

MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DE GENÓTIPOS DE MANDIOCA AÇUCARADA

Elinea de Oliveira FREITAS¹, Tatiane Loureiro da SILVA²,
Luiz Joaquim Castelo Branco CARVALHO³, Jonny Everson SCHERWINSKI-PEREIRA³

RESUMO: O objetivo deste trabalho foi avaliar e comparar o potencial de multiplicação *in vitro* de acessos de mandioca açúcarada. Foram utilizadas microestacas de dez acessos de mandioca açúcarada já estabelecida *in vitro*, pertencentes à Coleção de Germoplasma da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. O meio de cultura utilizado foi formado pelos sais e vitaminas de MS adicionado de 100 mg.L⁻¹ de tiamina, 10 mg.L⁻¹ de inositol, 20 g.L⁻¹ de sacarose e os reguladores de crescimento BAP, ANA e AG₃ nas concentrações de 0,02 mg.L⁻¹, 0,01 mg.L⁻¹ e 0,01 mg.L⁻¹, respectivamente. Após 40 dias de cultivo foram analisados os resultados de altura, números de gemas e número de raízes em relação à posição da gema (apical e axilar) no início do cultivo. Verificou-se que na média, genótipos multiplicados a partir de explantes apicais apresentaram altura, número de gemas e número de raízes formadas de 3,2 cm; 3,7 e 3,2 respectivamente, valores significativamente superiores àqueles observados para as plantas originadas de gemas axilares que foram de 1,4 cm; 2,4 e 1,1 respectivamente.

Palavras-chave: *Manihot esculenta*, mandioca açúcarada, micropropagação, cultura *in vitro*

SUMMARY: *IN VITRO* MULTIPLICATION OF SUGARY CASSAVA GENOTYPES. The objective of this work was to evaluate and to compare the potential of *in vitro* multiplication of accessions of sugary cassava. Microshoots of ten cassava accessions established *in vitro*, and belonging to the *in vitro* collection of Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia were used. The medium culture was formed by the salts and vitamins of MS added of 100 mg.L⁻¹ of thiamine, 10 mg.L⁻¹ of inositol, 20 g.L⁻¹ of sucrose and the growth regulators BAP, NAA and GA₃ in the concentrations of 0.02 mg.L⁻¹, 0.01 mg.L⁻¹ and 0.01 mg.L⁻¹, respectively. After 40 days, the plant height and the bud and roots numbers per plant were analyzed in relation to the position of the bud on microplant (apical and axillary) in the initial period of cultivation. It was verified that in the average, genotypes multiplied from apical explants presented the best results when compared to axillary explants. With apical explants the plant height

¹ Graduanda do Curso de Ciências Biológicas, Faculdade Alvorada de Brasília, SEUPN 516 Norte, CEP 70770-520- Brasília-DF. E-mail: elineaofreitas@yahoo.com.br

² Mestranda do Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Amazonas, Av. Gal. Rodrigo Octávio Jordão Ramos, 3000, Mini-campus, Bloco G Coroado, Manaus, AM, CEP: 69.077-000. E-mail: tathiloureiro@hotmail.com

³ Pesquisadores, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, PqEB, Av. W5 Norte (final), Caixa Postal 02372, Brasília-DF. E-mail: carvalho@cenargen.embrapa.br; jonny@cenargen.embrapa.br

and buds and roots number reached 3.2 cm; 3.7 and 3.2 respectively, values significantly superiors to 1.4 cm; 2.4 and 1.1 observed when axillary explants were used.

keywords: *Manihot esculenta*, sugary cassava, micropropagation, *in vitro* culture

INTRODUÇÃO

A mandioca é uma dicotiledônea da família Euphorbiaceae e faz parte do gênero *Manihot*. Nessa família são encontrados 290 gêneros e aproximadamente 7.500 espécies distribuídas em todas as regiões tropicais e subtropicais, principalmente na África e América (Barroso et. al., 1984).

A mandioca apresenta grande importância econômica e alimentar, constitui-se na principal fonte de calorias para os países da América Latina, África, Sudeste da Ásia e Oceania (Roca, 1984), sendo consumida diariamente por mais de 500 milhões de pessoas (Taylor et al., 1996). Os programas de melhoramento genético de mandioca no Brasil são orientados, em grande parte, para a produção de farinha e fécula. Novas variedades como a mandioca açucarada, podem diversificar o mercado de derivados da mandioca em uso comercial no momento atual, sendo utilizada para obtenção de biocombustível (Castelo, 2008).

