

Preservação de Germoplasma Vegetal, com Ênfase na Conservação in Vitro de Variedades de Mandioca

Introdução

O melhoramento genético de plantas tem contribuído sobremaneira para o aumento da produção em diversas espécies de grande importância econômica e/ou social, beneficiando bilhões de pessoas, especialmente de menor poder aquisitivo, que vivem em países em desenvolvimento distribuídos por todo o mundo. Esses aumentos na produção resultam da obtenção de novos genótipos, que apresentam rendimentos mais elevados, adaptados a diversas condições ecológicas, muitas das vezes adversas, e resistentes a pragas e doenças. No entanto, para a geração desses materiais melhorados, torna-se necessário que características de interesse sejam incorporadas às novas cultivares, dentro de programas de melhoramento genético bem definidos, de forma que possam ser, ao final de todo o processo, exploradas comercialmente.

A base do melhoramento genético de qualquer espécie está na sua diversidade genética, o que reflete em respostas a melhores práticas agrônômicas e resistência/tolerância a diversos fatores bióticos e abióticos. A diversidade contida em um germoplasma deve ser protegida contra eventuais perdas e assim garantir sua utilização para o aumento da produtividade. Os recursos genéticos vegetais são um reservatório natural de genes com potencial de uso para a produção sustentável de gêneros essenciais à humanidade, tais como alimentos, fibras e medicamentos. Infelizmente, essa biodiversidade vem sendo destruída de uma forma muito rápida, haja vista a exploração descontrolada dos recursos naturais dentro dos diferentes ecossistemas (Santos, 2001). O mais interessante é que aspectos como a própria geração e utilização de novas cultivares ou híbridos com características melhoradas, bem como a adoção de tecnologias avançadas e modernas práticas agrícolas, acabam contribuindo para uma forte erosão e perda de recursos genéticos que atinge as espécies em geral. Para Mafla et al. (1993), a diversidade genética torna-se cada vez mais importante devido à intensidade de monoculturas contínuas visando aumentar a produção em todas as principais regiões produtoras do mundo.

A preocupação com a prevenção da erosão genética despertou o interesse pela conservação do germoplasma vegetal há mais de 30 anos, de modo a protegê-lo de eventuais perdas e garantir sua utilização sempre que necessário. Os recursos genéticos de plantas podem ser conservados na forma de sementes, pólen, órgãos vegetativos e plantios no campo. É essencial que o método de conservação garanta a máxima viabilidade e estabilidade genética dos acessos, e também que os materiais possam ser conservados isentos de patógenos, em um local controlado e acessível, de forma a facilitar sua multiplicação e uso (CIAT, 1984).

A variabilidade genética das espécies, a exemplo da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), vem diminuindo gradativamente e o potencial risco de erosão genética, tanto

Cruz das Almas, BA
Janeiro, 2009

Autores

Antônio da Silva Souza¹
Eng. Agrônomo, D.Sc.,
assouza@cnpmf.embrapa.br.

Fernanda Vidigal Duarte Souza¹
Bióloga, D.Sc.,
fernanda@cnpmf.embrapa.br.

Janay Almeida dos Santos-Serejo¹
Eng. Agrônoma, D.Sc.,
janay@cnpmf.embrapa.br.

Tatiana Góes Junghans¹
Eng. Agrônoma, D.Sc.,
tatiana@cnpmf.embrapa.br.

Oswaldo Pereira da Paz²
Eng. Agrônomo, M.Sc.,
osvaldo@cnpmf.embrapa.br.

Angélica Virgínia Valois Montarroyos³
Eng. Agrônoma, D.Sc.,
angelica@ipa.br.

Vanderlei da Silva Santos¹
Eng. Agrônomo, D.Sc.,
vssantos@cnpmf.embrapa.br.

Lucymeire Souza Morais⁴
Eng. Agrônoma, M.Sc.,
lsmorais@yahoo.com.br.

¹Pesquisador, Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical.

²Assistente de Pesquisa, Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical.

³Bolsista da FACEPE/IPA.

⁴Doutoranda em Biotecnologia da UEFS.

do germoplasma de material cultivado como de silvestre, pode ser atribuído a fatores como desmatamentos incontrolados, incorporação de terras para a agricultura em áreas de diversidade genética e avanço crescente das cidades e áreas industriais. Todos estes aspectos se agravam quando os bancos de germoplasma possuem um número muito elevado de variedades. Para se ter uma idéia dos riscos que uma coleção mantida sob condições de campo pode ter, entre 1980 e 1990 quase 60% dos acessos do banco de germoplasma de mandioca do NRCRI (National Root Crops Research Institute), em Umudike, Nigéria, se perderam devido ao ataque de pragas e doenças, ocorrência de incêndios e de condições adversas no clima (Mbanaso et al., 1993). Estes aspectos, associados à importância e necessidade da variabilidade genética para o melhoramento da cultura, justificam plenamente todos os esforços empreendidos para conservar o germoplasma de mandioca, uma euforbiácea que desempenha um importante papel alimentar e social em diversas regiões tropicais do mundo.

Adicionalmente, de modo geral, as espécies silvestres contêm um grande número de características que podem ser incorporadas às espécies cultivadas por meio do melhoramento genético tradicional ou de

técnicas de engenharia genética. Devido ao potencial que possuem como fontes de características úteis para o melhoramento da mandioca, as espécies silvestres de *Manihot* estão recebendo uma crescente atenção por parte das instituições de pesquisa, daí, inclusive, a importância delas serem incorporadas a uma coleção in vitro (Cabral et al., 2000). Um total de 397 genótipos de 29 espécies silvestres de *Manihot* está sendo mantido in vitro no CIAT (Mafla et al., 1993), com o objetivo principal de serem conservadas, intercambiadas e distribuídas entre instituições. No Brasil existem 56% das 97 espécies silvestres de *Manihot* já descritas para a América Latina. As espécies silvestres de mandioca têm grande potencial como fonte de resistência a doenças e pragas, e tolerância a fatores abióticos, além de abrirem possibilidades para a re-estruturação da arquitetura da espécie cultivada, tornando-a mais adequada à agricultura atual.

Nesta Circular pretende-se dar uma visão global dos procedimentos de conservação de germoplasma vegetal que estão sendo estudados e/ou aplicados no sentido de evitar perdas de recursos genéticos (Fig. 1), enfatizando o sistema de preservação in vitro do germoplasma de mandioca empregado na **Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical**.

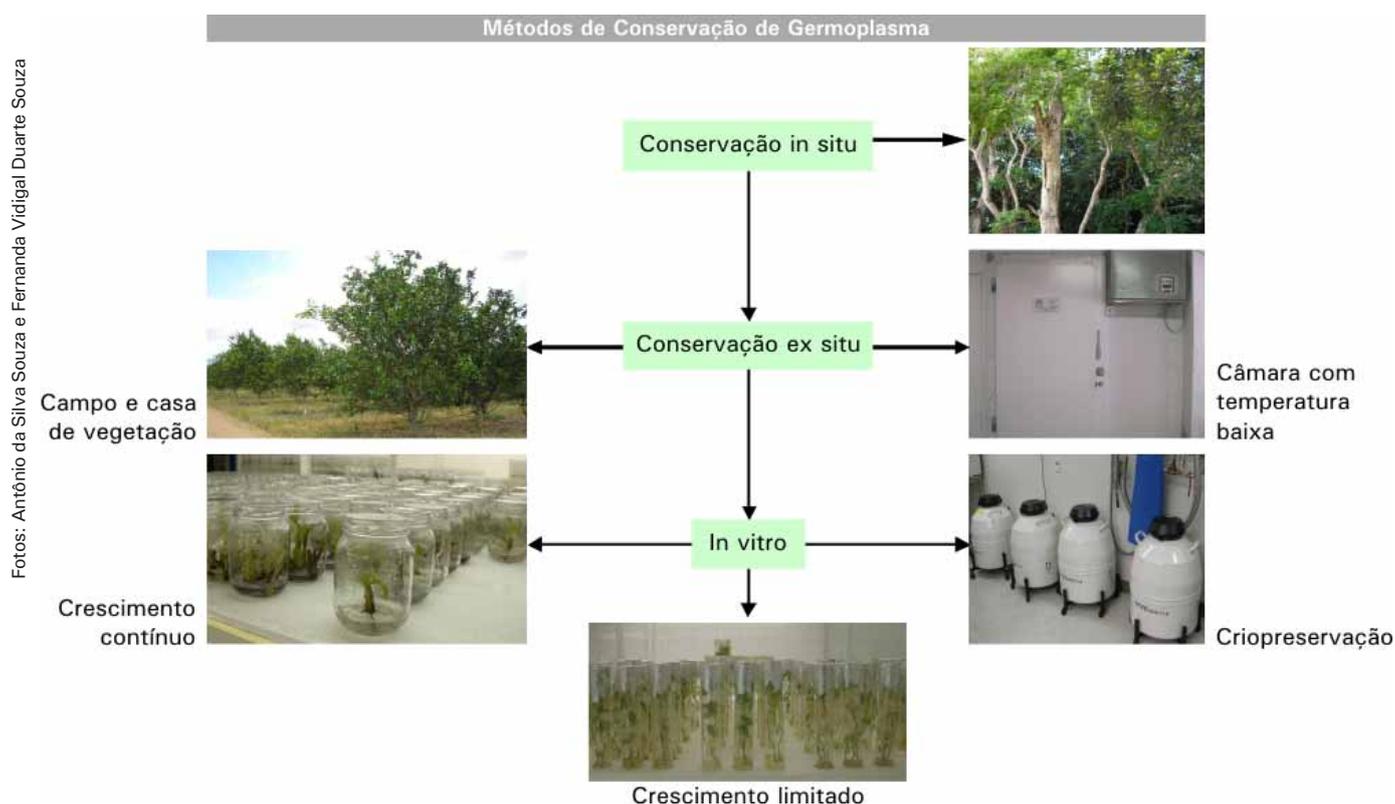


Fig. 1. Esquema geral dos métodos de preservação do germoplasma vegetal.

Métodos de conservação de germoplasma

A agricultura moderna utiliza variedades selecionadas para alto rendimento e qualidade do produto dentro de cada espécie, com um pequeno número de variedades plantadas em áreas extensas, o que tem levado ao abandono das cultivares tradicionais (Navarro et al., 2005). Além disso, os desmatamentos incontrolados, a expansão agrícola e o avanço crescente das cidades e áreas industriais estão provocando a perda de muitas espécies silvestres relacionadas com as cultivadas. Esta situação favorece uma forte erosão e perda de recursos fitogenéticos, que são o fruto de milhares de anos de evolução e que contêm os genes ou combinações de genes envolvidos com resistência a pragas e doenças, tolerância a condições ambientais adversas (salinidade, seca, temperaturas extremas etc.), produção e qualidade de alimentos, entre outros caracteres.

As duas estratégias básicas de preservação de germoplasma, propostas como medidas de prevenção do processo de erosão genética, são a conservação in situ e a conservação ex situ. Segundo Mroginski et al. (1991), os métodos alternativos empregados para a conservação do germoplasma de plantas superiores são ajustados de acordo com o sistema de propagação de cada espécie. Por exemplo, para fruteiras, como o abacaxizeiro [*Ananas comosus* (L.) Merrill] e a bananeira (*Musa* spp.), e espécies tropicais produtoras de raízes e tubérculos, como a mandioca, que normalmente são propagadas de forma vegetativa, os sistemas de preservação mais recomendados são os bancos genéticos mantidos ex situ, no campo e/ou em laboratório (in vitro).

