difusão da espécie é a propagação vegetativa em que são utilizados segmentos de caule ou manivas, a metodologia de conservação inicialmente adotada para a espécie foi a manutenção de coleções clonais em campo, em Bancos Ativos de Germoplasma (BAG) (FIALHO; VIEIRA, 2011). Entretanto, as plantas mantidas em campo são suscetíveis a intempéries, à ocorrência de pragas e doenças e a ataques de insetos e ácaros que podem causar danos severos às plantas ou resultar na perda de acessos (ESCOBAR et al., 1997).

Mais recentemente, outras metodologias mais seguras, como a

conservação *in vitro* e a criopreservação, têm sido adotadas para a manutenção de duplicatas de segurança das coleções conservadas no campo (CHAROENSUB et al., 2003). Dentre estas metodologias, a criopreservação é a única disponível para a conservação a longo prazo de espécies de propagação vegetativa, como a mandioca, pois possibilita a manutenção de coleções de germoplasma por longos períodos de tempo em perfeitas condições de integridade biológica e estabilidade genética (CHAROENSUB et al., 2003; LI; PRITCHARD, 2009).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da criopreservação sobre a sobrevivência de ápices caulinares de mandioca (acessos BGM 603 e CG 1489-23) utilizando-se o encapsulamento-desidratação, o encapsulamento-vitrificação e a vitrificação.

Material e Métodos

Obtenção das plantas doadoras de ápices caulinares (AC)

Plântulas de dois acessos de mandioca da coleção de germoplasma *in vitro* mantida na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília-DF, CG 1489-23 (BRA 084492) e BGM 603 (BRA 013633), foram selecionadas para a realização dos experimentos. As plântulas selecionadas foram subcultivadas em meio MS-62 sólido (MURASHIGE; SKOOG, 1962), em sala de crescimento com fotoperíodo de 12 horas de luz e temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, a fim de produzir lotes de plântulas doadoras de explantes para os experimentos de criopreservação. Após 60 dias de crescimento *in vitro*, segmentos nodais foram isolados das plântulas obtidas e transferidos para frascos Magenta contendo 30 mL de meio MS-62 suplementado com 0,02 mg/l de BAP, 0,01 mg/l de ANA, 0,1 mg/l de GA_3 , 30,0 g/l de sacarose e 7,0 g/l de ágar (Figura 1 A e B). Após 15 dias de cultivo, AC medindo 1,0 - 2,0 mm foram isolados dos brotos obtidos e utilizados nos experimentos.

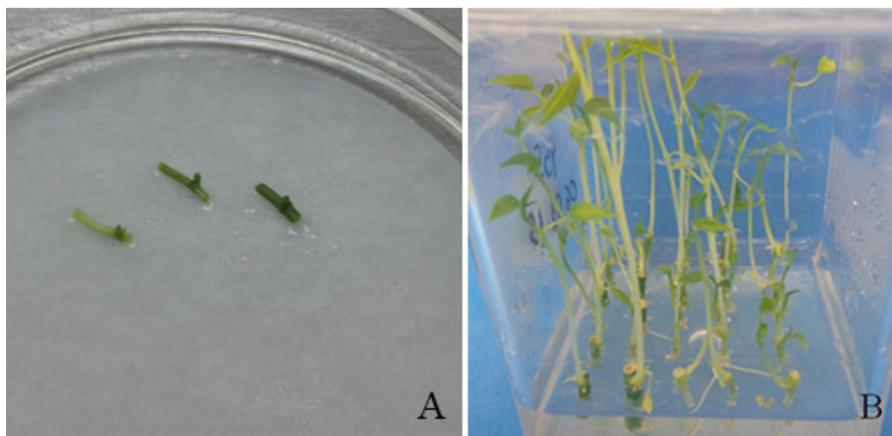


Figura 1. Cultivo de segmentos nodais. A: segmentos nodais isolados das plântulas em crescimento *in vitro*; B: segmentos nodais após 30 dias de cultivo em frascos Magenta contendo 30,0 mL de meio de cultura MS-62 suplementado com 0,02 mg/l de BAP, 0,01 mg/l de ANA, 0,1 mg/l de GA₃, 30,0 g/l de sacarose e 7,0 g/l de ágar.

