



**PROTOCOLO DE MICROPROPAÇÃO E
CONSERVAÇÃO DE 23 GERMOPLASMA
DE MANDIOCA (*Manihot esculenta*
Crantz)**

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 187

PROTOCOLO DE MICROPROPAGAÇÃO E CONSERVAÇÃO DE 23 GERMOPLASMA DE MANDIOCA (*Manihot esculenta* Crantz)

L. Pedro Barrueto Cid
Luiz Joaquin Castelo Branco Carvalho
Rúbia Estefânia Pinto da Silva
Leonardo Soriano

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Serviço de Atendimento ao Cidadão
Parque Estação Biológica, Av. W/5 Norte (Final) –
Brasília, DF CEP 70770-900 – Caixa Postal 02372 PABX: (61) 448-4600 Fax: (61) 340-3624
<http://www.cenargen.embrapa.br>
e.mail:sac@cenargen.embrapa.br

Comitê de Publicações

Presidente: *Sergio Mauro Folle*
Secretário-Executivo: *Maria da Graça Simões Pires Negrão*
Membros: *Arthur da Silva Marante*
Maria de Fátima Batista
Maurício Machain Franco
Regina Maria Dechechi Carneiro
Sueli Correa Marques de Mello
Vera Tavares de Campos Carneiro
Supervisor editorial: *Maria da Graça S. P. Negrão*
Normalização Bibliográfica: *Maria Iara Pereira Machado*
Editoração eletrônica:

1ª edição

1ª impressão (2007):

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

P 967 Protocolo de micropropagação e conservação de 23 germoplasma de mandioca
(*Manihot esculenta* Crantz) / L. Pedro Barrueto Cid ... [et al.]. -- Brasília, DF:
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007.
12 p. -- (Boletim de pesquisa e desenvolvimento / Embrapa Recursos Genéticos
e Biotecnologia, 1676 - 1340; 187).

1. *Manihot esculenta* - germoplasma - micropropagação - protocolo. 2. *Manihot esculenta* - germoplasma - conservação - protocolo. I. Barrueto Cid, L. Pedro. II. Série.

631.5233 - CDD 21.

PROTOCOLO DE MICROPROPAGAÇÃO E CONSERVAÇÃO DE 23 GERMOPLASMA DE MANDIOCA (*Manihot esculenta* Crantz)

L. Pedro Barrueto Cid¹

Luiz Joaquin Castelo Branco Carvalho¹

Rúbia Estefânia Pinto da Silva²

Leonardo Soriano²

Resumo

Hastes de mandioca de acessos oriundos da Amazônia, obtidas no campo e/ou casa de vegetação, foram estabelecidas *in vitro* com meio basal SP. O procedimento para assepsia das micro-estacas envolveu o tratamento das mesmas com hipoclorito de sódio 2,5%; Claforam e Benlate 0,1%, ou PPM 2,0 ml L⁻¹. Os resultados observados indicaram níveis variáveis de contaminação entre 10-90% nos explantes iniciais, no entanto todos os acessos foram estabelecidos. O meio SP se mostrou apropriado para o crescimento dos explantes gerando plântulas vigorosas e estáveis, que foram repicadas periodicamente através das gemas nodais e estão sendo mantidas há mais de três anos.

Termos para indexação: germoplasma, cultura *in vitro*, meio SP.

¹ Pesquisadores de: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

² Estudantes de: Biologia e Engenharia Florestal

Abstract

Stem cuttings of cassava germplasm accessions originated from Amazon were harvested from field plots and greenhouse grown plants to be introduced in the *in vitro* collection with basal medium SP. A procedure for stem cuttings sterilization with 2,5 % sodium hypochlorite; Claforam and Benlate 0,1% or PPMTM 2 ml/L was used. The results showed variable levels of contaminant from 10-90% in the initial explants. However, all accessions were established. The SP medium showed to be appropriated for initial establishment of germplasm accessions with health, vigorous and stable plants that are being cultivated for more than three years.

Index terms: germoplasm, plant tissue culture, SP medium.

