

## NOVAS APLICAÇÕES DA CULTURA DE TECIDOS NA MANDIOCA (*Manihot esculenta*, Crantz)

**Luis Pedro Barrueto Cid<sup>1</sup>; Rúbia Estefânia Pinto da Silva<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Pesquisador da *Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia*, Caixa Postal 02372, 70770-900 Brasília, DF. E-mail: lpedro@cenargen.embrapa.br; <sup>2</sup>Bolsista da *Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia*. E-mail: rubiae\_silva@yahoo.com.br.

### INTRODUÇÃO

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é uma planta de grande importância econômica por sua alta capacidade de produção de amido. Sua utilização é predominante na dieta alimentar humana, principalmente na forma de farinha seca (Mattos & Dantas, 1981). Por outro lado, cultivares silvestres contêm características que podem ser incorporadas às plantas cultivadas por meio de melhoramento tradicional ou engenharia genética (Carvalho et al., 2004). O cultivo *in vitro* de novos cultivares permite conhecer as facilidades e dificuldades dos mesmos para a micropropagação e conservação de germoplasma. A técnica de sementes sintéticas está sendo proposta na conservação de germoplasma como uma alternativa rápida e de baixo custo que permite conservação em longo prazo e facilita o intercâmbio de germoplasma (Piccioni & Standardi, 1995). A cultura *in vitro* permite ainda induzir e formar raízes de reserva, servindo de modelos experimentais para estudar e entender melhor a ontogenia do crescimento secundário na função do armazenamento de amido (Cabral et al., 2000).

### METODOLOGIA

Material de Campo: Manivas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), genótipo F-5077, contendo gemas dormentes e medindo 200 mm - 300 mm, foram coletadas de um campo experimental da *Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia* em Brasília, DF. Em casa de vegetação, as manivas foram inseridas verticalmente, até um terço de seu comprimento, em sacos de polietileno preto contendo vermiculita com irrigações manuais periódicas e mantidas a uma temperatura de  $23^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ . As gemas dormentes começaram a desenvolver em 30 dias. Quando os brotos atingiram aproximadamente 100 mm de comprimento por 5 mm de largura, foram removidos e levados ao laboratório para assepsia e cultivo *in vitro*. Os brotos foram lavados com água corrente e detergente e cortados em segmentos de 10 mm - 15 mm, contendo uma gema axilar em cada (mini-estaca). No fluxo laminar, as mini-estacas foram lavadas por 10 minutos em hipoclorito de sódio 2,5% (p/v) e

enxaguadas em água destilada deionizada autoclavada. Depois disso, as mini-estacas foram submetidas por 30 minutos em solução de Benlate 500 (Dupont) e Claforan (Hoechs/Roussel) 0,1% (p/v) respectivamente. As mini-estacas foram inoculadas separadamente em tubos de ensaio contendo 12 mL de meio SP (Barrueto Cid & Durzan, 2003), totalizando 20 repetições, e incubados por 45-60 dias sob condições padrão de  $27^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  e 16 horas de fotoperíodo, com irradiância de  $50 \mu\text{m m}^{-2} \text{s}^{-1}$  fornecidos por tubos de luz fluorescente branca e fria.

**Sementes Sintéticas:** Após dois meses, brotos emergidos das mini estacas obtidas de casa de vegetação, tiveram suas folhas e raízes removidas. Os caules foram cortados em segmentos de 5-7 mm contendo uma gema axilar por nó. Os segmentos foram separados em três grupos. No primeiro (A) e segundo grupo (B), os nós foram transferidos para um copo de vidro contendo 50 ml de uma solução de Alginato de Sódio 3% (p/v) e sacarose 2% (p/v). Usando uma pipeta Pasteur, os segmentos foram sugados e colocados em 80 mL de solução de Cloreto de Cálcio 1% (p/v) para o seu encapsulamento. Sendo que, os nós encapsulados do primeiro grupo foram inoculados em placas Petri contendo meio SP e os nós do segundo grupo, foram inoculados em placas Petri contendo duas camadas de papel filtro com 5 ml de água destilada e deionizada. No terceiro grupo (C), os nós não foram encapsulados e inoculados em placas Petri contendo meio SP. Todo o material foi mantido à  $15^{\circ}\text{C}$  no escuro, durante 30 dias. Depois deste período, o material foi transferido para condições padrão de luz e temperatura. Para cada tratamento foram usadas três placas, sendo que em cada placa foram colocadas 12 explantes encapsulados ou não, conforme cada tratamento.

