ISSN 1516-5612

Circular Técnica 88

Cruz das Almas, BA
Dezembro, 2008

# Micropropagação da Mandioca Mediante Ápices Caulinares e Segmentos Nodais


## Autores

**Antônio da Silva Souza**
Eng. Agrônomo, D.Sc., Pesquisador da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, Cruz das Almas, BA, assouza@cnpmf.embrapa.br

**Fernanda Vidigal Duarte Souza**
Bióloga, D.Sc., Pesquisadora da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, Cruz das Almas, BA, fernanda@cnpmf.embrapa.br

**Janay Almeida dos Santos-Serejo**
Eng. Agrônoma, D.Sc., Pesquisadora da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, Cruz das Almas, BA, janay@cnpmf.embrapa.br

**Tatiana Góes Junghans**
Eng. Agrônoma, D.Sc., Pesquisadora da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, Cruz das Almas, BA, tatiana@cnpmf.embrapa.br

**Honorato Pereira da Silva Neto**
Eng. Agrônomo, Assistente A da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, Cruz das Almas, BA, honorato@cnpmf.embrapa.br


Embrapa

## Introdução

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), espécie da família Euphorbiaceae que é cultivada em diversas regiões tropicais e subtropicais, desempenha um importante papel como fonte de carboidrato, participando da alimentação diária de aproximadamente 500 milhões de pessoas em todo o mundo. Além disso, produtos provenientes de suas raízes tuberosas são empregados nas indústrias alimentícia, têxtil, farmacêutica e de mineração, e na fabricação de rações concentradas para animais. Por outro lado, as folhas de mandioca são utilizadas em muitos países, tanto na nutrição humana como animal, e como fonte de proteínas, sais minerais e vitaminas.

Em plantios de mandioca é freqüente observar-se, no momento da colheita, um número inferior de plantas em relação ao de manivas plantadas, devido à não brotação de manivas ou à morte de plantas. Ocorre uma notória desuniformidade no desenvolvimento das plantas, variação considerável na produção por planta e freqüentes podridões das raízes, fenômeno este que ocasiona baixo rendimento. Geralmente, acredita-se que as causas desses problemas são de ordem climática e/ou edáfica; entretanto, a qualidade das manivas é outro fator muito importante. A qualidade da maniva-semente tem relação direta com a brotação e o vigor da planta e conseqüentemente, com a produção de raízes. Além disso, as manivas podem se constituir num importante veículo de disseminação de pragas e doenças. Assim, a utilização de manivas de boa qualidade, aliada a um conjunto de práticas adequadas de cultivo, permitirá a obtenção de plantas mais vigorosas, mais sadias e com produções condizentes com o potencial de rendimento de cada variedade.

Entretanto, além da qualidade, a produção de manivas sadias enfrenta outro problema, inerente à espécie, que é o da baixa taxa de multiplicação, que é de aproximadamente 1:10, ou seja, de cada planta se obtêm 10 manivas de 20 cm de tamanho a cada 12 meses. Diante de tais limitações, novas alternativas vêm sendo desenvolvidas, de forma a acelerar a multiplicação de variedades e superar os problemas fitossanitários existentes. Vale a pena salientar que essas novas alternativas não devem ser vistas como substitutivas, e sim complementares, das técnicas convencionais.

Dentre tais alternativas, pode-se destacar a propagação vegetativa in vitro, também denominada de micropropagação, mediante a cultura de ápices caulinares (meristema apical associado a 1-3 primórdios foliares). Ela viabiliza a produção de um elevado número de mudas com excelentes condições sanitárias durante todo o ano, permitindo uma taxa de multiplicação de plantas de 1:5 a cada seis semanas.

Este protocolo de micropropagação, que já foi aplicado com sucesso em mais de 1.000 variedades de mandioca se constituirá em um documento prático para a obtenção rápida de plantas sadias de mandioca, superando assim um dos grandes obstáculos à disponibilidade de manivas de boa qualidade, que é a baixa taxa de multiplicação desta euforbiácea.

## Seleção de Manivas no Campo

Plantas sadias e vigorosas, com idade entre 8 e 14 meses (Fig. 1A), devidamente identificadas quanto ao genótipo, são selecionadas e cortadas a 10-15 cm da superfície do solo (Fig. 1B), eliminando-se em seguida seu terço superior (Fig. 1C) que é mais herbáceo e produzirá brotos menos vigorosos. Deve-se dar preferência a plantas cultivadas em bancos de germoplasma de instituições de pesquisa e/ou ensino, de forma a conseguir um material que é mantido sob um maior controle tanto genético como fitossanitário. No entanto, caso isso não seja possível, pode-se coletar plantas de campos experimentais ou até mesmo de áreas de produtores (Fig. 1D), desde que o genótipo seja comprovadamente reconhecido.

Fotos: Antonio da Silva Souza

**Fig. 1.** Mandiocal em estádio adequado para colheita de manivas (A), poda (B) e eliminação do terço superior da planta (C) e área de produtor mostrando bom estado fitossanitário (D).

## Plantio das Manivas em Casa de Vegetação

As manivas são, então, cortadas com facão bem afiado ou serra manual (Fig. 2A) em segmentos com 15 a 20 cm de comprimento (Fig. 2B), sendo o corte feito em ângulo reto (transversal à maniva), com o objetivo de haver uma formação mais uniforme de raízes, evitando-se nesse processo que sejam causados ferimentos nos tecidos das estacas. As estacas devem ser transportadas para casa de vegetação com o máximo de cuidado para evitar que ocorram danos mecânicos na epiderme e gemas, e plantadas em bandejas de isopor contendo substrato composto por fibra de coco e Plantmax®, na proporção de 1:1 (Fig. 2C). Caso seja um substrato que já foi utilizado, deve-se, preferencialmente, esterilizá-lo por autoclavagem durante uma hora, sob temperatura de 121ºC e pressão de 1,05 kg/cm².

Quanto às estacas, elas podem ser tratadas com um fungicida (Manzate ou Brassicol, respectivamente a 1,5 ou 2 g/L) associado a um inseticida (Malatol ou Dimetoato, respectivamente a 1 ou 2,5 g/L) em imersão por cinco minutos, para eliminar qualquer praga presente no material de plantio.