Conservação in situ de germoplasma

Conforme definições adotadas internacionalmente (Eira, 2001), a conservação in situ abrange: a) a preservação continuada de uma população na comunidade à qual pertence e dentro do ambiente onde está adaptada; b) a manutenção e recuperação de populações viáveis de espécies em seus ecossistemas e habitats naturais de ocorrência; e c) no caso de espécies domesticadas ou cultivadas, a preservação naqueles locais onde tenham desenvolvido suas propriedades características. Para Medeiros (2003), como os métodos alternativos de conservação de germoplasma são dispendiosos e de eficácia relativa, a única forma segura de salvar espécies

vegetais, principalmente aquelas ameaçadas de extinção, é preservar os ecossistemas naturais em que elas vivem.

Conservação ex situ de germoplasma

A conservação ex situ do germoplasma implica na manutenção das espécies em locais diferentes daqueles aos quais estão adaptadas, ou seja, fora de seus habitats naturais (Eira, 2001). Há mais de 20 anos atrás, Reynolds (1987) estimou que mais de 1.200 instituições em todo o mundo mantinham algum tipo de coleção ex situ. Essas coleções são chamadas de ativas e as instituições que as mantêm são responsáveis por: a) garantir sua diversidade (seja pela iniciativa de coletar periodicamente recursos genéticos, seja por favorecer o intercâmbio com outros bancos de germoplasma); b) multiplicá-las; c) distribuí-las aos usuários; e d) promover sua caracterização por diferentes metodologias (Vieira, 2000).

Nesse caso, a depender do material (sementes, embriões, outras estruturas vegetais, indivíduos completos etc.), a manutenção é realizada em condições distintas, tais como: a) campo e casa de vegetação; b) câmara com temperatura e umidade relativa baixas; c) in vitro, em meio de cultura com baixa concentração salina; e d) sob criopreservação.

Conservação a campo e casa de vegetação

Para várias espécies vegetais, entre elas muitas frutíferas, florestais e palmáceas, não se dispõe de sistemas eficientes de conservação de germoplasma, além da preservação das plantas no campo, in vivo. No entanto, a manutenção de bancos de germoplasma em condições de campo tem como desvantagem a sua vulnerabilidade a uma série de fatores, tais como a erosão genética devido à não adaptação das espécies e variedades às novas condições ambientais, à contínua exposição ao ataque de pragas, doenças e predadores eventuais, intempéries climáticas, problemas edáficos e vandalismo, podendo os acessos serem perdidos ainda por falhas na identificação devidas a erro humano ou por problemas de cunho técnico-administrativo (Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária, 1991; Mroginski et al., 1991, Brison et al., 1995; Eira, 2001). Aliado a tudo isso, o tradicional método de conservação de germoplasma no campo requer um elevado custo financeiro operacional, notadamente em relação à grande quantidade de mão-de-obra empregada no plantio inicial e subsequentes

replantios, bem como nas capinas, fertilização e tratamentos contra pragas e doenças. Esses problemas podem ser intensificados a depender da espécie, quando um maior espaço físico pode ser necessário, demandando um enorme trabalho, a exemplo do que acontece com plantas lenhosas (Matsumoto et al., 2001). Todos estes aspectos, portanto, justificam que o desenvolvimento de técnicas alternativas de conservação dos recursos genéticos, de preferência a longo prazo, torne-se uma importante prioridade.

Segundo Vieira (2000), são mantidas vegetativamente a campo ou casa de vegetação as coleções de plantas com elevada heterozigiosidade, períodos juvenis muito longos, baixa produção de sementes, sementes que apresentam viabilidade reduzida e sementes cuja viabilidade ocorre por pouco tempo. Entre essas espécies encontram-se a batata (*Solanum tuberosum* L.), a batata-doce (*Ipomea batatas* L. Lam) e a mandioca, que se multiplicam exclusivamente por propagação vegetativa, e a banana que, além disso, não produz sementes viáveis. Tais espécies são geralmente conservadas em coleções no campo ou em casa de vegetação, uma metodologia que apesar de eficiente, assegura a manutenção do germoplasma apenas por um período de tempo considerado de curto a médio prazo (Santos, 2001).

No caso específico da mandioca, a manutenção convencional dos bancos de germoplasma é feita mediante o cultivo contínuo no campo. Cada renovação de um banco de germoplasma de mandioca se realiza freqüentemente com manivas oriundas do cultivo anterior, as quais devem ser logo plantadas para evitar que germinem e surjam brotações prematuras, assim como o ataque de insetos e/ou patógenos. É interessante salientar que os sistemas de propagação vegetativa da mandioca via estacas acabam favorecendo a transmissão de pragas e doenças através de gerações sucessivas.

Conservação em câmara com temperatura e umidade relativa baixas

Este é o sistema de conservação de germoplasma mais empregado para os indivíduos que se propagam sexuadamente, pois é por meio da semente que a maioria das espécies de plantas superiores se multiplica. O armazenamento visa proteger a semente da deterioração e de danos, minimizar a perda do poder germinativo e do vigor, bem como manter a identidade da semente, sua condição física e pureza.

Com isso, os denominados bancos de sementes previnem e evitam a perda de valiosos recursos genéticos, conservando, devidamente caracterizadas e avaliadas, as coleções de germoplasma, que podem, então, ser exploradas em programas de melhoramento. Diante disso, as sementes se constituem na forma mais comum de conservação ex situ, desde que não ocorra uma alta taxa de perda da viabilidade após um longo período de armazenamento sob baixa temperatura e baixo nível de umidade (Eira, 2001).

A metodologia convencional de conservação de sementes empregada em bancos de germoplasma compreende a desidratação, para teores de umidade extremamente baixos (até cerca de 5% do teor inicial), e o armazenamento em câmaras com temperatura abaixo de zero (-18 a -20°C). As sementes de muitas espécies vegetais mantêm alta taxa de viabilidade após o armazenamento nessas condições por um longo período de tempo, e são classificadas como ortodoxas, de acordo com a proposta formulada por Roberts em 1973 (Santos, 2001). Como exemplos de espécies que possuem sementes ortodoxas podem ser considerados a graviola (*Annona muricata* L.), o murici [*Byrsonima crassifolia* (L.) Rich], a aroeira-verdadeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All.), o biribá [*Rollinia mucosa* (Jacq.) Baill.], o araçá pêra (*Psidium acutangulum* DC), o araticum (*Rollinia rugulosa* Schl.) e o taperebá (*Spondias mombin* L.).

No entanto, sementes sensíveis à desidratação e ao congelamento, denominadas recalcitrantes, comuns em certas espécies aquáticas, em plantas que produzem sementes grandes, em numerosas espécies arbóreas e arbustivas, economicamente importantes e nativas de regiões tropicais e subtropicais, bem como em algumas arbóreas originadas de áreas temperadas, sofrem danos e perdem o poder germinativo quando armazenadas nas condições mencionadas anteriormente. São exemplos de plantas que possuem sementes recalcitrantes o dendê [*Elaeis oleifera* (Kunth.) Cortes], o coco (*Cocos nucifera* L.), a seringueira (*Hevea brasiliensis* M. Arg.), o cacau (*Theobroma cacao* L.), a mangueira (*Mangifera indica* L.), a araucária [*Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze], o açai (*Euterpe oleracea* Mart.), o bacuri (*Platonia insignis* Mart.) e a pupunha (*Bactris gasipaes* Kunth), as quais, sob temperatura e umidade relativa baixas, mantêm uma viabilidade que varia entre poucas semanas e alguns meses, o que, considerando-se o enfoque conservação de germoplasma, pode ser considerado um período de tempo muito curto.

Existem ainda outras espécies de plantas, a exemplo do café (*Coffea* spp.), mamão (*Carica papaya* L.), jenipapo (*Genipa americana* L.) e citros (*Citrus* spp.), cujas sementes podem tolerar uma desidratação até níveis relativamente baixos do teor de umidade, porém sofrem danos quando expostas por tempo prolongado a temperaturas próximas e abaixo de zero após desidratadas para teores de umidade inferiores a 7%. Sementes que apresentam este comportamento foram classificadas como intermediárias por Ellis e colaboradores em 1990, conforme Eira (2001).

Com os problemas que apresentam em relação à desidratação e ao congelamento, torna-se necessário, portanto, o desenvolvimento de sistemas alternativos de conservação para as espécies que produzem sementes recalcitrantes e intermediárias.

Conservação in vitro

Conforme visto anteriormente, algumas espécies de plantas necessitam de procedimentos de conservação alternativos. Este é o caso de espécies que apresentam sementes não-ortodoxas, se multiplicam exclusivamente por propagação vegetativa, já que não produzem sementes viáveis ou apresentam intensa heterozigosidade ou elevada segregação, resultando em expressão de caracteres indesejáveis na população, e também de espécies arbóreas de grande porte que demoram muitos anos para passar do estágio juvenil à fase adulta reprodutiva. Para situações como essas, o mais indicado é não utilizar a semente para a conservação do germoplasma, substituindo-a por outros propágulos. Por exemplo, uma das alternativas para a conservação do germoplasma de espécies com sementes recalcitrantes seria a criopreservação de embriões (Withers & Williams, 1998).

Diante da possibilidade de se obter plantas completas a partir do cultivo de células, tecidos ou órgãos, é que se atentou para as possibilidades que as técnicas in vitro poderiam ter na conservação dos recursos fitogenéticos, constituindo-se em alternativas valiosas para a manutenção de coleções de plantas que podem ser incorporadas em programas de melhoramento vegetal, especialmente de espécies tropicais. A conservação in vitro se baseia no cultivo de coleções em laboratório, devendo ser considerada como parte de uma estratégia geral de preservação de plantas com sementes recalcitrantes, que apresentam baixa viabilidade ou número reduzido (Vieira, 2000), e que normalmente são propagadas vegetativamente. Para Giacometti & Goes (1986), no armazenamento de

germoplasma in vitro é indispensável que se obtenham culturas de uma ampla gama de genótipos em cada espécie, a fim de que se conserve a maior variabilidade genética possível, o que se complica quando se incluem espécies silvestres arbóreas.

O desenvolvimento de métodos de conservação in vitro para proteger espécies com riscos de extinção e paralelamente apoiar trabalhos com germoplasmas que apresentam problemas de preservação é um tema prioritário na área de recursos genéticos. A conservação in vitro envolve a manutenção de plantas em laboratório, mediante subculturas periódicas de segmentos apicais e nodais. Esta técnica tem sido aplicada com sucesso para a conservação de numerosas espécies de importância econômica relevante, tanto oriundas de regiões temperadas como dos trópicos, tais como morango (*Fragaria* spp.), banana, mandioca, batata e batata-doce. Entretanto, os sistemas in vitro não eliminam a importância de se manter clones sob condições in vivo. No caso de espécies silvestres de mandioca por exemplo, Goes et al. (2000) recomendam a duplicação da coleção in vitro em coleção dinâmica no campo, pois, desta forma, além de todas as vantagens da conservação dinâmica, cria-se a possibilidade de obtenção de sementes de alta qualidade. São, portanto, coleções que se complementam e ambas podem se constituir em bancos ativos, apesar de ser dispendioso mantê-las, principalmente em locais distintos (Vieira, 2000). Apenas ocasionalmente o armazenamento in vitro seria a única estratégia para conservar uma determinada espécie (Roca et al., 1991).

Existe uma grande diversidade potencial de tipos de tecidos de uma planta (explantes) que pode ser usada para o estabelecimento de um sistema de conservação in vitro. Em geral, o uso de métodos in vitro para a conservação de germoplasma inclui os seguintes passos: a) excisão do tecido ou órgão da planta-matriz; b) estabelecimento em meio nutritivo; c) conservação mediante um método apropriado; d) recuperação de tecido viável oriundo da conservação; e e) regeneração de plantas (CIAT, 1984).

Para CIAT (1984) e Villalobos & Engelmann (1995), qualquer sistema de cultura de tecidos empregado para a conservação in vitro deve atender duas exigências:

- 1) Garantia da estabilidade genética do material preservado - como um dos principais objetivos da conservação de germoplasma é manter a diversidade

genética das espécies em uma condição estável, nas técnicas de preservação usadas não se deve por em risco a estabilidade genética dos acessos. Isto normalmente é alcançado pela cultura de meristemas apicais, que são tecidos ideais para a conservação por causa da estabilidade genética e potencial morfogênico em comparação com outros tecidos e células isoladas.