Introdução

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é uma planta C3 da família das Euphorbiaceae com grande importância econômica e alimentar para milhares de pessoas na faixa tropical do planeta, principalmente devido à acumulação de amido em suas raízes, sendo este valor próximo de 85% de seu peso seco (COCK, 1982). Por outro lado, os rendimentos por hectare de produção de raízes tuberosas podem variar de cultivar para cultivar, região para região, e tecnologia de cultivo. Desse modo, no Brasil, por exemplo, o rendimento médio por hectare na região sul e sudeste pode chegar a 18 t/ha, enquanto que, no nordeste, esse número atinge 10 t/ha (SILVA, 2004).

No Brasil encontra-se 56% das 97 espécies silvestres de *Manihot* descritas na América e muitas destas apresentam alto potencial como fonte de: biocombustível (produção de álcool); resistência à doenças e pragas (GOES et al., 2000); novas alternativas nutritivas, como betacaroteno (KAFUDA & PEREIRA, 2005), licopeno (FAKUDA & PEREIRA, 2006).

Portanto, a cultura de tecidos surge no horizonte do agronegócio da mandioca, tanto porque pode multiplicar o material clonal superior, quanto por conservar germoplasma de forma expedita e econômica, dentro da perspectiva de aprimorar o banco de germoplasma da espécie (ROCA, 1984).

No Laboratório de Cultura de Tecidos II da Embrapa Recursos Genéticos y Biotecnologia da área de biotecnologia de plantas, estão sendo desenvolvidos esforços no sentido de estudar e aprimorar a conservação *in vitro* de cultivares e *land-races* nacionais, cujo impacto dentro do agronegócio não é totalmente conhecido, bem como seus requerimentos nutricionais *in vitro* via formulação de um meio nutritivo padrão, ainda não completamente determinados. Por isso, o presente trabalho visa apresentar dados e discuti-lo a este respeito.

Material e Métodos

a) A coleta e assepsia do material usado se fez conforme Silva (2004), com algumas ligeiras modificações. Hastes de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) oriundas do banco de germoplasma da Embrapa Recursos Genéticos y Biotecnologia, em Brasília-DF, foram cortadas em 20-30cm de comprimento por 1,5-2,0cm de largura. No laboratório as estacas foram primeiramente lavadas com água corrente e detergente líquido, depois imersas por 24 horas em suspensão de Benlate (Benomyl) 0,1% com agitação periódica. Em seguida, para a indução de brotação, foi feito um corte em bisel na parte basal das estacas e logo foram tratadas com AIB (ácido indol-butírico) e talco 0,1% (peso/peso); depois, as estacas foram colocadas em saco plástico preto (1kg), com vermiculita autoclavada, cobertas por saco plástico e levadas à casa de vegetação onde foram manualmente irrigadas com água no início e, posteriormente, com macro/2 e micronutrientes do meio básico MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962). A temperatura média na casa de vegetação durante o dia foi aproximadamente de 25 -30°C e a umidade relativa em torno de 70% (Figura1).

b) Quando os ramos surgidos da brotação das gemas, apresentaram entre 10 e 20 cm de comprimento, os mesmos foram cortados, trazidos ao laboratório, e divididos em segmentos menores, 1,0-2,0 cm, cada um contendo uma gema. As microestacas resultantes foram lavadas com detergente líquido e água corrente. Na câmara de fluxo laminar, o material vegetal foi submetido à água sanitária (formulação comercial: hipoclorito de sódio 2,5%) durante 10 minutos e posteriormente os explantes foram submetidos a uma mistura de Claforam (Cefotaxima sódica) e Benlate (Benomyl) 0,1% durante uma hora sob agitação, sendo que, para cada cultivar, foram utilizadas 20 micro-estacas.

c) As microestacas foram inoculadas em tubos de ensaio contendo 15ml de meio de cultura SP (BARRUETO CID, 2005) mais Claforam e Benlate 0,1% respectivamente durante 15 dias. Claforam foi esterilizada por filtração de membrana Millipore 0,2µm de diâmetro e o Benlate autoclavado juntamente com o meio de cultura. Cumprido este tempo, as microestacas foram transferidas para meio SP. Quando os brotos destas microestacas alcançaram entre 1,0 e 2,0 cm os nós foram retirados e submetidos a hipoclorito de sódio 2,5 % por 10 minutos, lavados com água esterilizada e inoculados em meio SP. A respeito da manutenção do material, a cada 50-60 dias aproximadamente, os nós das plantas *in vitro* foram isolados e repicados no mesmo meio, colocando-se um por tubo de ensaio.