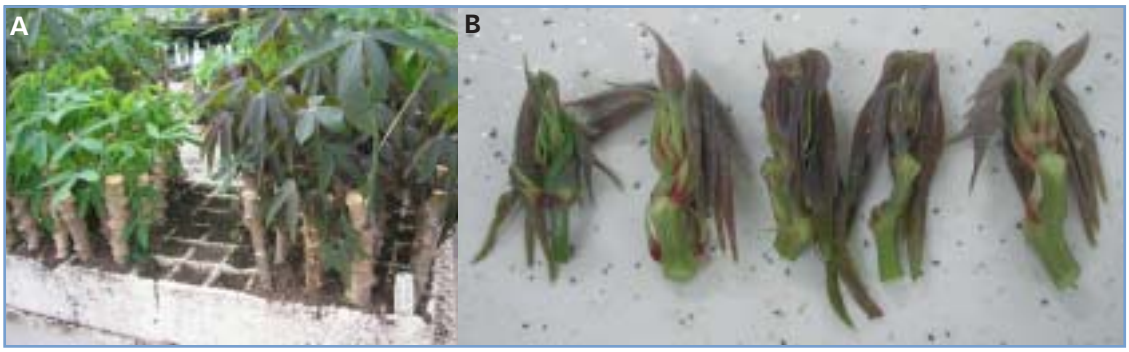
Fotos: Antonio da Silva Souza

**Fig. 2.** Corte da maniva com uma serra manual (A) em segmentos de 15 20 cm (B), que são posteriormente plantados em casa de vegetação (C).

## Colheita dos Brotos em Casa de Vegetação

Mesmo sendo cultivados sob condições não-asséptica, os brotos devem ser coletados com o máximo possível de assepsia para diminuir as chances de contaminação quando os ápices caulinares forem introduzidos in vitro. Como parte dessa assepsia, devem ser utilizados instrumentos e vidrarias limpas, e sempre que possível, não manusear os brotos com as mãos. É importante também evitar que os tecidos sejam danificados no momento da colheita, o que pode ser evitado com o uso de lâminas de bisturi novas e/ou tesouras amoladas.

Aos 12 a 15 dias, a depender da variedade, as gemas brotam e se desenvolvem, ocasião em que os ápices já podem ser cortados (Fig. 3A). Com o auxílio de uma tesoura ou uma lâmina de bisturi, os brotos são extraídos, com um tamanho em torno de 1,5-2,0 cm (Fig. 3B), colocados em um béquer pequeno, previamente identificado com o nome da variedade e contendo um pouco de água deionizada, e transportados imediatamente para o laboratório, a fim de se proceder a desinfestação, o isolamento e o estabelecimento in vitro dos ápices caulinares.




Fotos: Antonio da Silva Souza

**Fig. 3.** Manivas plantadas em casa de vegetação (A) e brotos extraídos (B) para isolamento de ápices caulinares.

## Desinfestação dos Brotos

Realizada obrigatoriamente na câmara de fluxo laminar, sob condições asséptica, esta etapa visa eliminar os microorganismos presentes na superfície do explante, descontaminando-o sem, contudo, causar sua morte. No processo de desinfestação procura-se eliminar bactérias e fungos, principalmente, e assim evitar as contaminações, que são muito prejudiciais tanto no estabelecimento in vitro dos explantes como nas etapas posteriores de multiplicação de brotos e enraizamento das plantas.

Inicialmente, fora da câmara de fluxo laminar, deve-se eliminar as folhas maiores que não fazem parte da região apical (Fig. 4A), retornando os brotos para o béquer com água. Prontos para o processo de desinfestação, os brotos (Fig. 4B) são levados para a câmara de fluxo, colocados ou não em uma pequena bolsa de malha de nylon ou gaze e submergidos em álcool 50% durante um minuto (Fig. 4C). O álcool, além de atuar como germicida, tem a propriedade de ser surfactante, quebrando a tensão superficial do tecido e, conseqüentemente, facilitando a ação do agente desinfestante sobre o explante. Logo depois os brotos são submersos em água deionizada autoclavada por 15 segundos e posteriormente em solução de hipoclorito de sódio a 0,25% por três minutos (Fig. 4D). Em seguida devem ser imersos em água deionizada autoclavada por três vezes consecutivas (aproximadamente durante cinco segundos cada vez), substituindo a água após cada imersão, de forma a eliminar resíduos do cloro nos explantes, o que pode, além de causar lesões nos tecidos, alterar o pH do meio nutritivo e assim prejudicar o estabelecimento e o desenvolvimento posterior dos ápices caulinares.

Manter os brotos no béquer, em uma pequena lâmina de água, para evitar que desidratem, e proceder a extração dos ápices caulinares logo em seguida, evitando, portanto, que uma permanência prolongada dos brotos na água cause o amolecimento dos tecidos e dificultem o isolamento.

Fotos: Antonio da Silva Souza

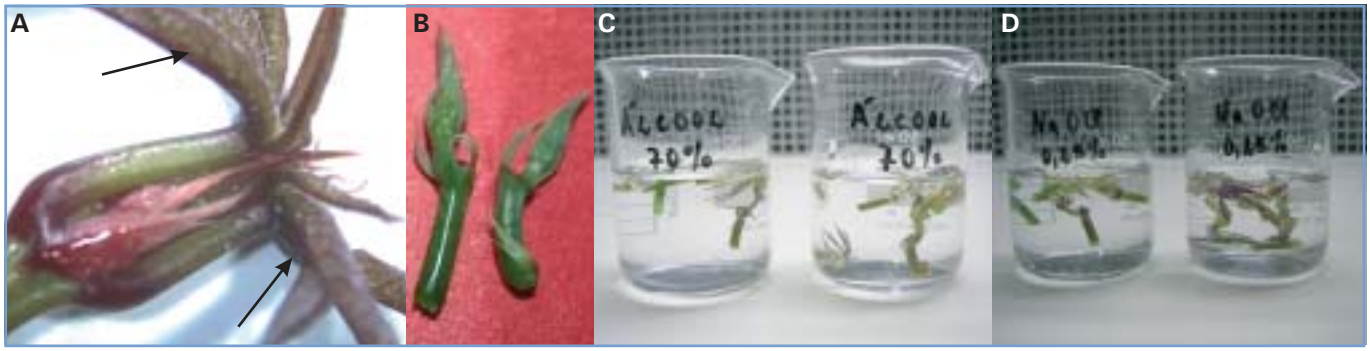



**Fig. 4.** Setas indicando folhas que não fazem parte da região apical (A), brotos sem essas folhas (B), submersos em álcool a 70% (C) e em desinfestação com hipoclorito de sódio a 0,25% (D).