2) Implementação de protocolos bem definidos - tais protocolos assegurariam uma alta porcentagem de recuperação de plantas a partir do material armazenado de uma ampla gama de germoplasmas. Quanto a este aspecto, deve-se considerar que os fatores determinantes para uma boa resposta na regeneração de plantas são as condições ambientais e o genótipo.

O processo de preservação in vitro apresenta diversas vantagens sobre o processo de conservação de germoplasma no campo, e dentre elas destacam-se: a) a necessidade de menor espaço para dispor o material; b) a manutenção de material vegetal livre de pragas e patógenos; c) a disponibilidade de material para ser imediatamente propagado; d) a redução dos custos de manutenção; e) a alta taxa de multiplicação, independentemente de condições climáticas; f) a redução da erosão genética; e g) a simplificação e eficiência do processo de intercâmbio de germoplasma (Eira, 2001; Fortes & Pereira, 2001). Villalobos & Engelmann (1995) consideram ainda como vantagem o fato de que em plantas com ciclos reprodutivos curtos, como algumas espécies que produzem raízes e tubérculos, e outras anuais, os intervalos de transferência in vitro são menos frequentes que o ciclo no campo. Além disso, para Casazza et al. (2002), a aplicação de técnicas de micropropagação na conservação de espécies em extinção tem provado ser útil para uma extensiva gama de espécies. A cultura de tecidos pode produzir uma grande quantidade de plantas a partir de um mínimo de material vegetal original, o que representa um baixo impacto na população nativa em extinção. Ademais, as plantas micropropagadas podem ser usadas para suplementar o estoque natural de populações de plantas silvestres.

Considerando-se os aspectos expostos anteriormente, verifica-se por outro lado que a conservação in vitro de germoplasma passa por riscos como também acontece com as coleções em campo. Portanto, além das contaminações, outros problemas acometem uma coleção in vitro e medidas como as que se seguem

devem ser adotadas para mantê-la de maneira eficiente:

- 1) Manusear cuidadosamente os acessos durante as subculturas para evitar que ocorram misturas de variedades devido a erros de identificação.
- 2) Monitorar frequentemente o crescimento das plantas in vitro para detectar a ocorrência de anormalidades, inclusive de genótipos variantes devido ao fenômeno da variação somaclonal.
- 3) Limpar de modo assíduo a sala de conservação, de forma a torná-la um ambiente com a maior condição asséptica possível.
- 4) Evitar ao máximo a circulação de pessoas na sala de conservação, tornando seu acesso restrito aos técnicos vinculados ao laboratório e eventualmente àquelas pessoas interessadas no tema.
- 5) Inspeccionar regularmente os aparelhos que regulam as condições do ambiente da sala de conservação, principalmente os condicionadores de ar e o timer, responsáveis, respectivamente, pelo controle da temperatura e do fotoperíodo, de maneira a detectar a ocorrência de acidentes ou falhas no funcionamento desses equipamentos. Existem laboratórios que possuem dispositivos eletrônicos, tanto na sala de conservação de germoplasma como de crescimento das culturas, que disparam algum tipo de alarme tão logo aconteçam alterações bruscas e fortes nas condições ambientais, notadamente na elevação da temperatura.

Outras desvantagens de um banco de germoplasma in vitro estão relacionadas com a necessidade de construção de instalações e a exigência de mão-de-obra especializada para o manuseio dos acessos.

Qualquer que seja o método adotado, a conservação de plantas in vitro se consegue mediante alterações no meio nutritivo e ambiente de cultivo, principalmente em relação à temperatura e intensidade luminosa, de forma a aumentar ao máximo o período entre as subculturas ou estendê-lo indefinidamente (Roca et al., 1991). Com isso, reduz-se a quantidade de mão-de-obra para o manuseio do material, o espaço físico necessário para acondicionar as plantas e os riscos de ocorrência de contaminações fúngicas e bacterianas, além de proporcionar ao melhorista acesso imediato a

todo o germoplasma da coleção ou pelo menos a aqueles genótipos que sejam de maior interesse para o programa de melhoramento.

Como métodos de conservação in vitro de germoplasma, podem-se considerar os seguintes:

a) *Crescimento Contínuo a Taxas Normais*

Este método consiste apenas em extrair gemas apicais e laterais a partir de plantas cultivadas in vitro, antes que entrem em senescência, subcultivando os segmentos em meio normalmente empregado na multiplicação do material, que é mantido sob condições ambientais propícias para a brotação e desenvolvimento dos explantes. No entanto, devido ao crescimento rápido dos cultivos, como geralmente acontece, este método exige uma maior quantidade de mão-de-obra e aumenta a possibilidade de perdas dos acessos por acidentes ou contaminações microbianas com as repetições mais frequentes das subculturas. Diante destes aspectos, para Malaurie et al (1998) este sistema é satisfatório apenas para a preservação temporária de coleções e apoio ao intercâmbio de germoplasma.

b) *Supressão Total do Metabolismo e Crescimento Celulares (Criopreservação)*

Santos (2001) considera que nenhuma das diferentes metodologias existentes e em prática, no momento, para conservação do germoplasma vegetal, permite preservar a longo prazo, com alta estabilidade genética e biológica, espécies que são vegetativamente propagadas ou que produzem sementes recalcitrantes ou intermediárias. Portanto, torna-se necessário o desenvolvimento de sistemas de conservação a longo prazo de estruturas organizadas de plantas que pertençam aos grupos daquelas espécies, até porque sempre existe um maior ou menor risco de instabilidade citogenética quando o germoplasma é conservado por muito tempo mediante técnicas de cultivo in vitro de tecidos vegetais (CIAT, 1984).

Pelas razões expostas, esforços têm sido efetuados para desenvolver procedimentos de conservação de germoplasma a temperaturas ultrabaixas ou criopreservação. No passado, a criobiologia foi voltada para a preservação de frutas, hortaliças e outras partes da planta. Esse procedimento permitiu que o material fosse preservado e tivesse ampliado o seu tempo de conservação. Agora é possível estender os métodos criobiológicos para a conservação de

germoplasma vegetal. Deter o estado de animação, reduzindo consideravelmente ou paralisando tanto os processos metabólicos como a deterioração celular, e preservar indefinidamente o genoma vegetal, são agora os principais objetivos desta ciência. A criopreservação é uma técnica que permite manter o material biológico em nitrogênio líquido (-196°C) ou em sua fase de vapor (-150°C) por longos períodos de tempo, uma vez que a essas temperaturas ultrabaixas processos como respiração e atividades enzimáticas são inativados (Withers & Williams, 1998), paralisando completamente o metabolismo celular nos explantes (Brison et al., 1995), incluindo as divisões celulares (Giacometti & Goes, 1986). Apesar de ser ainda considerado um método dispendioso e de eficácia relativa para muitas espécies (Medeiros, 2003), trata-se de um sistema não-letal de conservação de tecidos biológicos de maneira estável por animação suspensa. Muita controvérsia existe em relação à viabilidade de materiais preservados em nitrogênio líquido, principalmente pelos problemas que surgem com a complexidade técnica e biológica dos processos de congelamento e descongelamento (Withers & Williams, 1990). No entanto, vários trabalhos não têm mostrado declínio na viabilidade, a exemplo do estudo desenvolvido por Wang et al. (2005), que mantiveram ápices caulinares de mamão em nitrogênio líquido durante dois anos e não detectaram nenhum efeito negativo na regeneração de plantas. Além disso, acredita-se que o material criopreservado permanece geneticamente estável.

c) *Limitação do Crescimento para Taxas Mínimas*

Neste sistema, que pode até ser considerado como um banco ativo de germoplasma in vitro, brotos e plantas, derivados diretamente de ápices meristemáticos e gemas laterais, são mantidos em condições físicas (fatores ambientais) e/ou químicas (composição dos meios de cultura) que permitem estender ao máximo o intervalo das transferências para meios novos, sem afetar a viabilidade e estabilidade genética dos cultivos (Roca et al., 1991). Inclusive, durante os subcultivos há a possibilidade de selecionar explantes mais vigorosos, que darão origem a plantas de melhor qualidade para a manutenção in vitro.

Apesar de que diferentes tipos de explantes possam ser empregados na conservação in vitro de germoplasma vegetal, dá-se preferência aos tecidos meristemáticos devido às seguintes razões: a) as

probabilidades de ocorrência de mudanças genéticas são menores, já que a limitação da taxa de crescimento do material armazenado pode ter um efeito benéfico sobre a estabilidade da cultura, desde que diminuindo a taxa de divisão celular deve-se reduzir a frequência das mutações que ocorrem durante a duplicação de DNA na fase mitótica do ciclo celular; b) o germoplasma conservado está livre de patógenos; c) os meristemas são, freqüentemente, os explantes mais apropriados para a micropropagação; e d) ocorre maior facilidade e segurança nos procedimentos de intercâmbio e utilização imediata do germoplasma (Mroginski et al., 1991; Villalobos & Engelmann, 1995; Vieira, 2000).

Em termos de fatores físicos e químicos que podem ser manipulados para limitar o crescimento das plantas in vitro, os mais importantes, respectivamente, são a temperatura e a intensidade luminosa, e os meios de cultura com concentrações mais baixas ou até mesmo omissão de elementos nutritivos e suplementados com agentes osmóticos e inibidores de crescimento.

Na manipulação desses fatores, a limitação do crescimento pode ser conseguida na maioria dos casos com a redução da temperatura e da luminosidade da sala de conservação. A redução da temperatura para 0-6°C e 15-20°C pode diminuir a taxa de crescimento in vitro de muitas espécies de clima temperado e de plantas tropicais e subtropicais, respectivamente. A diminuição da intensidade luminosa, por sua vez, também afeta a taxa de crescimento das plantas com a redução das exigências fotossintéticas e, conseqüentemente, do metabolismo celular.

Baixas concentrações de sais minerais e de sacarose, que são fatores essenciais para o crescimento das plantas, também podem limitá-lo. A adição ao meio de cultura de manitol ou sorbitol, como agentes de efeito osmótico, reduzem a absorção de elementos minerais pelas células em função da pressão osmótica e, desse modo, limita o crescimento das plantas.

Quanto aos inibidores de crescimento, a exemplo do ácido abscísico (AAB), cuidados devem ser tomados em relação ao seu uso, já que podem produzir mudanças fisiológicas ou gerar mutações, e assim ameaçar a estabilidade genética dos materiais conservados in vitro (Giacometti & Goes, 1986; Golmirzaie & Toledo, 1998).

O importante é que todos os procedimentos aplicados para minimizar a taxa de crescimento sejam também capazes de manter a máxima viabilidade dos cultivos, haja vista que uma alta eficiência de regeneração facilita o desenvolvimento do ciclo seguinte de conservação. Esta viabilidade está também associada com o genótipo, já que as variedades diferem em relação à tolerância a temperaturas mais baixas.

O método de limitação do crescimento dos cultivos a taxas mínimas é o empregado no momento na **Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical**, em Cruz das Almas-BA, cujos detalhes serão mostrados na segunda parte desta Circular.

Estabilidade genética do germoplasma conservado in vitro

Em diversos métodos de propagação in vitro de plantas têm-se observado a ocorrência de alterações genéticas, que podem variar em um maior ou menor grau em função da interação entre o sistema de cultura de tecidos (composição do meio nutritivo, ambiente físico de cultivo etc.), a fonte de explante empregada e o genótipo. A cultura de ápices caulinares (meristema apical contendo 1 - 2 primórdios foliares), por exemplo, tem possibilitado altas taxas de multiplicação de muitas espécies vegetais, mantendo a estabilidade genética dos genótipos. No entanto, quando se trata da conservação in vitro de germoplasma, outro fator que também deve ser levado em conta, no que diz respeito à estabilidade genética dos acessos, é a estratégia de preservação utilizada.