d) Uma variante a respeito do protocolo descrito anteriormente foi no caso da land-race 36.1. Nesta cultivar, um outro procedimento paralelo foi introduzido. Hastes de cerca de 20 cm de comprimento x 0,5-1,0cm de largura foram retiradas de plantas mantidas em casa de vegetação em sacos plástico preto com, aproximadamente 1kg de terra. Trazidas ao laboratório, as hastes foram lavadas com água corrente e detergente líquido, cortadas em microestacas de aproximadamente 1,0-2,0 cm contendo uma gema por microestaca. Em seguida, foram desinfestadas com hipoclorito de sódio 2,5% por 10 minutos, enxaguados com água esterilizada e autoclavada; e inoculadas em tubos de ensaio contendo meio SP mais PPMTM (Plant Preservative Mixture; Plant Cell Technology - Washington DC USA), cujos ingredientes ativos são: 5 cloro-2 metil-3(2H)- isotiazolona e 2 metil-3-(2H)-isotiazolona, na concentração 2,0 ml L⁻¹. Após 25 dias, as gemas das microestacas já tinham brotado, apresentando um comprimento de aproximadamente 1,5 a 2,0 cm. As mesmas foram retiradas e inoculadas em meio SP + 2,0 ml L⁻¹ de PPM por 15 dias. Após este período, as mesmas foram transferidas para tubos de ensaio contendo apenas meio SP. Em relação à manutenção deste material, foi feito da mesma forma como indicado no item C, em que periodicamente eram retirados os nós e repicados em tubos de ensaio com 15 ml de meio SP.

As condições de luz e temperatura foram padronizadas com fotoperíodo de 16 horas de luz (50 µmol.m⁻².s⁻¹) e 25 ± 2°C. Os germoplasma utilizados na conservação *in vitro* foram: Cas36.0, Cas36.1, Cas36.3, Cas36.11, Cas36.12, Cas36.14, Cas36.18, Cas061 (Baixinha-AP), Cas036.27 (Castanhal), Cas032 (F-5077), IAC 12-829, Cas036.26 Iguaçu, Cas0312 (Klainasik), Cas055 (Manicueira-66), Cas070 (Maniçoba), Cas051 Mirassol, Cas061 (Olho Verde-1),

Cas057 (Ouricuri-37), Cas059 (Precoce), Cas058 (Pretinha-24), Cas36.24 (São Francisco 1), Cas036.25 (São Francisco 2) e Cas062 (Surubim-41).

Resultados e Discussão

As hastes na vermiculita e em casa de vegetação brotaram e desenvolveram com um bom sistema radicular o que permitiu ter uma boa fonte de explantes, inclusive durante o período de seca (em Brasília este período refere-se aos meses de junho, julho e agosto), ocasião na qual, não foram observados novos lançamento desta Euphorbiacea no campo.



Figura 1. Hastes de mandioca, 36.12, brotando em casa de vegetação após 30 dias.

À respeito da contaminação por fungos e bactérias nas microestacas provenientes de material do campo, esta variou aproximadamente entre 10% a 90% entre os diversos germoplasma. Quando o material é diretamente oriundo do campo, sua desinfestação torna-se dificultada em decorrência da contaminação endógena e, desse modo, o hipoclorito de sódio surte pouco efeito devido a sua ação superficial, porém ainda assim, é um consagrado anti-séptico em matéria de cultura de tecidos de plantas (TRIGANO & GRAY, 2000).

Mesmo nos tratamentos com Claforam e Benlate nos meios, foi observada contaminação, a qual presumivelmente, é também consequência do amplo leque de contaminantes, ficando fora da faixa de ação destes compostos. Por isso, um complemento de antibiótico e fungicida tornou-se necessário como providencia. Contudo, as microestacas não contaminadas, permitiram a brotação e alongamento de gemas axilares, facilitando assim, sua repicagem periódica através dos seus respectivos nós (Figura 2).