## Isolamento e Estabelecimento dos Ápices Caulinares

Devido ao diminuto tamanho do ápice caulinar da mandioca após isolado, esta operação deve ser a mais rápida e precisa possível, de forma a evitar a desidratação dos tecidos e assegurar a maior taxa possível de sobrevivência dos explantes. Essa desidratação é favorecida tanto pelo fluxo de ar da câmara como pelo calor gerado pelas lâmpadas do microscópio estereoscópico, que tem de ser obrigatoriamente utilizado no processo, por causa do minúsculo tamanho dos explantes.

Assim, com o uso do microscópio estereoscópico (Fig. 5A), sob aumentos de 10 a 40X, vai-se eliminando gradativamente as folhas e estípulas (Fig. 5B) com o auxílio de pinça e bisturi contendo uma lâmina nº 11, até que se consiga visualizar o ápice caulinar (Fig. 5C). Nesse momento, o ápice caulinar apresenta 1-3 primórdios foliares e um tamanho de até 0,5 mm, devendo, então, ser cortado de forma que fique aderido à ponta da lâmina (Fig. 5D), para facilitar sua transferência ao meio de cultura. É importante que a lâmina de bisturi utilizada na incisão final do ápice caulinar seja usada apenas com este objetivo, para que o corte seja o mais preciso possível, evitando provocar danos nos tecidos. Um outro conjunto de bisturi e lâmina ficaria, então, para proceder a eliminação das folhas e estípulas durante a fase inicial da operação.

Fotos: Antonio da Silva Souza

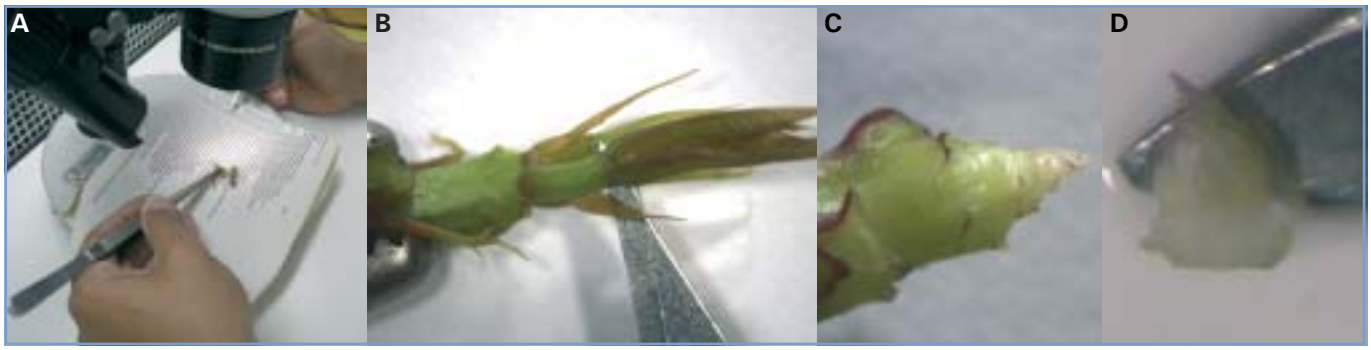
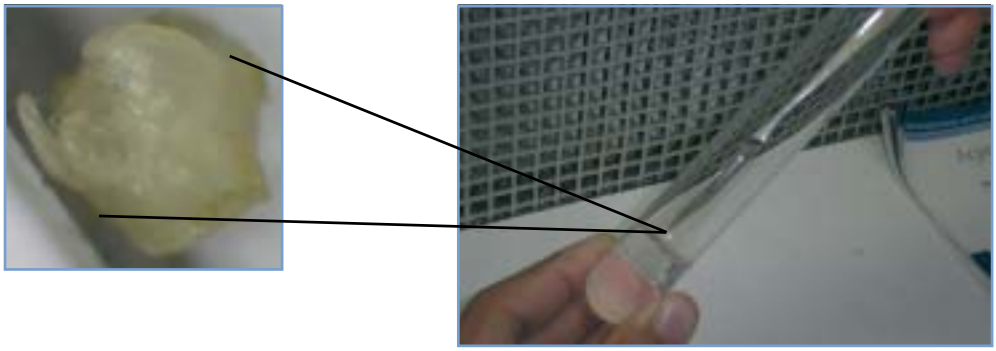



**Fig. 5.** Empregando microscópio estereoscópico (A), vai-se eliminando gardativamente as folhas e estípulas (B), deixando o ápice caulinar livre (C) para ser excisado com a lâmina do bisturi (D).

Colocar rapidamente o ápice caulinar sobre a superfície de 2,5 mL do meio de cultura de estabelecimento (Fig. 6), previamente distribuídos em tubos de ensaio de Ø = 14 x A = 100 mm, transferindo-os posteriormente para a sala de crescimento, sob condições de temperatura de 27 ± 1ºC, densidade de fluxo de fótons de 22 $\mu$E/m$^2$/s e fotoperíodo de 16 horas. Convém cobrir os tubos de ensaio com 1-3 camadas de gaze, durante os 10 primeiros dias do estabelecimento, para reduzir a luminosidade e permitir um melhor desenvolvimento dos explantes. Tem-se observado que no cultivo de ápices caulinares de mandioca, o emprego de tubos de ensaio pequenos, como os de diâmetro de 14 mm e altura de 100 mm, resulta em pequena formação de calos indesejáveis, o que reflete em maior rapidez na regeneração de plantas.



Fotos: Antonio da Silva Souza

**Fig. 6.** Colocação do ápice caulinar (no detalhe) de mandioca no meio de cultura de estabelecimento.

## Meio de Cultura

Uma adequada composição do meio de cultura é determinante para desencadear os processos morfogenéticos necessários à regeneração de plantas, sendo de relevante importância a incorporação na sua formulação de substâncias reguladoras do crescimento.

O meio de cultura empregado no estabelecimento in vitro de ápices caulinares de mandioca (Roca et al., 1991) é composto pelos sais minerais do MS (Murashige & Skoog, 1962), suplementado com tiamina-HCl, inositol, reguladores de crescimento e sacarose, gelificado com ágar ou Phytagel® (Tabela 1). Seu pH deve ser ajustado em 5,7-5,8 com KOH (ou NaOH) ou HCl 0,5-1,0 N (Fig. 7A) após a adição de todos os componentes. Com este pH, ligeiramente ácido, o meio de cultura favorece o crescimento dos ápices caulinares estabelecidos.