A estabilidade genética das culturas tem sido, durante muito tempo, um motivo de inquietação quando se pensa em aplicar as técnicas in vitro para a conservação do germoplasma. Como sempre existe um risco potencial de instabilidade citogenética quando o germoplasma é mantido in vitro, é essencial que ocorra um monitoramento contínuo da estabilidade das culturas. Assim, o monitoramento da estabilidade genética in vitro de espécies cultivadas vem se tornando uma questão prioritária, inclusive porque muito pouco se conhece sobre estudos quantitativos realizados em coleções armazenadas in vitro. Apenas um número limitado de artigos bem constituídos enfocam o efeito que o sistema da conservação in vitro sob crescimento lento produz na estabilidade genética do material vegetal preservado (Villalobos & Engelmann, 1995).

As possibilidades de alterações na estabilidade genética do germoplasma estão associadas ao estágio de diferenciação do tecido em cultivo. Uma estabilidade relativamente alta está relacionada com a cultura de tecidos organizados, que são menos propícios aos riscos do surgimento de variações somaclonais, enquanto que explantes considerados como desorganizados são normalmente sujeitos a uma instabilidade mais elevada. Entre as estruturas organizadas destacam-se os meristemas, ápices caulinares e gemas laterais como as mais estáveis, seguidas pelos embriões somáticos e gemas adventícias. Já os cultivos de células, protoplastos e calos são considerados como os sistemas de cultura de tecidos que apresentam maior instabilidade, ao menos teoricamente. De modo geral, os meristemas apicais são os explantes particularmente apropriados para a conservação de germoplasma, haja vista o processo ordenado de replicação cromossômica que apresentam (Giacometti & Goes, 1986), o que reflete em uma substancial redução do risco de instabilidade genética, além, é claro, por se encontrarem livres de microorganismos, requererem pouco espaço e apresentarem um alto potencial de propagação.

Em relação aos três métodos de conservação in vitro de germoplasma - Crescimento Contínuo a Taxas Normais, Limitação do Crescimento para Taxas Mínimas e Supressão Total do Metabolismo e Crescimento Celulares - pode ocorrer mais ou menos variações em função da formação e regeneração via gemas adventícias durante o período de armazenamento. Na medida em que se reduz a temperatura de um tecido, o metabolismo celular diminui até chegar a um estado de 'suspensão animada' quando a temperatura alcança níveis inferiores a -150°C . A esta temperatura, os processos biológicos cessam e as possíveis causas de instabilidade serão, então, minimizadas ou eliminadas (Roca et al., 1991), sendo que nenhuma modificação que poderia ser atribuída à criopreservação já foi divulgada (Villalobos & Engelmann, 1995), o que demonstra o potencial desta metodologia.

Sob condições de crescimento lento, as características mais importantes que são avaliadas no armazenamento de cultivos derivados de ápices ou gemas são: contaminação, senescência foliar (relação número de folhas verdes/número de folhas mortas), número de brotos verdes (importante para uma micropropagação posterior), número de gemas viáveis (verdes) em

relação ao comprimento do caule (verde), presença ou ausência de raízes, ocorrência de calo e, claro, a estabilidade genética das culturas. Considerando que neste sistema de conservação são efetuados subcultivos com certa frequência, existe algum risco de ocorrência de instabilidade, que aumenta substancialmente quando determinadas espécies, a exemplo da bananeira (*Musa* spp.), são mantidas in vitro, especialmente em um sistema de crescimento a taxas normais. Os genótipos de *Musa* mostram uma tendência de instabilidade in vitro (Withers & Williams, 1998), ao contrário da mandioca, onde nenhuma alteração, com base em descritores morfológicos, bioquímicos (isoenzimas) e moleculares, foi observada em material de campo originado da cultura in vitro de ápices caulinares, depois de três ciclos sucessivos de conservação sob crescimento lento (Villalobos & Engelmann, 1995).

A interação entre os diversos fatores envolvidos no cultivo in vitro e o estresse que a planta sofre nessa condição acabam propiciando uma situação de instabilidade genética. Faz-se necessário, portanto, avaliar periodicamente o germoplasma, utilizando, preferencialmente, técnicas moleculares (marcadores de DNA ou protéicos) e citogenéticas (Vieira, 2000), haja vista que, adotando-se critérios morfológicos, torna-se difícil detectar diferenças entre os genótipos mantidos in vitro (Roca et al., 1991).

Protocolo de conservação in vitro de germoplasma de mandioca sob condições de crescimento mínimo

Como já mencionado, nesta segunda parte da Circular se discorrerá sobre a conservação in vitro de germoplasma de mandioca mediante o sistema de Limitação do Crescimento para Taxas Mínimas, enfocando o caso particular da ***Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical***.

O banco in vitro de mandioca na ***Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical*** foi iniciado em 1988, com o objetivo geral de evitar o perigo potencial da erosão genética dos acessos cultivados de *Manihot esculenta* e manter a variabilidade necessária aos programas de melhoramento genético da cultura. No processo, variedades de mandioca, oriundas de diversas regiões brasileiras e vários países, e que formam o banco ativo

de germoplasma implantado a campo, foram paulatinamente transferidas para a condição in vitro, via a cultura de ápices caulinares em meios nutritivos definidos e sob condições ambientais totalmente controladas.

Este procedimento de conservação in vitro de genótipos de mandioca envolve várias etapas (Fig. 2), as quais serão descritas e ilustradas com todos os pormenores para que este protocolo possa ser facilmente reproduzido.



Fig. 2. Esquema geral dos métodos atualmente empregados na preservação de germoplasma vegetal.

Estabelecimento dos explantes

A introdução de acessos de mandioca no sistema de conservação in vitro geralmente ocorre de duas formas: a partir de brotos germinados em estacas, o modo mais comumente empregado, ou de plantas que já estão sendo cultivadas em laboratório.

A partir de estacas

Plantas com idade entre 8 e 14 meses (Fig. 3A), sadias e vigorosas, devidamente identificadas quanto ao genótipo, normalmente cultivadas em bancos de germoplasma estabelecidos a campo, são selecionadas, podadas a 10-15 cm do solo (Fig. 3B) e seccionadas em estacas com aproximadamente 15-20 cm de comprimento, empregando um facão bem afiado ou uma serra manual (Fig. 3C). Caso não seja possível obter plantas diretamente de bancos de germoplasma, pode-se recorrer a material de campos experimentais ou até mesmo de áreas de produtores, desde que o genótipo seja comprovadamente reconhecido e que esteja sob um bom controle fitossanitário.



Fotos: Antônio da Silva Souza

Fig. 3. Plantas de mandioca em bom estágio de desenvolvimento para fornecimento de manivas (A), podadas a cerca de 10-15 cm do solo (B) e seccionadas em estacas de 15-20 cm com serra manual (C).

As estacas são, então, plantadas em casa de vegetação, em bandejas de isopor contendo substrato composto por fibra de coco e Plantmax®, na proporção de 1:1 (Fig. 4A). Caso se trate de um substrato que vai ser reutilizado, deve preferencialmente ser esterilizado por autoclavagem durante uma hora, sob temperatura de 121°C e pressão de 1,05 gk/cm² (Fig. 4B). Opcionalmente, estacas contendo duas gemas (Fig. 5A) podem ser plantadas em câmara de propagação rápida (Fig. 5B), uma estrutura que é empregada em um sistema alternativo de multiplicação acelerada de material de plantio de mandioca. Em ambos os casos, as estacas 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 5 minutos, para eliminar qualquer praga presente no material de plantio.

Nesta etapa do processo, três aspectos devem ser levados em consideração. O primeiro diz respeito ao terço superior da planta selecionada, que, por ser mais herbáceo, produzirá brotos menos vigorosos e, portanto, deve ser eliminado (Fig. 6A). O segundo aspecto é que o corte efetuado no momento do seccionamento da maniva deve ser feito em ângulo reto (Fig. 6B), de forma transversal, para que ocorra uma formação mais uniforme de raízes nas manivas. Neste momento, pode-se comprovar se realmente a planta estava no estágio adequado de crescimento para colheita da maniva, observando-se o diâmetro da medula das estacas. Este diâmetro deve ser em torno de 50% da medula total da maniva. Por último, cuidados devem ser tomados durante a colheita e retirada da planta matriz do campo, bem como por ocasião do seccionamento da maniva, tratamento fitossanitário, transporte das estacas para a casa de vegetação e seu plantio em substrato, de maneira que não ocorram danos mecânicos nas suas gemas e epiderme (Fig. 6C), protegendo-as ao máximo para garantir uma boa taxa de germinação e formação de brotos bem desenvolvidos.

A concentração de microrganismos que podem causar contaminações, presentes na superfície dos tecidos, é dependente das condições ambientais onde as plantas fornecedoras de explantes são cultivadas. Certamente ela será mais baixa em tecidos provenientes de câmaras climatizada e de termoterapia, e mais alta naqueles oriundos de casa de vegetação, câmara de



Fig. 4. Plantas de estacas de mandioca em casa de vegetação (A) e substrato acondicionado em saco de plástico e autoclavado para reutilização (B).



Fig. 5. Estacas de duas gemas plantadas (A) câmaras de propagação acelerada de material de plantio de mandioca (B).

propagação rápida e campo. Diante das condições não-assépticas da casa de vegetação, ambiente indicado neste protocolo para o cultivo de estacas de mandioca, é interessante que os brotos sejam manipulados com a maior assepsia possível, para reduzir a probabilidade de contaminação dos ápices caulinares quando estabelecidos in vitro.

Fotos: Antônio da Silva Souza



Fig. 6. Terço superior de planta de mandioca (A), estacas cortadas em ângulo reto (B) e setas indicando danos nas gemas e superfície das manivas (C).

Assim, aproximadamente aos 12-15 dias, a depender da variedade, as gemas brotam e se desenvolvem, tanto em casa de vegetação (Fig. 7A) como em câmara de propagação rápida (Fig. 7B), ocasião em que os ápices já podem ser cortados. Com o auxílio de uma tesoura afiada e/ou uma lâmina de bisturi nova, os brotos são extraídos, com um tamanho em torno de 1,5-2,0 cm (Fig. 7C), e colocados em um béquer pequeno, previamente identificado com o nome do genótipo, contendo um pouco de água destilada e/ou deionizada para evitar que desidratem, mesmo sendo levados imediatamente para o laboratório, o que refletirá em uma maior taxa de sucesso no cultivo dos ápices caulinares. Os brotos são, então, transportados para o laboratório, a fim de se proceder sua desinfestação, o isolamento e o estabelecimento in vitro dos ápices caulinares.



Fig. 7. Brotações em estacas de mandioca cultivadas em casa de vegetação (A), câmara de propagação rápida (B) e brotos (C) de onde serão extraídos os ápices caulinares.

a) *Desinfestação dos Brotos*

Realizada obrigatoriamente na câmara de fluxo laminar, sob condições assépticas, esta etapa visa eliminar os microrganismos presentes na superfície do explante. No processo de desinfestação procura-se eliminar bactérias e fungos, principalmente, e assim evitar as contaminações. Naturalmente, os meristemas apicais em si estão isentos da presença de microrganismos. No entanto, os apêndices situados no seu entorno podem conter microrganismos que vão desencadear todo um processo de contaminação.