Conforme Barrueto Cid & Durzan (2003), Claforam na concentração usada não apresenta fitotoxicidade, além do mais, é uma substância solúvel em água o que favorece sua manipulação



Figura 2. Nós de mandioca Surubim, oriundos de brotos de microestacas obtidos de plantas estabelecidas *in vitro*.

O Benlate, por sua vez, tem sido um excelente fungicida pelo seu amplo espectro de ação e porque pode-se autoclavar juntamente com o meio de cultura. Entretanto, vale ressaltar que este produto foi retirado do mercado, sendo necessário que a cultura de tecidos de plantas pesquise outros produtos de eficácia parecida.

Sobre o genótipo 36.1 da casa de vegetação, o PPM foi capaz de controlar a contaminação das microestacas, alcançando aproximadamente 90% de assepsia. Segundo Barrueto Cid e Jordan (2006), este composto apresenta um alto poder biocida (Figura 3).



Figura 3. Microestaca de mandioca 36.1 brotando em meio SP suplementado com PPM com aproximadamente 30 dias.

No entanto, quando os brotos foram isolados das microestacas e inoculados em meio SP, foi necessário que este meio fosse suplementado também com $2,0 \text{ ml L}^{-1}$ de PPM, do contrário, a contaminação especialmente bacteriana aparecia. Contudo, a prática mostrou que 15 dias nestas condições foram suficientes para contornar a contaminação.

O PPM é um composto pouco citado na literatura nacional da cultura de tecidos e, quando aplicado em doses toleráveis, como no presente caso, torna-se um eficaz anti-patógeno, com a vantagem de ser completamente solúvel e autoclavável, podendo substituir os antibióticos e fungicidas, porém, seu inconveniente é ser um produto importado.

O land-race 36.1 é um material interessante porque apresenta uma rápida brotação *in vitro* uma vez que a microestaca e seus brotos não foram afetados pela ação do PPM, na dose utilizada, quando os mesmos foram isolados e inoculados em SP suplementado com este biocida.

Entre 40 e 60 dias, brotos dos diferentes germoplasma cresceram no meio SP de forma vigorosa, inclusive originando um sistema radicular ramificado e abundante (Figura 4) e, já com 90 dias, as plântulas dentro do tubo alcançaram comprimentos em torno de 10,0cm (Figura 5) no entanto, não foi desejável esperar por todo esse tempo em decorrência do aparecimento de sintomas de senescência. Ainda naquele período (40 e 60 dias), o comprimento da parte aérea oscilou entre 4,0 e 8,0cm, fornecendo cerca de 4 a 6 nós por planta, os quais, foram determinantes para as sucessivas repicagens e conservação do material pois, entre outras razões, apresentam baixa ou nula tendência à oxidação fenólica (Figura 4).

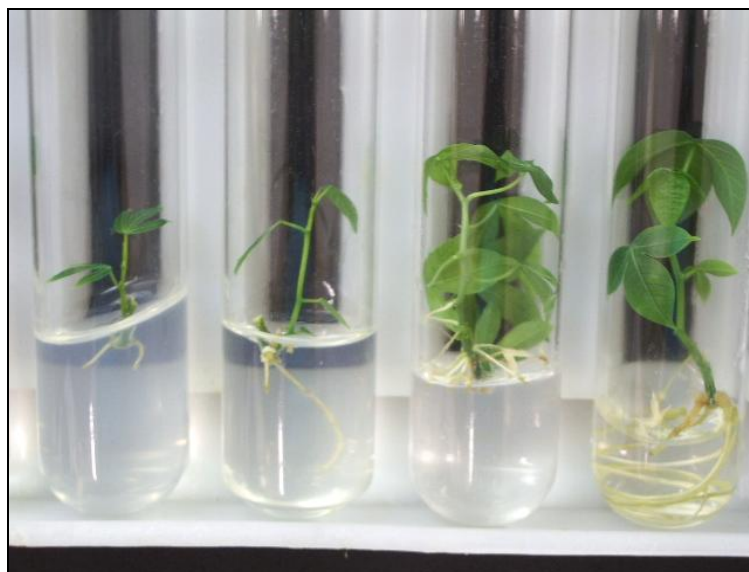


Figura 4. Seqüência de crescimento do cultivar Mirassol, em meio SP. A primeira planta da esquerda com 15 dias, e subseqüentemente plantas com 25, 35 e 45 dias, esta última com aproximadamente 4,2 cm de comprimento, também notar nesta, o vigoroso sistema radicular.