De acordo com pesquisas realizadas pela Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia em 2008, uma das características identificadas por essa variedade é o alto teor de glicose, que pode ser altamente positivo para a produção de etanol, já que dispensa a necessidade de hidrólise utilizada no processo convencional. Segundo Castelo (2008), as variedades pesquisadas pela Embrapa possuem açúcar na raiz ao invés de amido e, por isso, podem induzir a uma redução de mais de 25% no custo energético do processo final de obtenção de etanol.

Rotineiramente, a mandioca é propagada vegetativamente, a partir de estacas, chamadas de manivas. Segundo Lopez (1995), a propagação em campo é muito lenta, sendo produzidas a cada ano, sob condições adequadas de cultivo, estacas para o plantio de uma área oito vezes maior que a de sua origem. Além disso, várias doenças, principalmente as sistêmicas, podem ser transmitidas por meio de sucessivas gerações, tais como o vírus-do-mosaico-comum, vírus-do-mosaico das nervuras, vírus do mosaico africano, vírus colombiano sem sintomas, vírus X, vírus do mosaico-caribenho, vírus couro de sapo, vírus do superalongamento, e também a bacteriose *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis* e as podridões radiculares, causadas pelos fungos *Phytophthora* sp., *Fusarium* sp., *Diplodia* sp. e *Scytalidium* sp. (Fukuda,1993; Oliveira et al., 2000). Essas doenças podem afetar a produtividade da cultura em níveis de até 100% (Oliveira et al., 2000).

A micropropagação de plantas é uma das aplicações mais importantes da cultura de tecidos *in vitro*. Consiste na formação de novas plantas a partir de pequenas partes, inoculadas em meio nutritivo artificial sob condições assépticas (Piza & Pinho, 2002). Além de possibilitar a limpeza clonal dos materiais sob cultivo, a micropropagação é uma ferramenta que pode possibilitar a produção de uma grande quantidade de mudas em curto espaço de tempo e em reduzido espaço físico (Roca & Mroginski, 1991; Mabanza et al., 1994; Oliveira et al., 2000). Acrescente-se o fato de que o vigor das plantas limpas tem-se reservado por mais de quatro ciclos da cultura (Mabanza et al., 1994). Lozano et al. (1984), Roca (1984) e Mabanza et al. (1994) obtiveram aumentos de produtividade 320%, 70% e 100% respectivamente em razão da limpeza de patógenos.

Apesar de já existirem trabalhos na literatura acerca da propagação *in vitro* de mandioca (Smith et al., 1986; Oliveira et al., 2000), até o momento, não existem protocolos e determinações de taxas de multiplicação *in vitro* para mandiocas do tipo açúcaradas. Além disso, também inexistem dados sobre a influência da posição da gema sobre as taxas da multiplicação *in vitro*.

Este trabalho teve por objetivo avaliar a propagação e determinar taxas de multiplicação *in vitro* de genótipos de mandioca açúcarada em razão do tipo de explante utilizado (posição apical e axilar).

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos e Conservação de Germoplasma Vegetal *in vitro* pertencente à Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

Microestacas já estabelecidas, com 93 dias de idade, foram utilizadas para a montagem do experimento. Para a realização do trabalho utilizaram-se dez acessos de mandioca açúcarada pertencente à espécie *Manihot esculenta*. Todo o material vegetal foi proveniente da Coleção de Germoplasma *in vitro* pertencente a Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

O meio básico utilizado para a multiplicação *in vitro* foi formado pelos sais e vitaminas do meio de cultura de MS (Murashige & Skoog, 1962), modificado, acrescidos de 100mg.L⁻¹ de tiamina, 10 mg.L⁻¹ de inositol, 20 g.L⁻¹ de sacarose, acrescido dos reguladores BAP (benzilaminopurina), ANA (ácido naftaleno acético) e AG₃ (ácido giberélico), nas concentrações de 0,02 mg.L⁻¹, 0,01 mg.L⁻¹ e 0,01 mg.L⁻¹, respectivamente. O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,7±0,1 antes da adição do agente solidificante ágar (7 g.L⁻¹), sendo posteriormente autoclavado por 20 minutos sob 121°C e 1,5 atm de pressão.

Para avaliar o efeito da posição da gema nas taxas de multiplicação dos genótipos, microestacas da porção apical e axilar das plantas foram comparadas. Para tanto, microestacas de aproximadamente 0,8 a 1 cm de comprimento, com uma gema axilar foram inoculadas em tubos de ensaio (20 mm de diâmetro x 150 mm de altura), contendo 10 mL de meio de cultura.

O delineamento experimental utilizado foi em blocos ao acaso em esquema fatorial 2 x 10, com dois tipos de material propagativo (microestacas de origem apical e axilar) e 10 genótipos de mandioca açucarada. O experimento foi formado por oito repetições por tratamento, sendo cada repetição formada por um tubo de ensaio contendo uma microestaca.