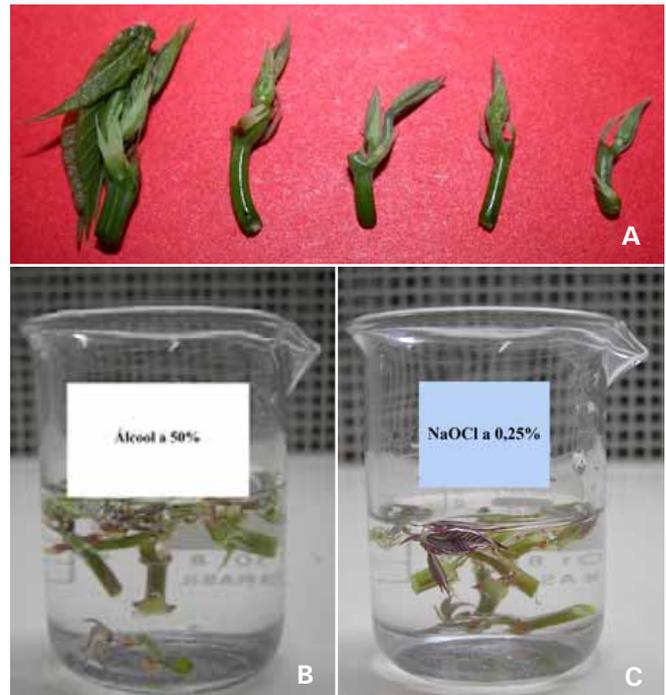
As contaminações se constituem em um dos pontos mais críticos de todo o processo in vitro, já que podem causar prejuízos consideráveis tanto no estabelecimento dos ápices caulinares no meio de cultura como nas fases seguintes de multiplicação e

Fotos: Antônio da Silva Souza

enraizamento das plantas. Diante desse potencial de risco, é fundamental prevenir as contaminações e, antes mesmo de iniciar o processo de desinfestação dos explantes, vestir um guarda-pó, que só deve ser usado dentro das instalações do laboratório, e lavar as mãos e antebraços com água e sabão e enxaguá-los com álcool 70%. Existe uma ampla gama de substâncias químicas que possuem ação germicida e podem ser empregadas na desinfestação dos explantes. De modo geral, as mais utilizadas são o etanol e aquelas à base de cloro. O etanol deve ser usado antes do hipoclorito, pois, além da ação germicida, exerce, ainda, a de surfactante, eliminando as bolhas de ar presentes na superfície do explante e permitindo que o cloro tenha um maior contato com o material vegetal.

Inicialmente, fora da câmara de fluxo laminar, deve-se eliminar as folhas maiores que não fazem parte da região apical (Fig. 8A), retornando os brotos para o béquer com água. Prontos para o processo de desinfestação, os brotos são levados para a câmara de fluxo laminar, transferidos para uma pequena bolsa de malha de nylon ou gaze, submersos em álcool 50% durante 1 minuto (Fig. 8B). Nessa concentração de 50%, o álcool não provoca uma desidratação rápida nos tecidos e, 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 3 minutos (Fig. 8C). 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: Antônio da Silva Souza

Fig. 8. Eliminação de folhas, da esquerda para a direita, em brotos de mandioca (A), para desinfestação em álcool a 50% (B) e hipoclorito de sódio a 0,25% (C).

b) *Isolamento dos Ápices Caulinares*

Os ápices caulinares extraídos de brotações de estacas plantadas em casa de vegetação e câmara de propagação rápida são mais apropriados para iniciar um sistema de micropropagação de mandioca do que aqueles retirados de plantas no campo, por três razões: a) menor concentração de microrganismos na superfície dos tecidos; b) facilidade de coletar os brotos em um local mais próximo do laboratório; e c) as estacas se constituem em uma fonte contínua de provisão de ápices caulinares por um tempo considerável.

O tamanho do ápice caulinar é um ponto crítico para sua regeneração e conseqüente formação de uma planta completa, considerando-se especialmente se o objetivo do cultivo in vitro é também a eliminação de vírus. Geralmente, quanto maior o tamanho do ápice caulinar maior a probabilidade de regeneração de plantas. No entanto, maiores serão as possibilidades dessas plantas possuírem vírus, quando for o caso, tornando-se necessário, portanto, reduzir o tamanho do ápice caulinar até o limite que permita uma alta taxa de recuperação de plantas isentas daqueles patógenos, principalmente se as estacas empregadas como fontes de explantes não forem expostas à termoterapia.

Devido ao diminuto tamanho do ápice caulinar da mandioca após seu isolamento, 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. Trabalhando no campo visual de um microscópio estereoscópico, com aumentos de 10 a 40X (Fig. 9A), vai-se eliminando gradativamente os apêndices (folhas e estípulas) com o auxílio de pinça e bisturi contendo uma lâmina número 11 (Fig. 9B), até que se consiga visualizar o ápice caulinar, que tem como característica marcante um forte brilho. 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. 9C), para facilitar sua transferência ao meio de cultura. Este corte deve ser feito de forma rápida e cuidadosa, para evitar a desidratação excessiva dos tecidos e garantir um maior índice de sobrevivência dos explantes.

conjunto de bisturi e lâmina seria utilizado, então, para proceder a eliminação das folhas e estípulas na fase inicial da operação.

c) Estabelecimento *In Vitro* dos Ápices Caulinares

Colocar rapidamente o ápice caulinar sobre a superfície de 2,5 mL do meio de cultura de estabelecimento (Fig. 10), previamente distribuídos em tubos de ensaio de 14 mm de diâmetro e 100 mm de tamanho, transferindo-os posteriormente para a sala de crescimento, sob condições de temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$, densidade de fluxo de fótons de $30 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ e fotoperíodo de 16 horas. Recomenda-se cobrir os tubos de ensaio com 1-3 camadas de gaze, durante os 10 primeiros dias do estabelecimento, para reduzir a luminosidade e permitir uma rápida diferenciação e um melhor desenvolvimento dos explantes. Tem-se observado que o emprego de tubos de ensaio pequenos no cultivo de ápices caulinares de mandioca implica em pequena formação de calo, o que reflete em maior rapidez na regeneração de plantas. O calo parece interferir na diferenciação normal do tecido vascular entre a raiz e o caule dificultando seu funcionamento (CIAT, 1980).

Fotos: Antônio da Silva Souza

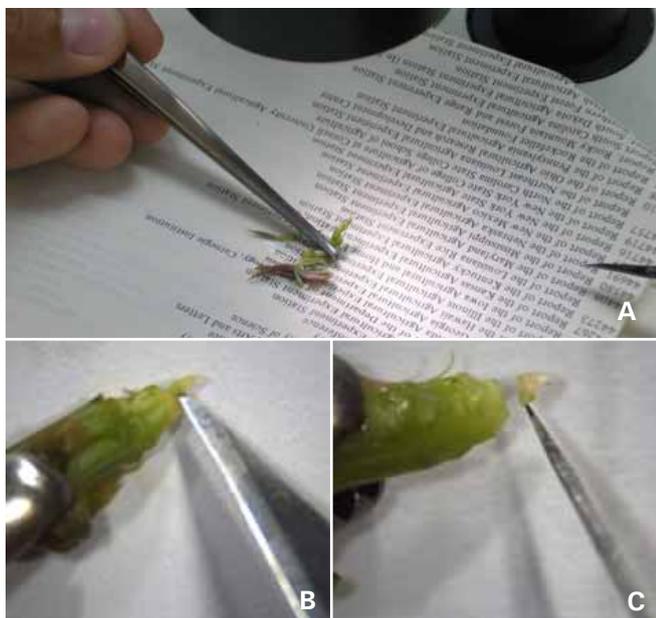


Fig. 9. Broto de mandioca no campo visual do estereomicroscópio, eliminação gradativa de apêndices (folhas e estípulas) (B) e ápice caulinar apropriadamente extraído e pronto para ser estabelecido in vitro (C).

Recomenda-se que a lâmina de bisturi utilizada no corte final do ápice caulinar seja usada apenas com esta finalidade, para que se fazer uma incisão muito precisa, evitando provocar danos nos tecidos. Outro



Fig. 10. Ápice caulinar de mandioca aderido na ponta de lâmina de bisturi (no detalhe) sendo inoculado em meio de cultura de estabelecimento.

Uma adequada composição do meio de cultura é determinante para desencadear os processos morfogênicos necessários à regeneração de plantas, pois fornece aos meristemas os nutrientes e demais fatores de crescimento necessários para sua

Fotos: Antônio da Silva Souza

diferenciação em caules, folhas e raízes. É de relevante importância incluir na sua formulação uma apropriada combinação de substâncias reguladoras de crescimento, representadas por uma auxina, uma citocinina e uma giberelina. Essas substâncias iniciam as reações químicas, mudam a composição química dentro das plantas e, quando associadas a fatores ambientais, como luz e temperatura, interagem com os processos bioquímicos durante o crescimento e diferenciação (Almeida et al., 1997/98). No caso específico da mandioca, esses reguladores de crescimento têm sido representados, geralmente, pelo ácido naftalenoacético (ANA), benzilaminopurina (BAP) e ácido giberélico (AG₃), haja vista os bons resultados que propiciam ao cultivo in vitro dos ápices caulinares dessa euforbiácea.

O meio de cultura empregado no estabelecimento in vitro de ápices caulinares de mandioca é composto

pelos sais minerais do MS (Murashige & Skoog, 1962), suplementado com tiamina-HCl, inositol, reguladores de crescimento e sacarose (Mafla et al., [200-?]), gelificado com ágar ou Phytigel® e pH ajustado em 5,7-5,8 (Tabela 1), com KOH (ou NaOH) 0,5-1,0N, após a adição de todos os componentes. Com este pH, ligeiramente ácido, o meio de cultura favorece o crescimento dos ápices caulinares estabelecidos.

Esta composição básica do meio de estabelecimento associada às concentrações de ANA, BAP e AG₃, indicadas na Tabela 1, têm permitido alcançar 100% de regeneração de plantas a partir do cultivo in vitro de ápices caulinares da quase totalidade dos genótipos de mandioca que vêm sendo micropropagados.

Depois de distribuídos nos tubos de ensaio (Fig. 11A), o meio deve ser autoclavado a uma temperatura de 121°C e pressão de 1,05 kg/cm², durante 20 minutos (Fig. 11B).

Tabela 1. Meios de cultura empregados nas fases do estabelecimento in vitro de ápices caulinares, multiplicação/enraizamento e conservação in vitro de germoplasma de mandioca.

<i>Componentes¹</i>	<i>Meios de Cultura</i>		
	Estabelecimento	Multiplicação/Enraizamento	Conservação
Macronutrientes			
NH ₄ NO ₃	1.650	550	1.650
KNO ₃	1.900	633	1.900
CaCl ₂ .2H ₂ O	450	150	450
MgSO ₄ .7H ₂ O	370	123	370
KH ₂ PO ₄	170	57	170
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8	9,3	27,8
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	37,3	12,4	37,3
Micronutrientes			
KI	0,83	0,28	0,83
H ₃ BO ₃	6,2	2,1	6,2
MnSO ₄ .4H ₂ O	22,3	7,4	22,3
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6	2,9	8,6
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25	0,08	0,25
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025	0,008	0,025
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025	0,008	0,025
Vitamina + Hexitol			
Tiamina – HCl	1	1	1
Inositol	100	100	100
Reguladores de crescimento			
ANA	0,02	0,01	0,01
BAP	0,04	0,01	0,02
AG ₃	0,05	0,01	0,10
Sacarose (g)	20	20	20
Ágar² (g)	8	8	8
Phytigel² (g)	1,8	2	2

¹Em mg/L, exceto o indicado

²Um ou outro

Fotos: Antônio da Silva Souza

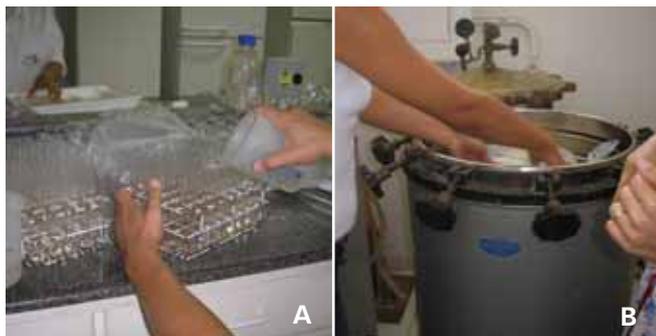


Fig. 11. Distribuição (A) e autoclavagem (B) do meio de cultura de estabelecimento in vitro de ápices caulinares de mandioca.