Criopreservação

Foram testadas três metodologias de criopreservação, as quais estão descritas sucintamente a seguir.

Vitrificação (Sakai et al., 1990)

- Isolamento dos AC.
- Vitrificação: transferência dos AC para criotubos com 1,0 mL de solução de vitrificação PVS₂ (Plant Vitrification Solution 2) contendo 15% de DMSO, 15% de etilenoglicol, 30% de glicerol e 0,4 M de sacarose, por 60 minutos.
- Congelamento rápido: imersão direta dos criotubos em nitrogênio líquido, sob temperatura de -196°C, velocidade de congelamento de -263°C min.⁻¹ por no mínimo uma hora.
- Descongelamento rápido: remoção dos criotubos do criotank e imersão em banho-maria, em temperatura de 40 ± 2°C, sob agitação,

por 1,5 - 3,0 minutos.

- Diluição: remoção da solução de vitrificação PVS_2 dos criotubos e adição de solução de diluição composta por meio de cultura MS-62 líquido suplementado com 1,2 M sacarose, por 20 minutos.

- Regeneração: transferência das cápsulas para meio de cultura MS-62 sólido e cultivo em sala de crescimento com temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12/12 horas.

Encapsulamento-desidratação (Fabre e Dereuddre, 1990) (Figuras 2 e 3)

- Isolamento dos AC.

- Encapsulamento: transferência dos AC para gel de alginato de sódio, composto por MS-62 líquido suplementado com 3% de alginato de sódio.

- Transferência dos AC embebidos em solução de alginato de sódio para a solução de cloreto de cálcio a 0,1 M, por meio de gotejamento.

- Pré-cultivo: descarte da solução de cloreto de cálcio e transferência das cápsulas para meio de pré-cultivo, composto por MS-62 líquido contendo diferentes concentrações de sacarose (0,75; 1,0; 1,5; 2,0 M).

- Desidratação das cápsulas: exposição ao ar da cabine de fluxo laminar por 30 minutos.

- Congelamento rápido: transferência das cápsulas para criotubos e imersão direta em N_2L (-196°C), a uma velocidade de congelamento de $-263^\circ\text{C min.}^{-1}$ por no mínimo uma hora.

- Descongelamento rápido: remoção dos criotubos do criotanque e imersão em banho-maria, em temperatura de $40 \pm 2^\circ\text{C}$, sob agitação, por 1,5 - 3,0 minutos.

- Regeneração: transferência das cápsulas para meio de cultura MS-62 sólido e cultivo em sala de crescimento com temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12/12 horas.