**Tabela 1.** Meios de cultura empregados nas fases do estabelecimento e multiplicação/enraizamento in vitro de variedades de mandioca.

| *Componentes* | *Meios de Cultura (mg/L)* | |
|---|---|---|
| | Estabelecimento | Multiplicação/Enraizamento |
| $NH_4NO_3$ | 1.650 | 1.650 |
| $KNO_3$ | 1.900 | 1.900 |
| $CaCl_2.2H_2O$ | 440 | 440 |
| $MgSO_4.7H_2O$ | 370 | 370 |
| $KH_2PO_4$ | 170 | 170 |
| $FeSO_4.7H_2O$ | 27,8 | 27,8 |
| $Na_2EDTA.2H_2O$ | 37,3 | 37,3 |
| KI | 0,83 | 0,83 |
| $H_3BO_3$ | 6,2 | 6,2 |
| $MnSO_4.4H_2O$ | 22,3 | 22,3 |
| $ZnSO_4.7H_2O$ | 8,6 | 8,6 |
| $Na_2MoO_4.2H_2O$ | 0,25 | 0,25 |
| $CuSO_4.5H_2O$ | 0,025 | 0,025 |
| $CoCl_2.6H_2O$ | 0,025 | 0,025 |
| Tiamina-HCl | 1 | 1 |
| Inositol | 100 | 100 |
| ANA | 0,02 | 0,01 |
| BAP | 0,04 | 0,01 |
| $AG_3$ | 0,05 | 0,01 |
| **Sacarose (g)** | 20 | 20 |
| **Ágar (g)** | 8 | 8 |
| **Phytagel® (g)** | 1,8 | 2 |

Depois de distribuídos nos tubos de ensaio, o meio deve ser autoclavado a uma temperatura de 121°C e pressão de 1,05 kg/cm², durante 20 minutos (Fig. 7B).

Após os 10 primeiros dias, eliminar a gaze e transferir os ápices caulinares, que já devem apresentar um tamanho em torno de 0,5 cm (Fig. 8A), para tubos de ensaio médios, de Ø = 16 x A = 125 mm, contendo 3,0 mL do meio de cultura de estabelecimento recém preparado.

Com mais 10-20 dias, os brotos apresentarão um tamanho entre 1,0 e 1,5 cm (Fig. 8B). Calos e raízes que porventura existam devem ser eliminados e o material conduzido para a fase seguinte do processo, que é a micropropagação.

Fotos: Antonio da Silva Souza

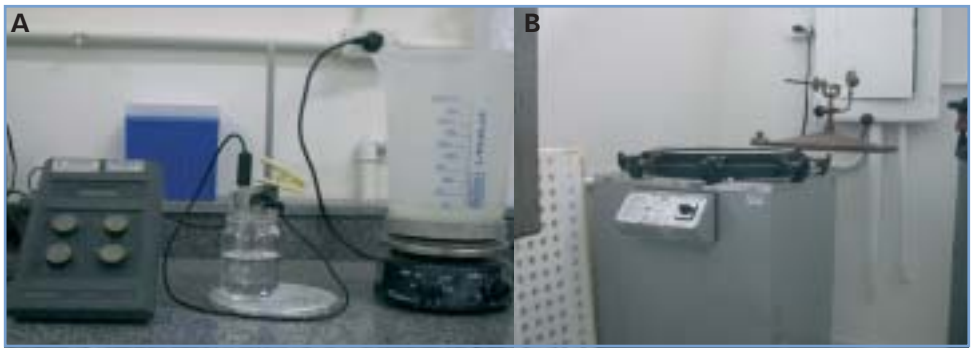



**Fig. 7.** Medidor de pH (A) e autoclave (B), equipamentos empregados, respectivamente, no ajuste do pH e esterilização de meios de cultura.

Fotos: Antonio da Silva Souza

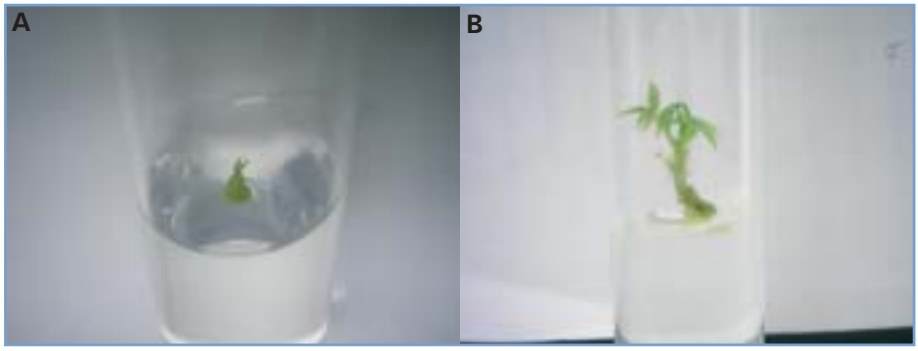



**Fig. 8.** Ápice caulinar (A) e broto de mandioca em crescimento (B).

## Micropropagação

Esta fase deve ser conduzida de forma a obter uma taxa de multiplicação satisfatória, sem interferir na qualidade do material. Essa qualidade, associada à uniformidade no desenvolvimento das plantas, serão fundamentais para o êxito do processo de enraizamento. Assim, para o processo de multiplicação in vitro de variedades de mandioca, os seguintes parâmetros devem ser considerados: a execução de subcultivos, a composição do meio de cultura e as condições ambientais de cultivo.

### Subculturas

Com os subcultivos sucessivos procura-se alcançar uma taxa de multiplicação mais elevada possível. Entretanto, além da quantidade, deve-se atentar para a produção de plantas bem homogêneas em termos de desenvolvimento.