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. 12), uma coloração verde-pálido e alguma diferenciação de suas estruturas, para tubos de ensaio de $\varnothing = 16 \times A = 125$ mm, contendo 3,0 mL do meio de cultura de estabelecimento recém preparado.

Foto: Antônio da Silva Souza

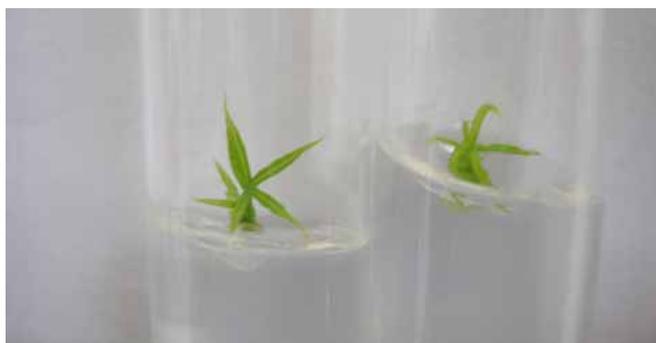


Fig. 12. Ápices caulinares de mandioca em diferenciação.

Os eventos de diferenciação dos tecidos continuam evoluindo e com mais 10-20 dias já haverá a formação de um pequeno caule com 1,0-1,5 cm de tamanho e a expansão de algumas folhas (Fig. 13A).

Frequentemente acontece o desenvolvimento de um pequeno calo na base e/ou o crescimento de raízes (Fig. 13B), que devem ser eliminados e o material já pode ser conduzido para a fase seguinte do processo, que é a multiplicação. No entanto, como o padrão geral de desenvolvimento dos meristemas apicais depende da variedade de mandioca, da composição do meio de cultura ou da interação de ambos os fatores, pode ocorrer as seguintes alterações: a) formação de um caule sem raízes, em cuja base cresce apenas calo (as raízes são formadas depois de um longo período de permanência do caule no meio de cultivo); b) formação de um pequeno caule com raízes muito longas; c)

formação de um caule muito pequeno com numerosas gemas, porém sem raízes; e d) falta total de crescimento e desenvolvimento (CIAT, 1980).

Procedimentos otimizados em todo o processo de micropropagação da mandioca refletirão na eliminação, ou pelo menos, minimização, dessas alterações.

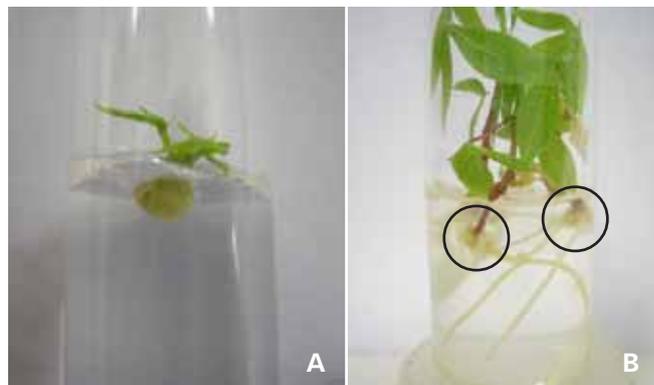


Fig. 13. Brotos de mandioca originado do cultivo in vitro de ápices caulinares mostrando as primeiras folhas (A) e formação indesejável de calo (B).

Fotos: Antônio da Silva Souza

A partir de material in vitro

Neste caso, o procedimento é facilitado e agilizado, haja vista que os genótipos já estão sendo cultivados in vitro (Fig. 14), dispensando-se, portanto, os diversos passos observados anteriormente, quando os ápices caulinares são extraídos de brotos oriundos de estacas cultivadas em casa de vegetação. Outra vantagem deste procedimento é que as plantas selecionadas para a extração das gemas apicais e/ou laterais já se encontram isentas de contaminações provocadas por fungos, bactérias e outros agentes, anulando-se praticamente a possibilidade do surgimento de tais microrganismos nos materiais que serão conservados in vitro.

Foto: Antônio da Silva Souza



Fig. 14. Plantas de mandioca empregadas no estabelecimento in vitro de um banco de germoplasma.

Micropropagação

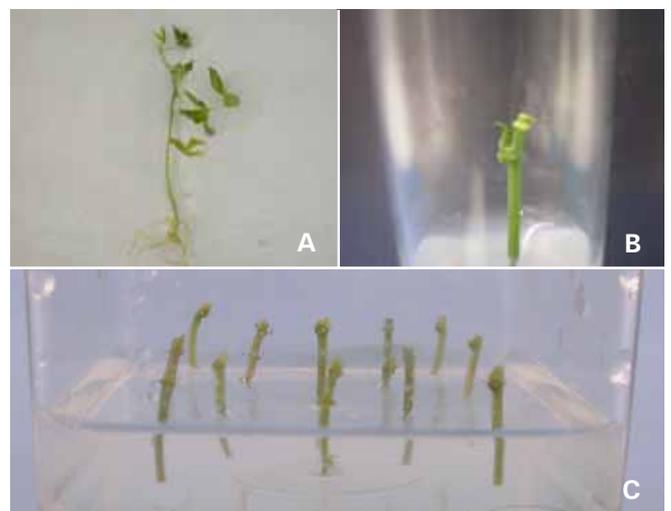
Independentemente do procedimento adotado no estabelecimento dos explantes, todo material é submetido a uma etapa de multiplicação in vitro ou micropropagação, de maneira a se obter a quantidade de plantas de cada genótipo necessária para a conservação em si. Esta fase deve ser conduzida de forma a obter uma taxa de multiplicação satisfatória, sem interferir na qualidade do material. Essa qualidade, associada à uniformidade no desenvolvimento das plantas, será muito importante para a formação do sistema radicular, processo fundamental para o êxito da conservação in vitro.

Portanto, com base nestes aspectos e visando a obtenção de plantas de mandioca de qualidade, a etapa da micropropagação deve abranger três pontos básicos: as subculturas, a composição do meio nutritivo e as condições ambientais de cultivo.

Subculturas

Conforme mencionado anteriormente, faz-se necessário multiplicar cada genótipo de mandioca para se conseguir o número de plantas que será destinado à conservação. Entretanto, além da quantidade, deve-se atentar para a produção de plantas bem homogêneas em termos de desenvolvimento e que mantenham as características genéticas da planta matriz. Para isso, quando a planta atingir um tamanho que permita ter sua haste seccionada em várias microestacas, deve ser micropropagada. É muito importante, antes de iniciar o processo de micropropagação, analisar o aspecto da plantas, se apresenta um bom vigor vegetativo, coloração verde e ausência de problemas como vitrificação e tecidos necrosados. Igualmente importante é observar a cultura contra a luz da câmara de fluxo laminar para verificar se há ocorrência de contaminações bacterianas e/ou fúngicas. Após concluir que a planta apresenta condições satisfatórias para ser multiplicada, deve ser retirada do tubo de ensaio com o auxílio de uma pinça de tamanho médio, até que sua parte basal (sistema radicular com ou sem 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. Outro procedimento que pode ser adotado é retirar a planta do tubo de ensaio, depositá-la sobre o papel de filtro (Fig. 15A) e eliminar as folhas com uma lâmina de bisturi número 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, de maneira que o corte superior de cada microestaca seja feito 1-2 mm acima da gema mais alta (Fig. 15B). Pegar a microestaca pela parte superior com uma pinça grande (25 cm de tamanho) e inserir aproximadamente 1/3 dela no meio de cultura (Fig. 15C). A pinça deste tamanho facilita introduzir a microestaca no meio de cultura de multiplicação/enraizamento, haja vista que o tubo de ensaio recomendado para esta etapa possui 15 de comprimento.



Fotos: Antônio da Silva Souza

Fig. 15. Planta de mandioca para ser micropropagada (A), microestaca lateral mostrando a gema axilar (B) e microestacas cultivadas em meio de multiplicação/enraizamento (C).

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 trabalhar com um pequeno número de explantes por vez.

Outro 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. Uma planta de mandioca para ser micropropagada é seccionada em segmentos entre 1,0 e 1,5 cm de tamanho, resultando geralmente em uma microestaca contendo a gema apical e as demais com pelo menos uma gema lateral. Posteriormente, com o cultivo in

vitro, as gemas se diferenciam em parte aérea (caule e folhas) e raízes. Para uma formação mais homogênea de plantas, as microestacas que contêm gemas laterais devem ser colocadas, preferencialmente, em meio de estabelecimento, enquanto aquelas que possuem a gema apical 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.

Outro ponto a ser verificado é a frequência 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 e com o meio de cultura apresentando uma tonalidade amarronzada. Assim, ao atingir a tampa do tubo de ensaio, cada planta geralmente 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 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 , que são mais baixas no de multiplicação/enraizamento (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 Phytigel®, 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 121°C e pressão de 1,05 kg/cm², durante 20 minutos.

Podem ser empregados tubos de ensaio de tamanho grande, de $\varnothing = 18, 20$ ou $25 \times A = 150$ mm, contendo, respectivamente, 5, 7 ou 10 mL de meio de cultura. Para fins de economia, ao utilizar tubos de 25×150 mm (Fig. 16A), pode-se distribuir até três microestacas por recipiente. No entanto, em outros tipos de recipientes as plantas de mandioca se

desenvolvem bem, a exemplo de frascos de vidro redondos ($\varnothing = 6,5$ cm x $A = 10,0$ cm) (Fig. 16B) e caixas de plástico quadradas ($A = 8,0$ cm x $L = 7,5$ cm) (Fig. 16C), com 40 e 70 mL de meio, onde são cultivados, respectivamente, até 5 e 9 explantes.

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.

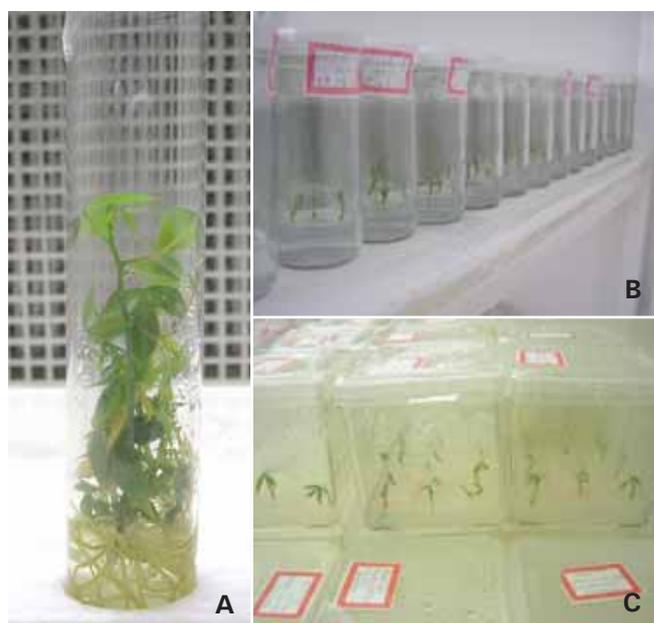


Fig. 16. Micropropagação da mandioca em meio de multiplicação/enraizamento distribuído em tubo de ensaio (A), frascos de vidro (B) e caixas de plástico (C).

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 morfogênicas 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 $27 \pm 1^\circ\text{C}$, mantida com termostato, 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 entanto, apesar de se reconhecer a importância morfogenética destes componentes, os estudos realizados com o objetivo de analisá-los são escassos (Villalobos & Thorpe, 1991). 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 $30 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, proporcionada por lâmpadas fluorescentes brancas frias em ciclo de fotoperíodo/escuro de 16/8 horas controlado por um timer.