**Indução da tuberização *in vitro*:** Plantas *in vitro* do genótipo de mandioca F-5077, com uma altura de aproximadamente 100mm, que vinham sendo cultivadas sob condições padrão de luz e temperatura, tiveram suas raízes eliminadas mantendo apenas a parte aérea. Essas plantas foram inoculadas separadamente em tubos de ensaio contendo 15 mL de meio SP suplementado com TDZ (Thidiazuron) nas concentrações 0,0; 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5 e 3  $\mu\text{M}$ . Foram feitas quatro repetições por tratamento, ou seja quatro 4 tubos por concentração de TDZ. Os tubos de ensaio foram tampados com plástico filme. As plantas foram incubadas em  $27^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  e 16 horas de fotoperíodo e irradiância de  $50 \mu\text{m m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , durante 35 dias.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em relação as 20 microestacas obtidas da casa de vegetação e cultivadas *in vitro*, três tubos apresentaram contaminação fúngica e oito tubos apresentaram contaminação bacteriana. Os outros nove tubos que não apresentaram qualquer tipo de contaminação, foram mantidos e serviram de fonte de material para os experimentos subsequentes.

No que diz respeito a sementes sintéticas, após o período de 30 dias, os nós inoculados no grupo A alcançaram 70% de conversão, enquanto o grupo B zero %. Já o grupo C apresentou 66% de conversão. Os resultados do grupo A sugerem que não houve ação tóxica do alginato-Ca nem inibição por parte da baixa temperatura. Estes resultados encorajam a idéia de se usar este procedimento como alternativa de armazenamento *in vitro* em mandioca, especialmente considerando, o baixo risco de variação somaclonal, pelo fato das plantas provirem de gemas axilares e não de gemas adventícias oriundas de calo. Respeito ao grupo B, os resultados sugerem que uma ação nutricional é fundamental para a viabilidade das gemas presentes nos nós, por isso os resultados foram nulos. Por outro lado, os altos resultados do grupo C mostraram que o material usado estava vigoroso, não sofrendo nenhuma danificação devido à assepsia.

Em relação à indução de tuberização *in vitro*, das diferentes concentrações utilizadas de TDZ, somente em 1  $\mu\text{M}$ , 1,5  $\mu\text{M}$ , 2  $\mu\text{M}$  houve tuberização com uma média de 1,25 raízes/tubo (1  $\mu\text{M}$ ), 0,75 raízes/tubo (1,5  $\mu\text{M}$ ) e 0,25 raízes/tubo (2  $\mu\text{M}$ ). Nas demais concentrações, além de não tuberizarem, houve morte do eixo caulinar da planta. As plantas controle formaram apenas raízes adventícias e não houve morte do eixo caulinar da planta. Estes resultados mostram que TDZ pode ser utilizado neste tipo de estudo especialmente na concentração de 1  $\mu\text{M}$ . Entretanto, estudos adicionais tornam-se necessários para melhorar tanto a otimização destes resultados bem como, a compreensão da tuberização, como por exemplo, o crescimento secundário da raiz para armazenamento.

## CONCLUSÕES

Do ponto de vista experimental, nossos resultados confirmam que em mandioca o encapsulamento é uma possível plataforma tecnológica que visa melhorar o armazenamento e a micropropagação em grande escala. No caso da tuberização, subsídios experimentais foram encontrados visando consolidar um modelo de estudo relacionado com a problemática da síntese de amido.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Barrueto Cid, L. P. e Durzan, D. J. 2003. Efeito da cefotaxima na germinação, crescimento e brotação de gemas axilares, sob condições *in vitro*. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 49. **EMBRAPA**, Brasília, 17pp.

Cabral, G. B.; Carvalho, L. J. C. B. e Schaal, B. A. 2000. The Formation of Storage Root in Cassava. *In*: Cassava Biotechnology. Carvalho, L. J. C. B.; Thro, A. M. & Vilarinhos, A. D. (eds.). **EMBRAPA**, Brasília, DF, p.345-356.

Carvalho, L. J. C. B.; Souza, C. R. B.; Cascardo, J. C. M.; Block Jr., C & Campos, L. 2004. Identification and characterization of a novel cassava (*Manihot esculenta* Crantz) clone with high free sugar content and novel starch. Plant Molecular Biology, 56: 643-659.

Mattos, P. L. P. & Dantas, J. L. L. 1981. Utilização do Cultivo da Mandioca Consorciada com Feijão. Circular Técnica número 2, **EMBRAPA**, Bahia, 22p.

Piccioni, E. & Standardi A. 1995. Encapsulation of micropropagated buds of six woody species. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 42: 221-226.