Uma vez em cultivo, o material foi mantido sob radiação luminosa de $30 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ e temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e após 40 dias, o material foi avaliado quanto a altura da parte aérea (cm), número de gemas e número de raízes em relação à posição da gema (apical e axilar). Os dados obtidos foram analisados com o emprego do programa de análises estatísticas SISVAR, com as médias comparadas pelo teste Scott e Knott a 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados relativos a altura de plantas, número de gemas e número de raízes encontram-se na Tabela 1. Com exceção dos genótipos Iguaçu, 36.18, 36.14 e 36.0 para altura de plantas e Iguaçu para número de raízes formadas, de maneira geral, observou-se que explantes provenientes da gema apical apresentaram resultados significativamente superiores àqueles originários da posição axilar. Assim, após 40 dias de cultivo, verificou-se que independentemente do genótipo, a altura média das plantas originárias de explantes da gema apical foi de 3,2 cm, valor significativamente superior àquele das plantas originárias de gemas axilares que foi de 1,4 cm

Entre os genótipos, verificou-se que o Castanhal foi o que apresentou maior altura de plantas quando se utilizou gemas de origem apical, enquanto que não foram observadas diferenças significativas de altura entre os genótipos quando se utilizou gemas de origem axilar. E quando se avaliou os genótipos independentemente da posição da gema, verificou-se que na média os que apresentarem maior altura de gemas foram o AIC, Castanhal, 36.3, 36.18 e 36.16 (Tabela1). Assim como observado para altura de brotações, o número de gemas formadas nas brotações regeneradas foi significativamente influenciada pela posição da gema original no explante. Assim, na média geral o número de gemas em relação a posição apical foi de 3,7, valor significativamente superior àqueles originários da posição axilar que foi de 2,4. Entre os genótipos multiplicados a partir de gemas

apicais, o maior número de gemas foi observado para AIC, Castanhal, 36.3, 36.1, 36.18, 0.66, 36.16 e 36.0, enquanto que os genótipos AIC, 36.3, 36.18 e 36.14 foram os que apresentaram a maiores taxas de multiplicação quando se utilizou gemas axilares como material propagativo.

Segundo Oliveira & Silva, 1997, na micropropagação a presença de raízes nas plantas de mandioca, em quantidade equilibrada com o desenvolvimento da parte aérea, é benéfica à multiplicação por promover maior absorção de nutrientes e, conseqüentemente, maior produção de gemas, que servirão de explantes para os subcultivos subseqüentes. Neste trabalho, assim como observado para as demais variáveis avaliadas, também se observou que o número de raízes formadas foi significativamente superior naquelas plantas originadas de explantes apicais (média de 3,2) em comparação às de origem axilar (média de 1,1). Os resultados revelaram um comportamento diferenciado para o genótipo Castanhal que além estar entre os que apresentaram os maiores valores para altura e número de gemas, também apresentou comportamento semelhante para a variável número de raízes, embora as plantas originárias de gemas laterais tenham apresentado resultados significativamente inferiores para número de raízes. Por outro lado, o genótipo Iguaçu foi o que apresentou os piores resultados para número de raízes, independentemente da posição da gema no explante, confirmando a teoria de que a presença de raízes é importante para as demais variáveis, pois neste genótipo a altura de plantas e número de gemas foi de maneira geral, significativamente inferior a todos os demais genótipos testados (Tabela 1).

CONCLUSÕES

- Genótipos de mandioca açucarada apresentam variações significativas quanto ao crescimento em altura, potencial multiplicativo e de formação de raízes quando cultivados *in vitro*;
- De maneira geral, o uso de explantes da parte mais apical das plantas (gema apical) no início do processo de micropropagação proporciona a regeneração de plantas mais altas e com maior número de gemas (maior taxa de multiplicação) e raízes por planta;
- A multiplicação *in vitro* de genótipos de mandioca açucarada pode ser uma importante ferramenta para a rápida propagação e distribuição dos genótipos de interesse.