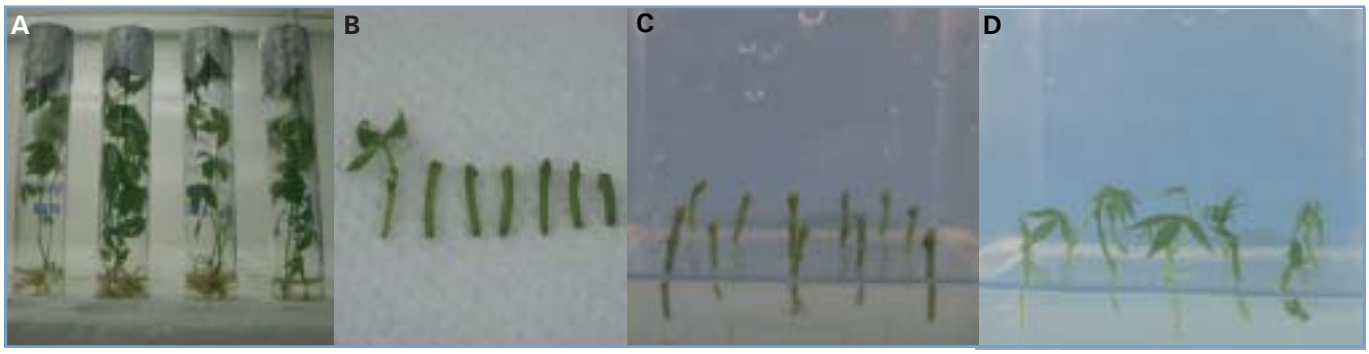
Tão logo a planta alcance um tamanho que permita ser seccionada em várias microestacas, procede-se sua micropropagação (Fig. 9A). Para tal, o primeiro aspecto a se verificar é a aspecto da planta, que deve apresentar um elevado vigor vegetativo, coloração

verde e ausência de problemas como vitrificação e tecidos necrosados. Paralelamente, deve-se avaliar a presença de contaminações bacterianas e fúngicas, observando-se a cultura contra a luz da câmara de fluxo laminar.

Após essa avaliação, deve-se abrir o tubo de ensaio e extrair a planta para fora com o auxílio de uma pinça de tamanho médio, até que sua parte basal (sistema radicular e meio de cultura) fique cerca de 1,0 cm da boca do tubo. Eliminar todas as folhas, exceto a primordial, com uma tesoura, e cortar a haste da planta próximo à boca do tubo, deixando-a cair sobre papel de filtro esterilizado. Um sistema alternativo é retirar a planta do tubo de ensaio, depositá-la sobre o papel de filtro e eliminar as folhas com uma lâmina de bisturi nº 10. De uma forma ou de outra, o passo seguinte consiste em, utilizando pinça e bisturi, seccionar a planta a partir da região apical em segmentos de 1,0-1,5 cm, contendo 1-3 gemas (Fig. 9B), de maneira que o corte superior de cada microestaca seja feito 1-2 mm acima da gema mais alta. Pegar a microestaca pela parte superior com uma pinça de tamanho grande (25 cm) e inserir aproximadamente $^1/_3$ dela no meio de cultura. A pinça com este tamanho facilita introduzir a microestaca no meio de cultura de multiplicação/enraizamento.

Como uma planta de mandioca cultivada in vitro é muito tenra, esta operação deve ser realizada o mais rápido possível, para evitar que a exposição ao fluxo contínuo de ar da câmara, provoque a desidratação dos tecidos. Além da agilidade no manuseio do material, outra medida interessante para evitar a desidratação é não trabalhar com um grande número de explantes por vez.

Um terceiro aspecto a ser considerado está relacionado com o tipo do explante, haja vista que esta característica, juntamente com seu tamanho e a composição do meio de cultura, irão refletir na taxa de multiplicação. Preferentemente, as microestacas que contêm gemas laterais (Fig. 9C) devem ser colocadas em meio de estabelecimento, enquanto aquelas que possuem a gema apical (Fig. 9D) podem ser cultivadas também nesse mesmo meio ou no meio de multiplicação/enraizamento. As microestacas cultivadas no meio de estabelecimento deverão ser transferidas para o meio de multiplicação/enraizamento após 15 dias. No entanto, caso se necessite de material em um espaço de tempo mais curto, cultivar todas as microestacas no meio de multiplicação/enraizamento, o que poderá acarretar algumas perdas e influenciar na homogeneidade das plantas.




Fotos: Antonio da Silva Souza

**Fig. 9.** Plantas de mandioca em estádio adequado para serem micropropagadas (A), microestacas com tamanho de 1,0-1,5 cm (B), microestacas nodais em meio de cultura de estabelecimento (C) e microestacas apicais cultivadas no meio de multiplicação/enraizamento (D).

Finalmente, o último ponto a ser verificado é a freqüência das subculturas, que devem ser feitas quando as plantas estiverem em crescimento ativo, evitando-se multiplicar aquelas que já estão mostrando algum sinal de senescência nas partes aéreas. Assim, ao atingir a tampa do tubo de ensaio, cada planta normalmente apresenta o máximo de vigor e deve ser novamente seccionada, repetindo-se um novo ciclo de micropropagação a cada 75-90 dias, a depender do genótipo.

## Meio de Cultura

Normalmente, para a grande maioria das espécies vegetais, o meio de cultura empregado na fase de multiplicação tem a mesma composição básica (sais minerais e vitaminas) utilizada na etapa

anterior, a de estabelecimento. Para a mandioca tal regra também se aplica e a variação que existe entre os dois meios diz respeito às concentrações de ANA, BAP e $AG_3$ (Tabela 1), permanecendo iguais as doses dos demais componentes (sais minerais, tiamina-HCl, inositol e sacarose). O meio de multiplicação/enraizamento também é solidificado com ágar ou Phytagel®, sendo que a concentração do segundo gelificante deve ser aumentada para 2 g/L. O pH também é ajustado em 5,7-5,8 e o meio autoclavado a uma temperatura de 121ºC e pressão de 1,05 kg/cm², durante 20 minutos.

Podem ser empregados tubos de ensaio de tamanho grande, de Ø = 18, 20 ou 25 x A = 150 mm, contendo, respectivamente, 5, 7 ou 10 mL de meio de cultura. Para fins de economia, ao utilizar tubos de 25 x 150 mm, pode-se distribuir até três microestacas por recipiente (Fig. 10A). No entanto, em outros tipos de recipientes as plantas de mandioca se desenvolvem bem, a exemplo de frascos de vidro redondos (Ø = 6,5 cm x A = 10,0 cm) (Fig. 10B) e caixas de plástico quadradas (A = 8,0 cm x L = 7,5 cm) (Fig. 10C), com 40 e 70 mL de meio, onde são cultivados, respectivamente, até 5 e 9 explantes.