Além disso, Mafla et al. ([200-?]) chamam a atenção para um outro fator ambiental que é a umidade relativa. Caso seja maior que 70%, condição que pode propiciar o desenvolvimento de microrganismos e aumentar o risco de contaminação das culturas, é necessário usar um desumidificador, equipamento que permite regular esse fator. E esta preocupação é ainda maior quando se tratar de uma coleção in vitro, onde os acessos devem ser mantidos em ambiente com o máximo de assepsia.

Avaliação das culturas em multiplicação

Em todas as etapas do processo de cultivo in vitro de tecidos de plantas deve-se monitorar rigorosamente o surgimento de contaminações, o desenvolvimento dos explantes de partida, o crescimento e o enraizamento das plantas, e o estado do recipiente de cultura. Bactérias e fungos (Fig. 17A) são os contaminantes mais comuns dos meios nutritivos e podem ser facilmente detectados nos cultivos in vitro, especialmente se o agente gelificante for alguma goma tipo 'gelan', a exemplo do Phytigel® (Fig. 17B), que deixa o meio nutritivo bem mais transparente que o ágar (Fig. 17C). Uma vez comprovado que está contaminado, o material deve ser imediatamente isolado e autoclavado durante uma hora sob

temperatura de 121°C ($1,05 \text{ kg}/\text{cm}^2$). 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.

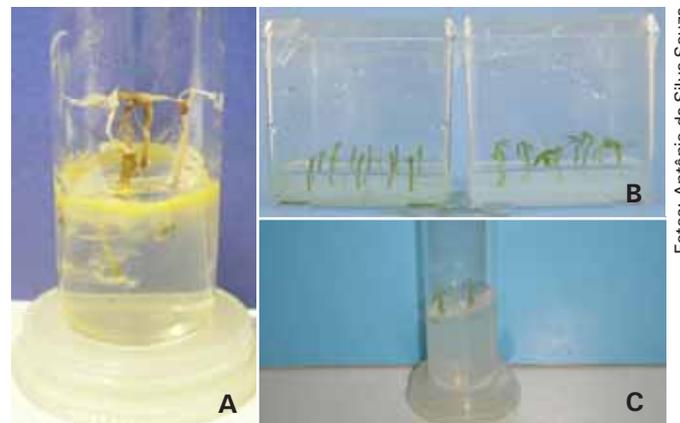


Fig. 17. Planta de mandioca contaminada por bactéria (A) e meios de cultura gelificados com Phytigel® (B) e ágar (C).

Fotos: Antônio da Silva Souza

Quando 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, sem manchas cloróticas.

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

Conservação

Após essa rigorosa avaliação dos materiais na fase de micropropagação, as plantas bem desenvolvidas podem ser seccionadas e as microestacas, também com um tamanho de 1,0-1,5 cm, contendo a gema apical e as gemas laterais subsequentes (Fig. 18A), colocadas no meio de conservação e mantidas na sala de

Fotos: Antônio da Silva Souza

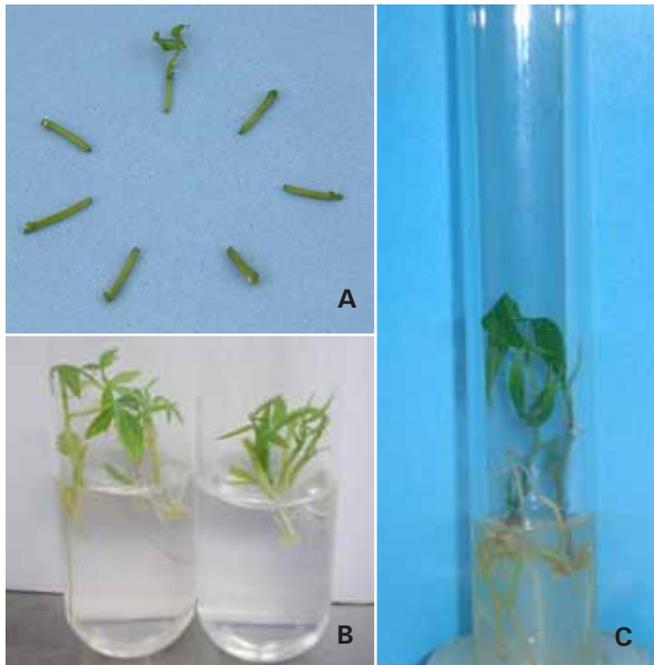


Fig. 18. Microestacas apical e laterais (A), cultivadas no meio de conservação e mantidas na sala de crescimento (B) e planta de mandioca com folhas e sistema radicular em estágio adequado de transferência para a sala de conservação (C).

No banco in vitro de germoplasma de mandioca da **Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical** mantêm-se três tubos de ensaio por genótipo, cada tubo com três plantas. Nos itens seguintes se discorrerá sobre o procedimento adotado no processo de conservação in vitro do germoplasma de mandioca.

Meio de cultura

O meio de cultura usado para desacelerar o crescimento dos cultivos, prolongando o intervalo entre a subculturas, constitui-se das concentrações normais dos sais minerais do MS básico, contendo também tiamina-HCl, inositol, reguladores vegetais, sacarose (Mafla et al., [200-?]) e um agente solidificante, que pode ser o ágar ou Phytigel®, com o pH ajustado em 5,7-5,8 (Tabela 1). A exemplo dos meios de cultura citados anteriormente, o meio empregado na conservação in vitro dos acessos de mandioca deve ser também autoclavado em uma temperatura de 121 °C e pressão de 1,05 kg/cm², por 20 minutos.

Condições ambientais

Também na conservação in vitro deve-se levar em consideração a interação entre diversos fatores, especialmente a temperatura e a luminosidade, de forma a reduzir a taxa de crescimento das plantas. No caso da mandioca, as condições ambientais

empregadas para conservar in vitro o banco de germoplasma são: temperatura de 22 ± 1 °C, densidade de fluxo de fótons de $10 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ e fotoperíodo de 12 horas. A exemplo do que acontece na sala de crescimento, a temperatura e o fotoperíodo da sala de conservação são também controlados por um termostato e um timer, respectivamente (Fig. 19).



Foto: Antônio da Silva Souza

Fig. 19. Termostato (abaixo) e timer, aparelhos empregados no controle da temperatura e do fotoperíodo da sala de conservação, respectivamente.

Manutenção dos acessos

No sistema de crescimento lento, com as mudanças efetuadas no ambiente físico de cultivo (temperatura, intensidade luminosa e fotoperíodo) e no meio de cultura (nutrientes orgânicos e inorgânicos, reguladores osmóticos ou inibidores de crescimento) reduz-se o metabolismo das plantas e, conseqüentemente, aumenta-se ao máximo o intervalo entre as transferências (o ideal seria estendê-lo indefinidamente). Procura-se, dessa maneira, sem afetar a viabilidade das plantas, reduzir a quantidade de mão-de-obra empregada, os custos operacionais e materiais, e os riscos potenciais de contaminação por fungos e bactérias, além de deixar todo o germoplasma disponível para ser explorado, especialmente em programas de melhoramento genético. Lemos et al. (2002) consideram que períodos entre 1 e 2 anos podem ser satisfatórios para a conservação do germoplasma a curto ou médio prazo, o que se aplica perfeitamente à cultura da mandioca, haja vista que este protocolo, associando as condições ambientais com os fatores relativos ao material vegetal, especialmente o genótipo, permite que acessos de mandioca sejam conservados por períodos de até 18 meses.

Avaliação das culturas em conservação

Para determinar o momento em que os acessos podem ser subcultivados e evitar que entrem em senescência, o monitoramento do banco de germoplasma in vitro deve focalizar principalmente o vigor e a viabilidade das plantas, e o estado fitossanitário dos tubos. A elevada umidade dentro do tubo de ensaio (Fig. 20A) ou qualquer outro recipiente de cultivo e a presença de açúcar no meio nutritivo favorecem o crescimento de microrganismos responsáveis pelas contaminações (Fig. 20B), que podem se tornar um grave problema para a conservação in vitro de um banco de germoplasma.

Fotos: Antônio da Silva Souza

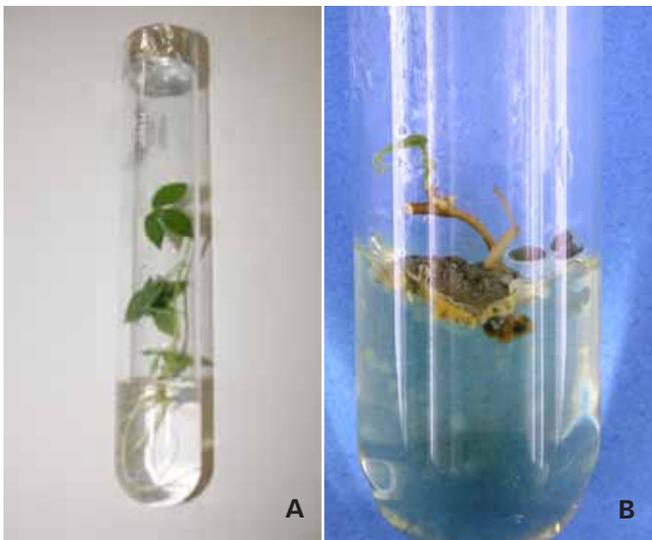


Fig. 20. Detalhe da elevada umidade relativa no interior do tubo de ensaio (A) e contaminação fúngica em uma planta de mandioca (B).

Com o passar do tempo, o meio de cultura que inicialmente apresenta-se cristalino (Fig. 21A) torna-se amarelado e progressivamente vai adquirindo uma coloração amarronzada (Fig. 21B), como consequência da secreção de metabólitos das raízes, especialmente de tipo fenólico. Paralelamente, deve-se observar que as plantas tenham folhas e caules verdes, e que as raízes apresentem crescimento vigoroso (Fig. 21C).

A crescente concentração de metabólitos no meio de cultura, tornando-o de cor amarronzada, pode causar toxicidade às plantas. Quando os cultivos se apresentem amarelados, desfolhados, porém mantendo as gemas apicais e laterais esverdeadas, devem ser transferidos para um meio de cultura novo.



Fotos: Antônio da Silva Souza

Fig. 21. Meio de cultura mostrando um aspecto cristalino no início (A) e uma tonalidade amarronzada em etapa posterior da conservação (B), e plantas de mandioca apresentando coloração verde nas suas folhas e caules (C).

Paralelamente, se durante as inspeções visuais no banco de germoplasma se comprovar a presença de contaminações bacterianas ou fúngicas, é interessante que os tubos afetados sejam imediatamente isolados e posteriormente esterilizados em autoclave durante uma hora sob temperatura de 121°C (1,05 gk/cm² de pressão). No entanto, caso se trate de um acesso muito valioso e/ou escasso e que seja difícil de localizar para coleta e reintrodução in vitro, deve-se adotar o mesmo procedimento recomendado no item 3.2.5. Caso a contaminação persista e atinja todos os tubos de um determinado acesso na coleção, pode-se seguir o processo de desinfestação indicado por Mafla et al. ([200-?]). Nesse processo, se a contaminação for bacteriana, adiciona-se algum antibiótico ao meio de cultura, a exemplo da Vancomicina, a uma concentração de 40 mg/L. Caso se trate de uma contaminação provocada por fungos, realiza-se a desinfecção com diferentes concentrações de hipoclorito de sódio, ligeiramente superiores às recomendadas na desinfestação dos brotos para extração e estabelecimento in vitro dos ápices caulinares. É possível, com estas medidas, recuperar

algum material contaminado, que será posteriormente reintroduzido na coleção in vitro, tão logo seja comprovada a ausência de contaminação.

Subcultivos

Nesse processo, por motivo de segurança, pode-se deixar um dos três tubos de ensaio de cada acesso de reserva. Secciona-se as plantas dos outros dois tubos e seleciona-se as nove microestacas mais vigorosas, especialmente aquelas localizadas no terço superior de cada planta. Essas microestacas são transferidas para um meio fresco e também cultivadas, inicialmente, por cerca de duas semanas, na sala de crescimento, até a formação das primeiras folhas e iniciação do sistema radicular, sendo posteriormente translocadas para as condições de conservação. Com isto, tem-se um novo ciclo de conservação de nove plantas, distribuídas em três tubos de ensaio.