Tabela 1. Influência da posição da gema (apical e axilar) em relação a altura de brotações, número de gemas e número de raízes em diferentes genótipos de mandioca açucarada (*Manihot esculenta*). Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2009.

| Genótipos | Altura (cm) | | | Nº gemas | | | Nº raízes | | |
|--------------|--------------|-------------|-------|-------------|--------------|-------|-------------|-------------|-------|
| | Apical | Axilar | Média | Apical | Axilar | Média | Apical | Axilar | Média |
| AIC | 4,1 bA | 1,9 aB | 3,0a | 4,6 aA | 3,5 bB | 4,0a | 4,7 bA | 2,8 aB | 3,4a |
| Castanhal | 6,2 aA | 0,7 aB | 3,4a | 3,8 aA | 1,8 aB | 2,8b | 6,1 aA | 0,2 bB | 3,1b |
| 36.3 | 3,9 bA | 1,7 aB | 2,8a | 4,3 aA | 3,0 bB | 3,6a | 4,0 bA | 2,2 aB | 3,1a |
| Iguaçu | 1,1 cA | 0,6 aA | 0,8b | 1,7 cA | 1,5 aB | 1,6c | 0,6 cA | 0,2 bA | 0,4d |
| 36.1 | 3,3 bA | 0,8 aB | 2,0b | 4,1 aA | 1,7 aB | 2,9b | 4,2 bA | 1,1 bB | 2,6b |
| 36.18 | 3,3 bA | 1,6 aA | 2,4a | 4,5 aA | 3,1 bB | 3,8a | 4,1 bA | 2,1 aB | 3,1a |
| 36.14 | 1,2 cA | 1,5 aA | 1,3b | 2,8 bA | 2,7 bB | 2,7b | 0,8 cA | 0,1bB | 0,5d |
| 0.66 | 2,9 bA | 1,1 aB | 2,0b | 4,0 aA | 2,2 aB | 3,1b | 2,0 cA | 0,6 bB | 1,3c |
| 36.16 | 3,7 bA | 2,0 aB | 2,8a | 4,0 aA | 1,8 aB | 2,9b | 3,6 bA | 0,6 bB | 2,1b |
| 36.0 | 2,6 bA | 2,3 aA | 2,4a | 3,3 aA | 2,4 aB | 2,8b | 2,0 cA | 1,0 bB | 1,4c |
| Média | 3,2 A | 1,4B | | 3,7A | 2,4 B | | 3,2A | 1,1B | |

* Médias seguidas por letras distintas dentro de cada item avaliado, minúsculas na vertical (entre os genótipos testados) e maiúsculas na horizontal (entre as posições da gema), diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste Scott-Knott.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BIOTECHNOLOGY NETWORK, 2., 1994, Bogor. **Proceedings**. Bogor: Cassava Biotechnology Network, 1994. p.194-201.
- CARVALHO, L.J.C.B.; CABRAL, G.B.; CAMPOS, L. Raiz de reserva de mandioca: **Um sistema biológico de múltiplas utilidades**. Brasília: EMBRAPA-Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2000.
- FUKUDA, C. Doenças da mandioca. In: EMBRAPA. Centro Nacional de Mandioca e Fruticultura (Cruz das Almas, BA). **Instruções práticas para o cultivo da mandioca**. Cruz das Almas, 1993. p.53-56.
- LOPEZ, J.M. Producción comercial de semilla de yuca. **Yuca Boletín Informativo**, Cali, v.19, n.2, p.1-2, 1995.
- MABANZA, J.; RODRIGUEZ-ANDRIYAMASI, A.V.; MAHOUKA, J.; BOUMBA, B. Evaluation of cleaned cassava varieties in Congo. In: INTERNATIONAL SCIENTIFIC MEETING ON CASSAVA.
- OLIVEIRA, R.P. de; GOMES, T.S.; VILARINHOS, A.D. Avaliação de um sistema de micropropagação massal de variedades de mandioca. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v.35, n.12, 2000, p.2329-2334.
- PIZA, I.M.T.; PINHO, R.S. Protocolo de micropropagação da mandioca. In: CEREDA, M.P (coord.): **Agricultura: Tuberosas Amiláceas Latino Americanas**. Vol. II. São Paulo: Fundação CARGILL, 2002. p.179 – 186.
- REITZ, R. 1988. **Euforbiáceas**. In: REITZ, R. (Ed.). Flora Ilustrada Catarinense Herbário Barbosa Rodrigues. Itajaí, 1998.
- ROCA, W.M.; CHAVEZ, R.; MARTIN, M.L.; ARIAS, D. I.; MAFLA, G.; REYES, R. *In vitro* methods of germ-plasm conservation. **Genome**. Toronto, v.31, 1989, p. 813-817.
- SANTOS, I. R. I. Criopreservação: potencial e perspectivas para conservação de germoplasma vegetal. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**. Campinas, v.12 (edição especial), 2000, p.70-84.
- TAYLOR, N.J.; EDWARDS, M.; KIERNAN, R.J.; DAVEY, C.D. M.; BLAKESLEY, D.; HENSHAW, G. G. Development of friable embryogenic callus and embryogenic suspension culture systems in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Nature Biotechnology**, v.14, 1996, p.726-730.