Fotos: Antonio da Silva Souza

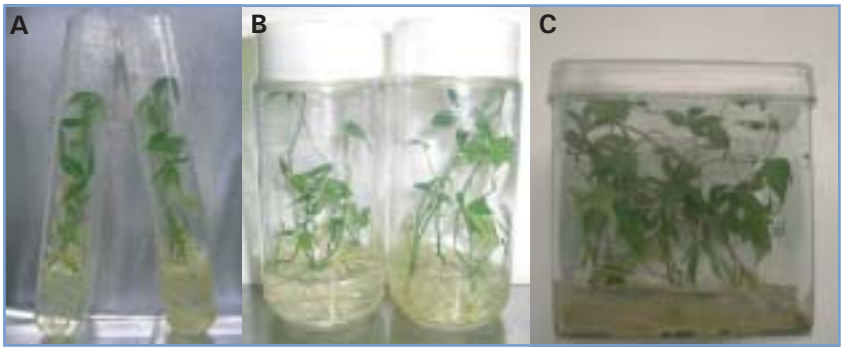



**Fig. 10.** Plantas de mandioca micropropagadas em tubos de ensaio (A), frascos redondos (B) e caixas de plástico (C).

Ao contrário do que acontece com muitas outras espécies, quando se faz necessário um meio de cultura para o alongamento e outro para o enraizamento dos novos brotos, as variedades de mandioca alongam e enraízam muito bem no mesmo meio de multiplicação, o que se constitui em uma considerável economia.

## Condições Ambientais

A taxa de crescimento in vitro pode ser controlada mediante ajustes em aspectos inerentes ao material vegetal (genótipo, tipo de explante) e ao meio de cultura (nutrientes orgânicos e inorgânicos, reguladores de crescimento, concentração osmótica, o estado físico e seu pH), conforme comentado anteriormente, bem como aos fatores relacionados com as condições físicas do ambiente de cultivo, ou seja, temperatura, umidade, luminosidade e fotoperíodo. Entre esses fatores, a temperatura e a luminosidade se destacam como os de maior influência sobre as respostas morfogenéticas in vitro.

Em geral, grande parte das plantas é cultivada in vitro sob temperatura entre 25 e 30°C. No caso da mandioca, ela vem sendo cultivada em uma temperatura contínua de 27 ± 1°C, mantida com termostato (Fig. 11A), haja vista que, por se tratar de uma espécie tropical, tem o ciclo de vida desenvolvido em um clima relativamente uniforme.

Por sua vez, a luz exerce um grande efeito morfogenético no desenvolvimento da planta in vitro, desempenhando um papel importantíssimo nos processos da fotossíntese, fotomorfogênese e fototropismo. Ela promove o crescimento e desenvolvimento das plantas mediante três fatores: qualidade (comprimento de onda), quantidade (intensidade luminosa ou fluxo de fótons) e duração (fotoperíodo). No Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, a mandioca é cultivada in vitro sob densidade de fluxo de fótons de 22 $\mu E/m^2/s$, proporcionada por lâmpadas fluorescentes brancas (Fig. 11B) em ciclo de fotoperíodo/escuro de 16/8 horas controlado por um timer (Fig. 11C).

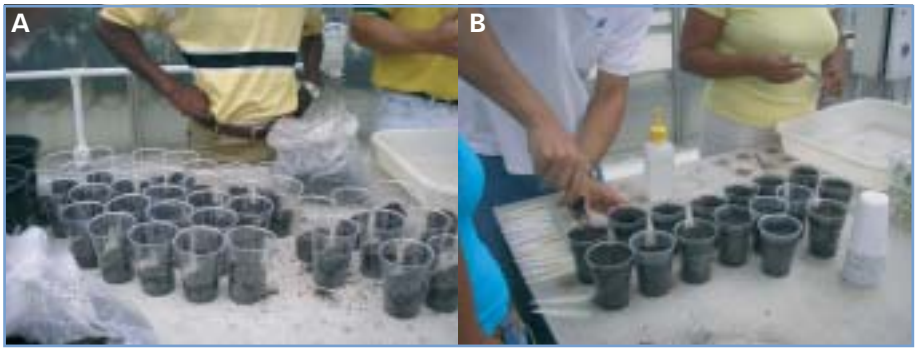
Fotos: Antonio da Silva Souza

**Fig. 11.** Termostato, dispositivo automático destinado a manter constante a temperatura da sala de crescimento (A), iluminada com lâmpadas fluorescentes brancas (B) sob um fotoperíodo de 16 horas mantido por um timer (C).

## Aclimatização

Na Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, desde o início da década de 90 vem sendo empregado um sistema simples, barato e eficiente para a aclimatização de plantas de mandioca micropropagadas (Souza et al., 1994).

Este procedimento consiste inicialmente em distribuir o substrato em copos descartáveis de plástico transparente de 300 mL de volume (Fig. 12A), em casa de vegetação ou estufa, para facilitar a visualização da formação das primeiras raízes. O copo deve ser perfurado na base para permitir a drenagem do excesso de água e o substrato ter propriedades físico-químicas adequadas, já que é decisivo para o êxito da aclimatização Um substrato que vem dando ótimo resultado é o Plantmax®, cujas uniformidade e estabilidade na composição físico-química permitem um bom desenvolvimento do sistema radicular e da parte aérea das plantas. Esse substrato deve ser perfurado, com o fundo de um tubo de ensaio de 25 mm de diâmetro (Fig. 12B), por exemplo, para facilitar a introdução das raízes das plantas no momento do plantio.




Fotos: Antonio da Silva Souza

**Fig. 12.** Copos descartáveis contendo substrato (A), que é perfurado no centro para facilitar a transferência das plantas micropropagadas de mandioca (B).

A planta a ser aclimatizada, ao alcançar um tamanho de 8 a 10 cm (Fig. 13A), deve ser retirada do tubo de ensaio, com muito cuidado para não danificar o sistema radicular que é então lavado para eliminar o meio de cultura, utilizando uma pisseta com água destilada (Fig. 13B). Em seguida, a planta é introduzida no substrato (Fig. 13C), que é levemente pressionado, complementado e bem molhado (Fig. 13D). A variedade é identificada com uma etiqueta (Fig. 13E) e a planta coberta com um copo descartável de plástico branco de 200 mL de volume, o qual encaixa perfeitamente no copo transparente, pressionando-o bem ao substrato para haver uma boa vedação entre os copos e a manutenção da umidade alta (Fig. 13F). O substrato ficará umedecido o bastante para superar o período de aclimatização, sem a necessidade de se ministrar mais água.