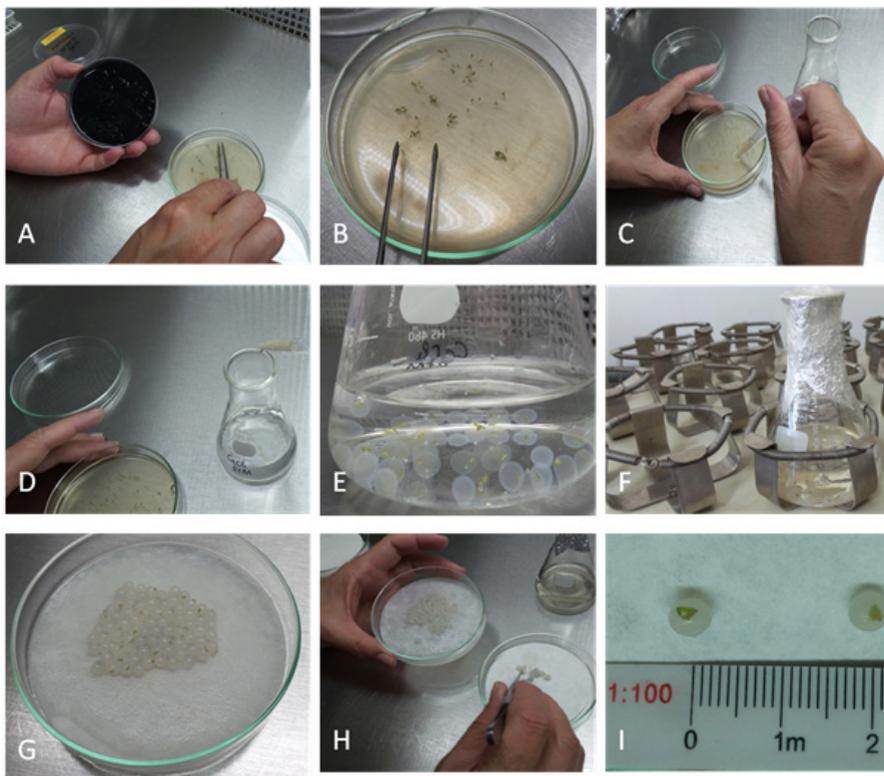


Figura 2. Etapas do encapsulamento em gel de alginato de cálcio de ápices caulinares (AC) de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). A-B: transferência de AC para solução 3% de alginato de sódio; C-D: gotejamento de alíquotas de solução de alginato de sódio em frasco contendo solução 100 mM de cloreto de cálcio; E-F: cápsulas em polimerização; G: aspecto das cápsulas formadas contendo um único AC; H: transferência das cápsulas para papel filtro a fim de remover a solução de cloreto de cálcio; I: aspecto de cápsulas individuais, de formato esférico, com aproximadamente 0,5 cm de diâmetro.

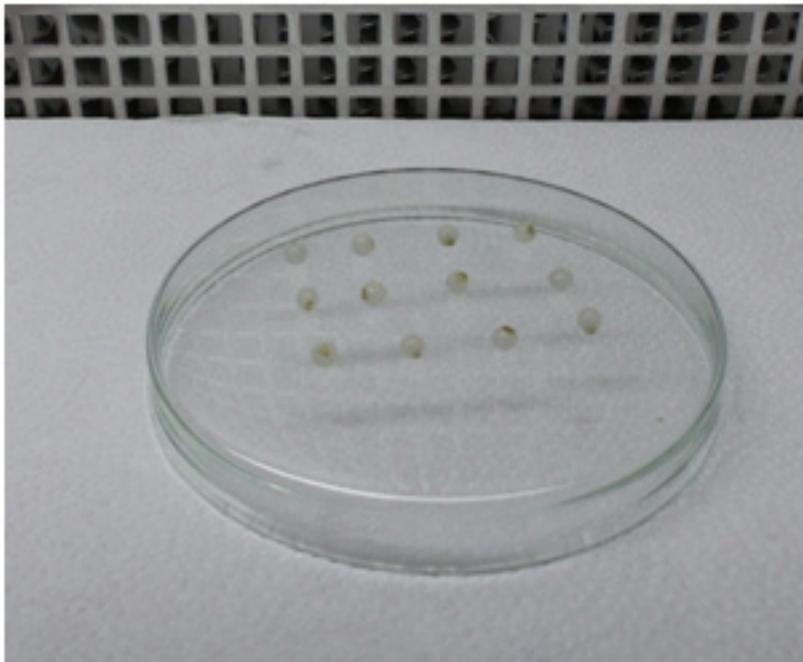


Figura 3. Cápsulas de alginato de cálcio contendo ápices caulinares de mandioca durante desidratação em cabine de fluxo laminar.