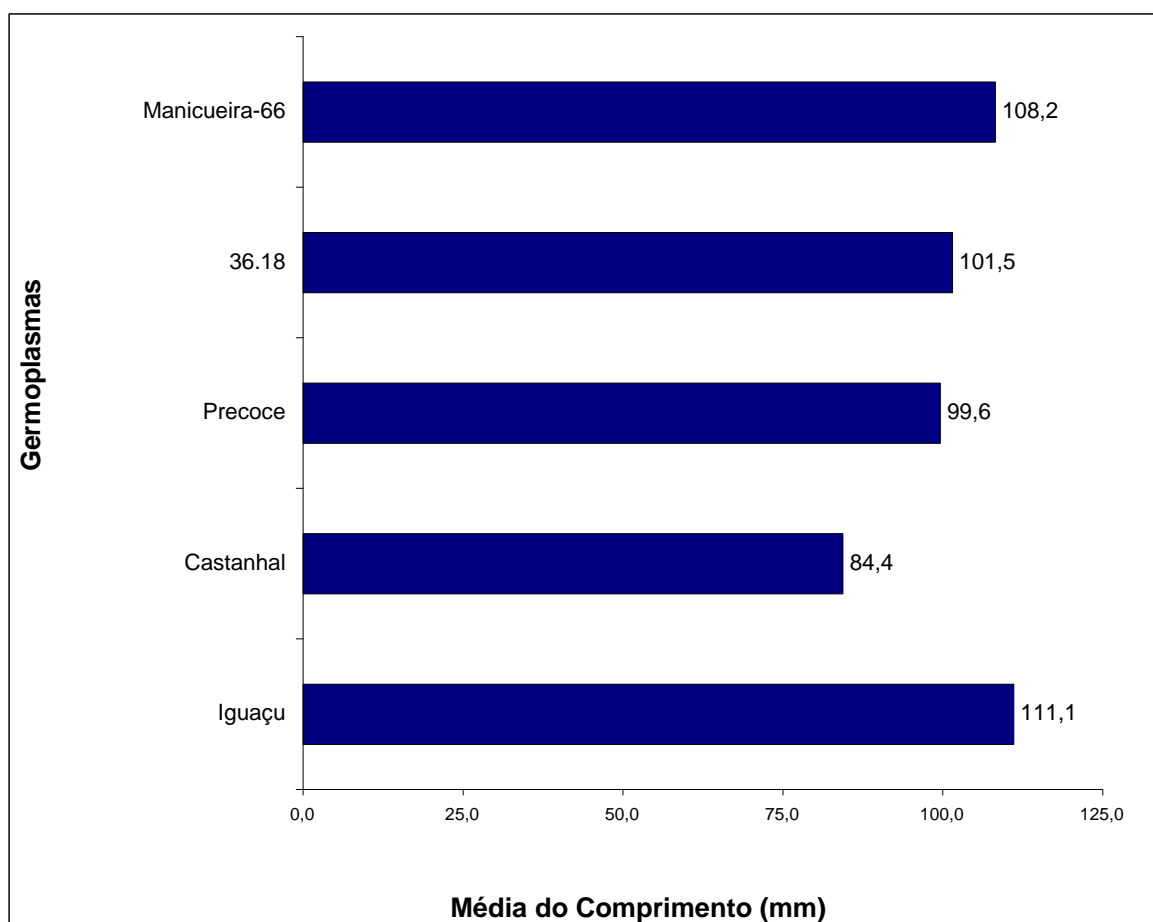


Figura 5. Média de comprimento de caule de alguns genótipos: Manicueira 66, 36.18, Precoce, Castanhal e Iguaçu após 90 dias mantidas *in vitro*.