Fotos: Antonio da Silva Souza

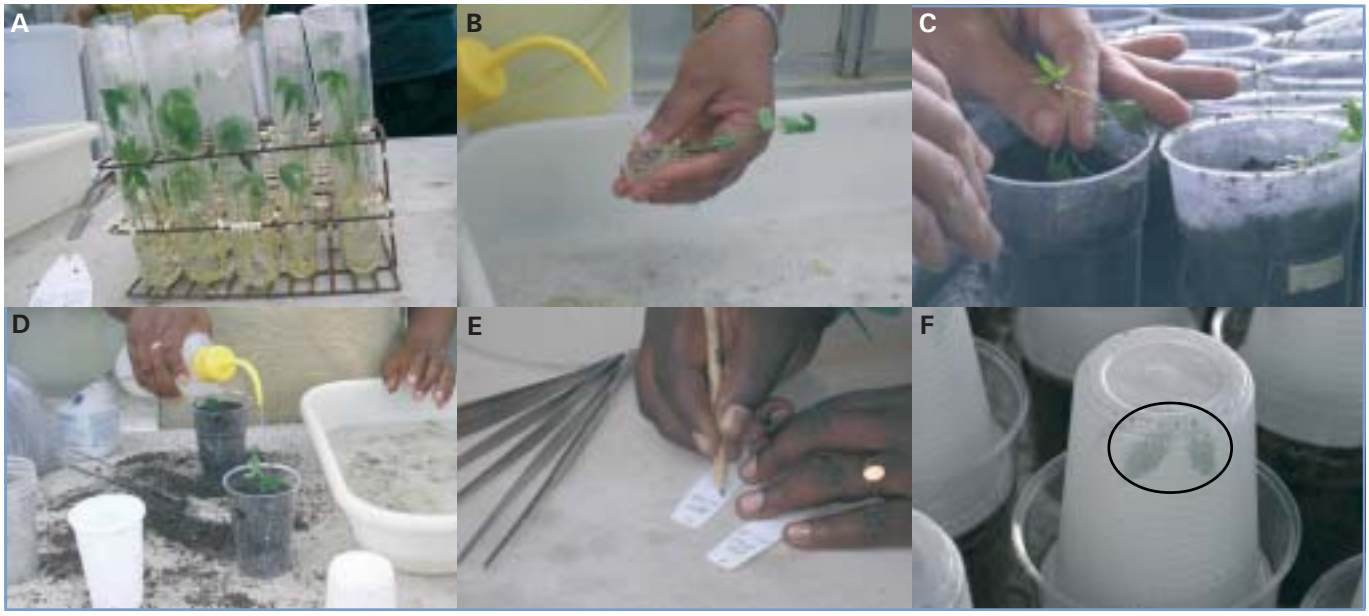



**Fig. 13.** Plantas de mandioca apropriadas para aclimatização (A), que após a eliminação do meio de cultura do sistema radicular (B), são plantadas no substrato (C), que é bem umedecido com água destilada (D), os genótipos identificados (E) e cobertos com copo descartável branco para manter a umidade alta no seu interior (ver no detalhe) (F).

Após 20 dias, comprova-se a formação de raízes na lateral do copo transparente (Fig. 14A) e elimina-se o copo de cobertura, pois já ocorreu o desenvolvimento de novas folhas (Fig. 14B) e assim um melhor controle da transpiração. Efetuar, então, uma adubação com 1 g/copo da mistura composta por uréia (0,14 g): superfosfato triplo (0,74 g): sulfato de potássio (0,12 g) e transferir as plantas, que já apresentam um bom desenvolvimento e endurecimento para um telado ou até mesmo para baixo da copa de uma árvore. Passados mais 15 dias, as plantas já estão em condições de serem transportadas (Fig. 14C) e plantadas no campo, apresentando desenvolvimento e vigor que permitam superar danos provocados pela falta ou altas intensidades e freqüências de chuvas.

Fotos: Antonio da Silva Souza

**Fig. 14.** Formação de raízes (A) e folhas (B) em plantas micropropagadas de mandioca em aclimatização e embaladas para serem transportadas para campo (C).

## Avaliação das Culturas

Em todas as etapas do processo de micropropagação, inclusive aquelas realizadas fora do laboratório, deve-se monitorar rigorosamente o comportamento, o desenvolvimento e o aspecto fitossanitário dos materiais.

Inicialmente, acompanhar a reação das manivas plantadas em casa de vegetação, seu poder germinativo e o potencial para se constituir em uma fonte segura de brotações (Fig. 15A).

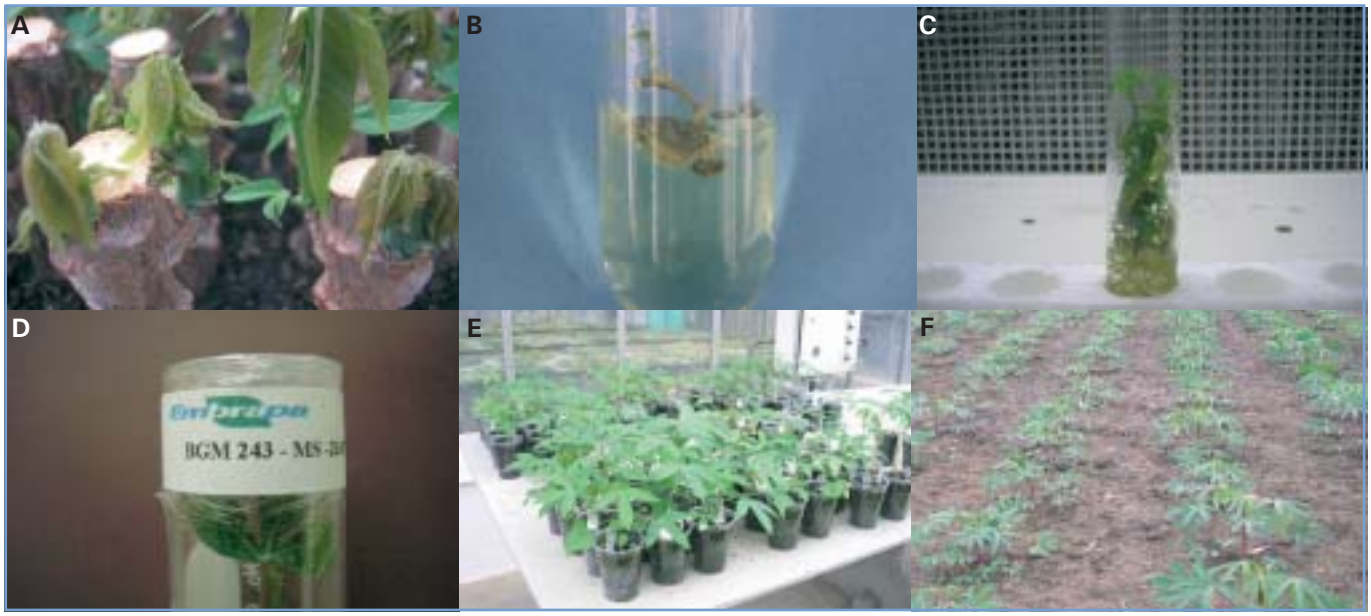
Nas fases in vitro é fundamental controlar o surgimento de contaminações, o desenvolvimento dos explantes de partida, o crescimento e o enraizamento