Encapsulamento-vitrificação (Figura 4)

- Isolamento dos AC.
- Encapsulamento: transferência dos AC para gel de alginato de sódio, composto por MS-62 líquido suplementado com 3% de alginato de sódio.
- Vitrificação: transferência dos AC encapsulados para criotubos contendo 2,0 mL solução de vitrificação PVS₂ (Plant Vitrification Solution 2), composta por MS-62 líquido contendo 15% de DMSO, 15% de etilenoglicol, 30% de glicerol e 0,4 M de sacarose, por 60 minutos.
- Congelamento rápido: imersão direta dos criotubos em nitrogênio

líquido (-196°C), em velocidade e congelamento de -263°C min.⁻¹, por no mínimo uma hora.

- Descongelamento rápido: remoção dos criotubos do criotanque e imersão em banho-maria, em temperatura de 40 ± 2°C, sob agitação, por 1,5 - 3,0 minutos.

- Diluição da PVS₂: remoção da solução de vitrificação dos criotubos e adição de 2,0 mL de solução de diluição composta por meio de cultura MS-62 líquido suplementado com 1,2 M de sacarose, por 20 minutos.

- Regeneração: transferência das cápsulas para meio de cultura MS-62 sólido e cultivo em sala de crescimento com temperatura de 25 ± 2°C e fotoperíodo de 12/12 horas.

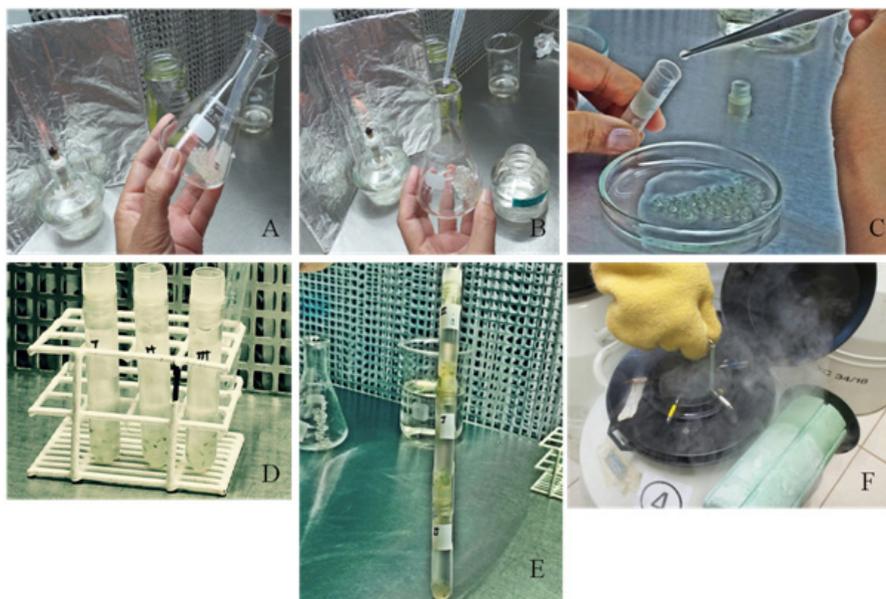


Figura 4. Etapas da vitrificação com PVS₂ de ápices caulinares de mandioca encapsulados em alginato de cálcio. A-B: etapas do tratamento das cápsulas contendo um único AC com solução de vitrificação PVS₂; C-D: transferência das cápsulas para criotubos; E: transferência de criotubos para cânulas de alumínio para congelamento; F: submersão de canisters contendo cânulas de alumínio com amostras de AC de mandioca encapsulados em alginato de cálcio para congelamento rápido.

Regeneração após a criopreservação

Após o descongelamento, seguido ou não de remoção da solução de vitrificação, os AC foram transferidos para tubos de ensaio de vidro contendo 10 mL de meio MS-62 básico (MURASHIGE; SKOOG, 1962) e cultivados no escuro por 48 horas em estufa tipo BOD. Após 48 horas, o material foi transferido para sala de cultura e mantido em condições padrão de cultivo *in vitro*, com 12 horas de fotoperíodo e temperatura constante de $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Em cada um dos experimentos, foram utilizadas três repetições de 15 explantes.