Base de dados

Segundo Roca et al. (1991), uma coleção genética em laboratório deve manter e atualizar continuamente um banco informatizado, que contenha informações relacionadas com todos os aspectos da conservação in vitro dos acessos, tais como dados de passaporte, caracterização genotípica, indexação de doenças, micropropagação, intercâmbio internacional, equipamentos e material de consumo, e outros aspectos logísticos do processo. No entanto, por não haver uma estrutura que permita fazer todo esse controle no manejo do banco de germoplasma de mandioca da **Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical** conservado em laboratório, alguns dados vêm sendo registrados, de forma que posteriormente possam ser inseridos em um banco informatizado. Esses dados compreendem as datas de estabelecimento in vitro e as transferências subsequentes, os meios de cultura empregados em cada etapa e observações relacionadas com o aspecto vegetativo das plantas de cada acesso.

Conclusões e perspectivas

Os métodos convencionais de conservação de germoplasma possuirão sempre um papel preponderante no desenvolvimento de programas de melhoramento genético. Entretanto, métodos alternativos vêm assumindo uma crescente

importância na conservação das espécies. Esses métodos devem ser ajustados e utilizados sempre com o intuito de eliminar problemas que dificultem ou impeçam a exploração de germoplasmas valiosos. Por outro lado, tais procedimentos devem ser evitados no momento em que não sejam realmente necessários ou se tornem até mesmo sofisticados para determinadas espécies e locais, onde alternativas mais simples podem contribuir de forma muito mais significativa.

Para várias espécies de propagação vegetativa e produtoras de raízes e tubérculos, a exemplo da mandioca, a conservação in vitro de germoplasma sob condições de crescimento lento, em um ambiente controlado, já é um sistema viável e habitual. O estabelecimento de estratégias que possam associar e complementar a conservação em nível de campo com a preservação do banco in vitro trará muito mais benefícios, disponibilizando o acesso a materiais a serem incorporados em programas de melhoramento e facilitando o intercâmbio de germoplasma de mandioca, inclusive em abrangência internacional.

O desenvolvimento de sistemas cada vez mais simples de criopreservação, inclusive sem a necessidade de utilizar os sofisticados e caros equipamentos de congelamento, tem gerado grandes perspectivas para a criopreservação de plantas nos próximos anos.

O importante de tudo isso é que, tanto em sistemas de conservação sob limitação do crescimento como em qualquer outro método alternativo, seja mantida a fidelidade genética dos acessos, fator crucial para a exploração racional e eficiente dos bancos de germoplasma.

Referências bibliográficas

ALMEIDA, W. A. B. de; MATOS, A. P. de; SOUZA, A. da S. Influência da benzilaminopurina (BAP) no desenvolvimento de plântulas do abacaxizeiro (*Ananas comosus* (L.) Merr.) cultivadas *in vitro*. **Magistra**, Cruz das Almas, BA, n. 10, p. 55-63, 1997/98.

BRISON, M.; BOUCAUD, M. T. de; DOSBA, F. Cryopreservation of in vitro grown shoot tips of two interspecific *Prunus* rootstocks. **Plant Science**, Limerick, v. 105, n. 2, p. 235-242, 1995.

- CABRAL, G. B.; CARVALHO, L. J. C. B.; SCHAAL, B. A. Root induction of wild species of *Manihot* under *in vitro* culture. In: CARVALHO, L. J. C. B.; THRO, A. M.; VILARINHOS, A. D. (Ed.). INTERNATIONAL SCIENTIFIC MEETING CASSAVA BIOTECHNOLOGY, 4., 2000, Salvador. **Proceedings...** Brasília, DF: Embrapa-Cenargen, 2000. p. 383-387.
- CASAZZA, G.; SAVONA, M.; CARLI, S.; MINUTO, L.; PROFUMO, P. Micropropagation of *Limonium cordatum* (L.) Mill. for conservation purposes. **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, v. 77, n. 5, p. 541-545, 2002.
- CIAT. **El cultivo de meristemas de yuca**. Cali, 1980. 40 p. (CIAT. Guia de Estudio. Serie 045C-02.02).
- 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).
- EIRA, M. T. S. Conservação de germoplasma na forma de sementes, *in vitro* e criopreservação. In: SIRGEALC - SIMPÓSIO DE RECURSOS GENÉTICOS PARA A AMÉRICA LATINA E CARIBE, 3.; REUNIÃO LATINO AMERICANA DE ESPECIALISTAS EM *Arachis*, 3.; REUNIÃO LATINO AMERICANA DE ESPECIALISTAS EM RECURSOS GENÉTICOS FLORESTAIS, 3., 2001, Londrina. **Anais...** Londrina: IAPAR, 2001. p. 30-32.
- EMPRESA PERNAMBUCANA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Programa de biotecnologia vegetal (Plant biotechnology programme)**. Recife: IPA, 1991. 13 p. (IPA. Documentos, 14).
- FORTES, G. R. de L.; PEREIRA, J. E. S. Preservação *in vitro* da batata com ácido acetilsalicílico e duas fontes de carboidrato. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 36, n. 10, p. 1261-1264, out. 2001.
- GIACOMETTI, D. C.; GOES, M. de. Conservação de germoplasma de espécies frutíferas pelo uso da biotecnologia. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, BA, v. 8, n. 3, p. 39-46, 1986.
- GOES, M. de; 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.; THRO, A. M.; VILARINHOS, A. D. (Ed.). INTERNATIONAL SCIENTIFIC MEETING CASSAVA BIOTECHNOLOGY, 4., 2000, Salvador. **Proceedings...** Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2000. p. 388-395.
- GOLMIRZAIE, A.; TOLEDO, J. *In vitro* conservation of potato and sweetpotato germplasm. In: **CIP program report 1997-98**. Lima: CIP, 1998. p. 351-356.
- LEMONS, E. E. P. de; FERREIRA, M. de S.; ALENCAR, L. M. C. de; RAMALHO NETO, C. E.; ALBUQUERQUE, M. M. de. Conservação *in vitro* de germoplasma de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 37, n. 10, p. 1359-1364, 2002.
- MAFLA, G.; ROA, J. C.; ARANZALES, E.; DEBOUCK, D. G. **Manual de procedimientos para la conservación *in vitro* del germoplasma del género *Manihot***. Cali: CIAT, [200-?]. 50 p.
- MAFLA, G.; ROCA, W.; REYES, R.; ROA, J. C.; MUÑOZ, L.; BACA, A. E.; IWANAGA, M. *In vitro* management of cassava germplasm at CIAT. In: ROCA, W. M.; THRO, A. M. (Ed.). INTERNATIONAL SCIENTIFIC MEETING OF THE CASSAVA BIOTECHNOLOGY NETWORK, 1., 1992, Cartagena. **Proceedings...** Cali: CIAT, 1993. p. 168-174. (CIAT. Working Document, 123).
- MALAUURIE, B.; TROUSLOT, M.-F.; BERTHAUD, J.; BOUSALEM, M.; PINEL, A.; DUBERN, J. Medium-term and long-term *in vitro* conservation and safe international exchange of yam (*Dioscorea* spp.) germplasm. **Electronic Journal of Biotechnology**, Valparaíso, v. 1, n. 3, Dec. 1998.
- MATSUMOTO, T.; MOCHIDA, K.; ITAMURA, H.; SAKAI, A. Cryopreservation of persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.) by vitrification of dormant shoot tips. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 20, p. 398-402, 2001.
- MBANASO, E. N. A.; NWACHUKWU, E. C.; ENE, L. S. O. Progress on cassava improvement through biotechnology at the National Root Crops Research Institute, Umudike. In: ROCA, W. M.; THRO, A. M. (Ed.). INTERNATIONAL SCIENTIFIC MEETING OF THE CASSAVA BIOTECHNOLOGY NETWORK, 1., 1992, Cartagena. **Proceedings...** Cali: CIAT, 1993. p. 111-115. (CIAT. Working Document, 123).
- MEDEIROS, J. de D. A biotecnologia e a extinção das espécies. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, DF, n. 30, p. 109-113. jan./jun. 2003.
- MROGINSKI, L. A.; ROCA, W. M.; KARTHA, K. K. Crioconservación del germoplasma. In: ROCA, W. M.; MROGINSKI, L. A. (Ed.). **Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones**. Cali: CIAT, 1991. p. 715-730.
- 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.

NAVARRO, L.; PINA, J. A.; JUÁREZ, J.; ARREGUI, J. M.; ORTEGA, C.; NAVARRO, A.; BALLESTER-OLMOS, J. F.; VIVES, M. del C.; MONTALT, R.; DURÁN-VILA, N.; GUERRI, J.; MORENO, P.; CAMBRA, M.; MEDINA, A.; ZARAGOZA, S. El programa de mejora sanitaria de variedades de cítricos en España: 30 años de historia. **Phytoma**, Valencia, n. 170, p. 14-23, 2005.

REYNOLDS, J. F. Summary and future direction: chemical regulation in tissue culture. **HortScience**, Alexandria, v. 22, n. 6, p. 1206-1207, 1987.

ROCA, W. M.; ARIAS, D. I.; CHÁVEZ, R. Métodos de conservación *in vitro* del germoplasma. In: ROCA, W. M.; MROGINSKI, L. A. (Ed.). **Cultivo de tejidos en la agricultura**: fundamentos y aplicaciones. Cali: CIAT, 1991. p. 697-713.

SANTOS, I. R. I. Criopreservação de germoplasma vegetal. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, DF, n. 20, p. 60-65, 2001.

VIEIRA, M. L. C. Conservação de germoplasma *in vitro*. **Botecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, DF, n. 14, p. 18-20, 2000.

VILLALOBOS, V. M.; ENGELMANN, F. *Ex situ* conservation of plant germplasm using biotechnology. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 11, p. 375-382, 1995.

VILLALOBOS, V. M.; THORPE, T. A. Micropropagación: conceptos, metodología y resultados. In: ROCA, W. M.; MROGINSKI, L. A. (Ed.). **Cultivo de tejidos en la agricultura**: Fundamentos y aplicaciones. Cali: CIAT, 1991. p. 127-141.

WANG, Y.-L.; FAN, M.-J.; LIAW, S.-I. Cryopreservation of in vitro-grown shoot tips of papaya (*Carica papaya* L.) by vitrification. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, Taipei, v. 46, p. 29-34, 2005.

WITHERS, L. A.; WILLIAMS, J. T. Conservação *in vitro* de recursos genéticos de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: Embrapa-SPI: Embrapa-CNPq, 1998. p. 297-330.

WITHERS, L. A.; WILLIAMS, J. T. Germplasm conservation *in vitro* and cryopreservation. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. (Ed.). **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília, DF: ABCTP: Embrapa-CNPq, 1990. p. 267-286.

Circular Técnica, 90

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical
Endereço: Rua Embrapa, s/n, Caixa Postal 007,
44380-000, Cruz das Almas, BA.
Fone: (75) 3312-8000
Fax: (75) 3312-8097
E-mail: sac@cnpmf.embrapa.br

1ª edição
1ª impressão (2009): online

Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento



Comitê de publicações

Presidente: Aldo Vilar Trindade.
Secretária: Maria da Conceição P. Borba dos Santos.
Membros: Abelson da Silva Gesteira, Ana Lúcia Borges, Antonio Alberto Rocha Oliveira, Carlos Alberto da Silva Ledo, Davi Theodoro Junghans, Eliseth de Souza Viana, Léa Ângela Assis Cunha, Marilene Fancelli.

Expediente

Supervisão editorial: Ana Lúcia Borges.
Revisão de texto: Cláudia Fortes Ferreira, Jorge Luiz Loyola Dantas.
Tratamento das ilustrações: Saulus Santos da Silva.
Editoração eletrônica: Saulus Santos da Silva.