das plantas, e o estado do tubo de ensaio. Bactérias e fungos (Fig. 15B) são os contaminantes mais comuns e podem ser facilmente detectados nos cultivos in vitro, especialmente se o agente gelificante for alguma goma tipo 'gelan', a exemplo do Phytagel®, que deixa o meio nutritivo bem mais transparente que o ágar. Uma vez comprovado que a cultura está contaminada, o material deve ser imediatamente eliminado, sendo autoclavado durante uma hora sob temperatura de 121°C (1,05 kg/cm$^2$). No entanto, CIAT (1984) recomenda que no caso do surgimento de contaminações em cultivos de materiais valiosos e/ou escassos, deve-se excisar o ápice o mais distante possível da área contaminada, sob condições de rigorosa assepsia. Para fazer a excisão, se extrai parcialmente a planta do tubo, de tal forma que saia apenas a extremidade superior do tecido, supostamente limpo. Corta-se o ápice com a ajuda de uma tesoura, depositando-o sobre papel esterilizado. Imediatamente, com a ajuda de um bisturi, corta-se 1 mm da base para eliminar o tecido danificado e se inocula o ápice em um meio novo.

Quanto ao desenvolvimento da planta in vitro, atentar para as estruturas do sistema radicular e do caule, que devem apresentar um crescimento normal, não atrofiado. As folhas devem possuir uma coloração verde intensa (Fig. 15C), sem manchas cloróticas.

O estado e a tampa do tubo de ensaio não devem apresentar nenhuma ruptura, e sua identificação (Fig. 15D), sempre visível, são também aspectos a serem controlados para que se possa ter maior sucesso nos cultivos.

Já na fase de aclimatização, é interessante que as plantas apresentem o máximo de uniformidade quanto à formação do sistema radicular, vigor da parte aérea e altura das plantas (Fig. 15E). Cuidados fitossanitários devem ser tomados, especialmente em relação à infestação de ácaros. Considerando-se todos esses aspectos, se obterá uma maior homogeneidade no desenvolvimento das plantas, que crescerão de forma mais vigorosa e, conseqüentemente, terão um maior índice de sobrevivência quando transferidas para campo (Fig. 15F), mesmo sob condições climáticas adversas.




Fotos: Antonio da Silva Souza

**Fig. 15.** Brotações de mandioca em manivas plantadas em casa de vegetação (A), planta contaminada por fungo (B), em crescimento ativo (C), em tubos sem nenhuma ruptura e devidamente identificado (D), em aclimatização (E) e no campo (F).

## Conclusões

A micropropagação da mandioca é, portanto, um processo eficiente para a produção de mudas de excelente padrão fitossanitário, em curto espaço de tempo e com a demanda de pouca mão-de-obra. Apesar da grande variabilidade genética da mandioca, a técnica da micropropagação pode ser aplicada com êxito a quase todas as suas variedades, culminando com a regeneração de plantas completas.

A micropropagação da mandioca já vem sendo realizada na Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical há mais de 25 anos e durante todo esse tempo tem sido aplicada não apenas na multiplicação de variedades para atender diversas finalidades, como também na produção de material para a conservação in vitro de germoplasma e o intercâmbio de recursos genéticos com diversas instituições nacionais e internacionais de pesquisa e ensino envolvidas com esta cultura.

## Referências Bibliográficas

CIAT. **El cultivo de meristemas para la conservación de germoplasma de yuca *in vitro***; unidad audiotutorial. Cali, 1984. 44 p. (CIAT. Guia de Estudio. Serie 045C-05.03).

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

ROCA, W. M.; NOLT, B; MAFLA, G.; ROA, J.; REYES, R. Eliminación de virus y propagación de clones en la yuca (*Manihot esculenta* Crantz). In: ROCA, W. M.; MROGINSKI, L. A. (Ed.). **Cultivo de tejidos en la agricultura**: Fundamentos y aplicaciones. Cali: CIAT, 1991. p. 403-420.

SOUZA, A. da S.; PAZ, O. P. da.; MONTARROYOS, A. V. V. **Protocolo do cultivo *in vitro* de ápices caulinares de mandioca**. Cruz das Almas; BA: Embrapa-CNPMF, 1994. 2 p. (Embrapa-CNPMF. Biotecnologia em Foco, 4).

**Circular Técnica, 88**

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
**Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical**
**Endereço**: Rua Embrapa, s/n, Caixa Postal 07, 44380-000, Cruz das Almas - Bahia
**Fone**: (75) 3312-8000
**Fax**: (75) 3312-8097
**E-mail**: sac@cnpmf.embrapa.br

**1ª edição**
1ª impressão (2008): 500 exemplares

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

BRASIL UM PAÍS DE TODOS GOVERNO FEDERAL

**Comitê de publicações**

**Presidente**: *Aldo Vilar Trindade.*
**Secretária**: *Cristina Maria Barbosa C. Bezerra Lima.*
**Membros**: *Alberto Duarte Vilarinhos, Antonio Alberto Rocha Oliveira, Davi Theodoro Junghans, Luiz Francisco da Silva Souza, Marilene Fancelli, Maurício Antonio Coelho Filho, Rogério Ritzinger, Vanderlei da Silva Santos.*

**Expediente**

**Supervisão editorial**: *Aldo Vilar Trindade.*
**Revisão de texto**: *Aldo Vilar Trindade.*
**Tratamento das ilustrações**: *Maria da Conceição Borba.*
**Editoração eletrônica**: *Maria da Conceição Borba.*