Análise estatística

Os percentuais de regeneração obtidos foram submetidos à análise de variância "Two way ANOVA", seguida de pós-teste de Bonferroni para comparação de médias ($P < 5\%$).

Resultados e Discussão

Os resultados de regeneração obtidos neste estudo para ápices caulinares de mandioca criopreservados com a utilização de duas metodologias diferentes são apresentados na Figura 5. Verificou-se a ocorrência de diferenças significativas nos percentuais médios de regeneração dos explantes, as quais estão associadas tanto às metodologias utilizadas quanto aos genótipos testados. Ápices caulinares do acesso BGM 1429-23 apresentaram percentuais de regeneração semelhantes nas duas metodologias testadas, 72% (encapsulamento-vitrificação) e 80% (vitrificação). Por outro lado, os percentuais médios de regeneração dos ápices caulinares do acesso BGM 603 foram bastante distintos em função da metodologia utilizada, 33% (encapsulamento-vitrificação) e 70% (vitrificação).

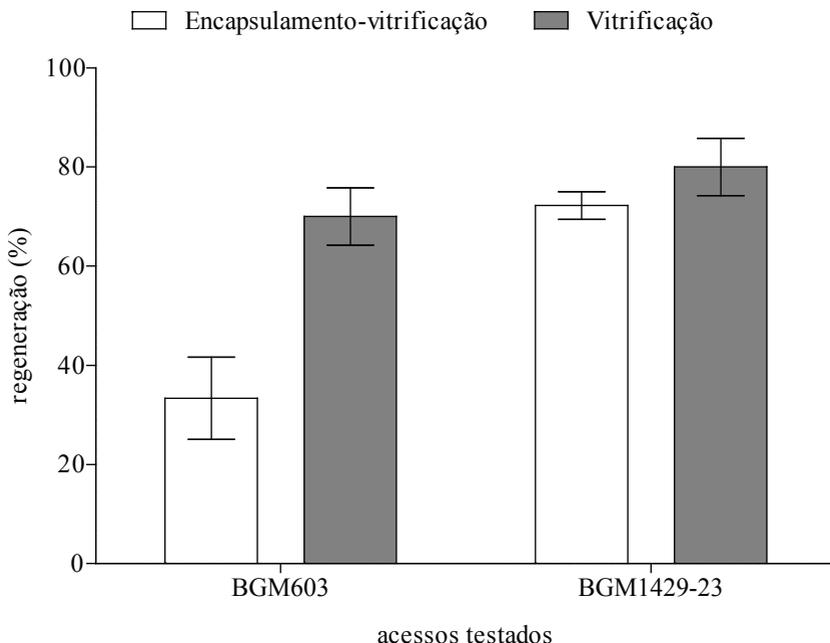


Figura 5. Percentuais médios de regeneração de ápices caulinares de dois acessos de mandioca (BGM 603 e BGM 1429-23) à criopreservação, utilizando-se encapsulamento-vitrificação e vitrificação.

Durante a primeira semana de cultivo em condições de cultivo padrão (12 horas de luz, $25 \pm 2^\circ\text{C}$), foram feitas avaliações diárias dos explantes para acompanhamento de seu desenvolvimento e para controle de contaminação microbiana. Em seguida, foram feitas avaliações semanais por até três meses. De acordo com critérios de avaliação estabelecidos no laboratório, foram considerados como sobreviventes ao congelamento em nitrogênio líquido apenas os explantes que após o descongelamento e cultivo *in vitro* retomaram crescimento e produziram plântulas com morfologia típica de plântulas de mandioca obtidas a partir de explantes controle, ou seja, aquelas que apresentaram formação de parte aérea e radicular, estruturas essenciais para a obtenção de plantas normais (Figura 6 A e B).