A conservação dos diferentes germoplasma de mandioca utilizados provou ser totalmente viável nas condições experimentais apresentadas no presente protocolo, porém, necessita-se de repicagens periódicas, as quais consomem mão-de-obra qualificada, tempo e reagentes. Na literatura, a constante manutenção do material *in vitro* tem sido abordada, utilizando alternativas como altas dosagens de sacarose ou manitol, bem como, o controle da temperatura de incubação (ROCA, 1984). Em nosso laboratório, tem sido estudado o encapsulamento de microestacas a base de alginato de cálcio em baixa temperatura e, na indução da dormência, o uso do ácido abscísico; sendo que, em ambos procedimentos, os resultados têm sido promissores (dados não apresentados).

Conclusão

Um protocolo de micropropagação de diferentes germoplasma de mandioca foi estruturado. No mesmo, foi verificado um crescimento vigoroso e adequado das plantas no tocante à parte aérea e sistema radicular.

Embora não foi eliminada totalmente a contaminação dos explantes iniciais, provindo do campo ou casa de vegetação, com a metodologia utilizada, foi possível contorná-la e, posteriormente, realizar o resgate do material para sua eficaz micropropagação e conservação.

Referência

BARRUETO CID, L.P.; DURZAN, DJ. **Efeito da cefotaxima na germinação, crescimento e brotação de gemas axilares sob condições *in vitro***. Brasília,DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento/Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. ISSN 1676-1340; n.49). 2003. 17p.

BARRUETO CID, L.P.; SILVA, R.E.P da. **Novas aplicações da cultura de tecidos na mandioca (*Manihot esculenta*, Crantz)**. XI Congresso Brasileiro de mandioca. Campo Grande , MS, 25-28 X, 2005. Secretaria de Estado de Planejamento e de Ciência e Tecnologia de Mato Grosso do Sul.

BARRUETO CID, L.P.. El cultivo de tejidos. **In:** PRIETO, H.; JORDAN,M.;BARRUETO CID,L.P.; CORDEIRO, M.C.R.; DURZAN, D.J. **Biotecnologia vegetal**. Santiago-Chile: Instituto de Investigaciones Agropecuária. 2005.

BARRUETO CID, L.P.; JORDAN, M.Z. **A contaminação in vitro de plantas**. Brasília,DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento/Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, ISSN 1676-1340; n.122). 2006. 20p.

COCK, J.H. Cassava: a basic energy source in the tropic. **Science** v.218, p.755-762, 1982.

FUKUDA, W.M.G.; PEREIRA, M.E.C. **BRS gema de ovo mandioca de mesa biofortificada**. Brasília, DF: Embrapa; Cruz das Almas – BA: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2005. Folder.

FUKUDA, W.M.G.; PEREIRA, M.E.C. **BRS rosada mandioca de mesa com raiz colorida e mais nutritiva**. Brasília, DF: Embrapa; Cruz das Almas-BA: Embrapa mandioca e fruticultura Tropical, 2006b. Folder

GÔES, M.; MENDES, R.A.; SOUZA-SIQUEIRA, C.S.; LABUTO, L.B. Cultura de tecidos de três espécies silvestres de *Manihot*. In: Carvalho, L.J.C.B.; Tho, A.M.; Vilarinhos, A.D. (Eds.). **Cassava Biotechnology: IV International Scientific Meeting-CBN**. Brasília: Embrapa Genetic Resources & Biotechnology- Cassava Biotechnology Network, 2000. P.388-395.

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

Prieto, H.; Jordan, M.; Barreto, L.P.; Cordeiro, M.C.R.; Durzan, D.J. **Biotechnologia Vegetal**. Santiago-Chile: Instituto de Investigaciones Agropecuárias, INIA, 2005. p.31-53.

ROCA, W.M. Root and tuber crops. Sharps, W.R; Evans, D.A; Ammirato, P.V.; Yamada, Y. (Eds.). **Handbook of plant cell culture crop species**. New York: Macmillan Publishing Co. v.2. 1984. p. 269-301.

SILVA, R.P.da. **Micropropagação e indução de crescimento secundário em raízes *in vitro* de diferentes genótipos de mandioca (*Manihot esculenta*, Crantz)**. Relatório final. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. 2004. 12p.

TRIGANO, R.N; GRAY, D.J. **Plant tissue culture concepts and laboratory exercises**. Second edition. London: CRC Press, 2000. 454p.