Após 30 dias de cultivo *in vitro*, foi feita a avaliação final, em que a porcentagem de plântulas normais obtida foi registrada e as plântulas foram fotografadas (Figura 6).

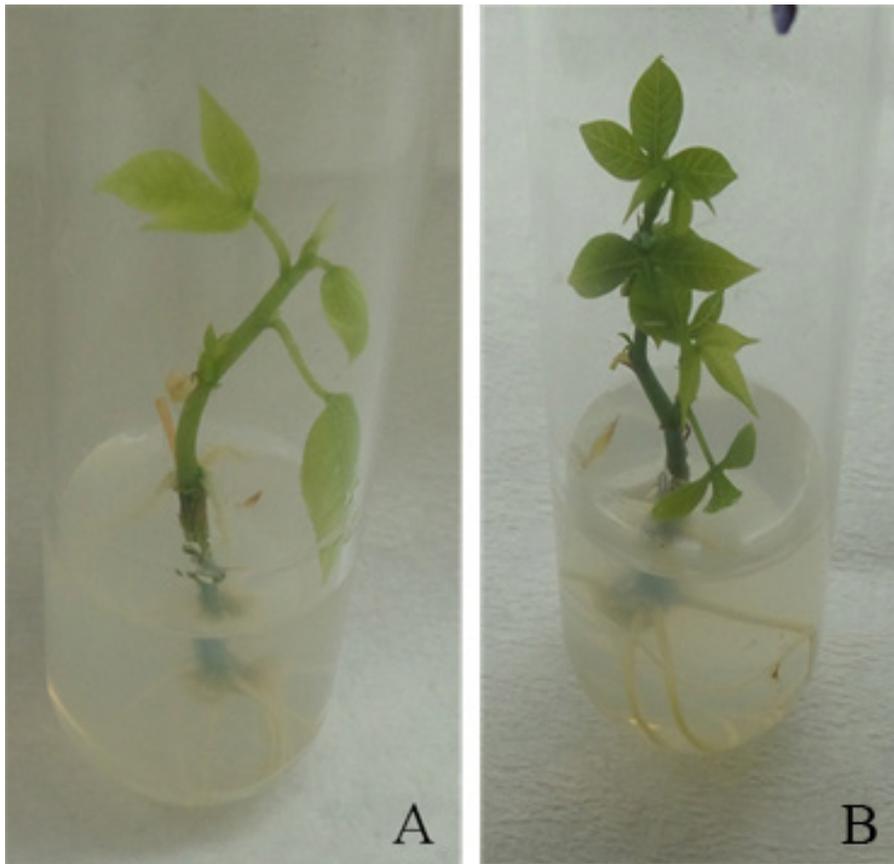


Figura 6. Aspecto das plântulas de mandioca obtidas a partir de AC criopreservados em nitrogênio líquido utilizando-se a vitrificação com PVS_2 , após 30 dias de cultivo *in vitro* em sala de crescimento com fotoperíodo de 12 horas de luz e temperatura constante de $25 \pm 2^\circ\text{C}$. A: controle, plântula com morfologia normal, apresentando parte aérea e raízes de aspecto normal, obtida de AC que não foi submetido à criopreservação; B: plântula com parte aérea e raízes de aspecto normal, obtidas a partir de AC criopreservados utilizando-se a vitrificação com PVS_2 .

Observou-se diferença de resposta dos acessos BGM 603 e CG 1489-23 à metodologia de encapsulamento-vitrificação, que propiciou percentuais de sobrevivência médios dos AC de 33% e 73% para BGM 603 e CG 1489-23, respectivamente.

A metodologia de vitrificação mostrou-se mais favorável e permitiu ótimas porcentagens de sobrevivência dos AC de ambos os acessos utilizados, ou seja, 72% (BGM 603) e 80% (CG 1489-23). Segundo Marco-Medina e Serrano-Martínez (2012), a vitrificação é uma técnica mais prática e que propicia altas taxas de sobrevivência de explantes vegetais. Os resultados obtidos neste trabalho corroboram essa afirmação e sugerem que quando se pretende determinar a metodologia que seja mais eficiente, prática e possa ser incorporada rotineiramente para a conservação criogênica de germoplasma de mandioca, deve-se optar pela vitrificação.

Conclusões

Os resultados obtidos neste trabalho mostram que a criopreservação de ápices caulinares de mandioca, utilizando-se a vitrificação com PVS₂, é uma metodologia viável e sugerem que esta metodologia poderia ser utilizada para a conservação a longo prazo de germoplasma dessa espécie em ambiente protegido de condições climáticas adversas e do ataque de pragas e doenças, em condições de alta estabilidade genética e integridade biológica. Estes resultados indicam também que é necessário ajustar as diferentes etapas das metodologias de criopreservação testadas para melhorar e padronizar a sobrevivência de explantes de genótipos distintos.

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 mononodal culture. **Scientia Horticulturae**, v. 98, p. 485-492, 2003.

ESCOBAR, R. H.; MAFLA, G.; ROCA, W. M. A methodology for recovering cassava plants from shoot tips maintained in liquid nitrogen. **Plant Cell Reports**, v. 16, p. 474-478, 1997.

FABRE, J.; DEREUDDRE, J. Encapsulation-dehydration: a new approach to cryopreservation of Solanum shoot-tips. **CryoLetters**, v. 11, p. 413-426, 1990.

FIALHO, J. de F.; VIEIRA, E. A. (Ed.). **Mandioca no Cerrado**: orientações técnicas. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2011. 208 p.

IBGE. DPE/COAGRO. LSPA: janeiro de 2015: **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola**: pesquisa mensal de previsão e acompanhamento das safras agrícolas no ano civil. <<http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/imprensa/ppts/00000020663902102015392812239582.pdf>>. Acesso em: setembro 2015.

INTERNATIONAL NETWORK FOR CASSAVA GENETIC RESOURCES, 1., 1992, Cali, Colombia. **Proceedings...** Roma: IPGRI, 1994.

LI, De-Zhu; PRITCHARD, H. W. The science and economics of *ex situ* plant conservation. **Trends in Plant Science**, v. 14, n. 11, p. 614-621, 2009.

MANDIOCA – A RAIZ DO BRASIL. “O pão do Brasil”. Um símbolo da identidade cultural brasileira. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, [S.d.]. Disponível em: <<http://www2.camara.leg.br/atividade-legislativa/comissoes/comissoes-permanentes/capadr/audiencias-publicas/audiencias-publicas-2013/audiencia-publica-16-de-abril-de-2013-embrapa-mandioca>>. Acesso em: setembro 2015.

MARCO-MEDINA, A.; SERRANO-MARTÍNEZ, F. Crioconservación: herramienta para la conservación *ex situ* de material vegetal. **Cuadernos de Biodiversidad**, v. 38, p. 9-12, 2012.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiology of Plant**, v. 15, p. 473-497, 1962.

SAKAI, A.; KOBAYASHI, S.; OIYAMA, I. Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification. **Plant Cell Reports**, v. 9, p. 30-33, 1990.

SILVA, A. C. B. da; ALVES, M. P. V.; AQUINO, D. T. de. A importância da produção da mandioca na comunidade do Castainho – Garanhuns, PE. **Breves Contribuciones del Instituto de Estudios Geográficos**, n. 22, p. 75-90, 2010/11. Disponível em: <http://www.filo.unt.edu.ar/rev/ieg/ieg_22/Breves%2022-5-da%20Silva-Alves-de%20Aquino.pdf>. Acesso em: setembro 2015.



***Recursos Genéticos e
Biotecnologia***