

## CRIOPRESERVAÇÃO DE GEMAS DE MANDIOCA 'VASSOURINHA'

CAMILA MÜLLER DALLMANN<sup>1</sup>; MARISA TANIGUCHI<sup>2</sup>; ANDRIO SPILLER COPATTI<sup>2</sup>; ATHOS ODIN SEVERO DORNELES<sup>2</sup>; TALIS BASILIO DA SILVA<sup>2</sup>; LEONARDO FERREIRA DUTRA<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – [camilacmdbiotec@gmail.com](mailto:camilacmdbiotec@gmail.com)

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – [marisataniguchi@yahoo.com.br](mailto:marisataniguchi@yahoo.com.br)

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – [andriocopatti@gmail.com](mailto:andriocopatti@gmail.com)

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – [athos\\_odin@hotmail.com](mailto:athos_odin@hotmail.com)

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – [talesbs28@gmail.com](mailto:talesbs28@gmail.com)

<sup>3</sup>Embrapa Clima Temperado – [leonardo.dutra@embrapa.br](mailto:leonardo.dutra@embrapa.br)

### 1. INTRODUÇÃO

Os recursos genéticos vegetais são parte integrante da biodiversidade e essenciais para o desenvolvimento da agricultura e indústria (BETTONI, 2019). Atividades antropogênicas afetam diretamente esse patrimônio e a conservação da variabilidade genética de espécies se torna necessária.

Nativa da América do Sul, a mandioca (*Manihot esculenta Crantz*) ocupa a quinta posição como cultura alimentar e considerada rica fonte de carboidratos (CARDOSO et al., 2016; DIANTINA et al., 2016; HEDGE et al., 2017). Nas condições do Rio Grande do Sul os materiais propagativos não resistem ao inverno, então a manutenção de bancos de germoplasma no campo não é viável. O uso de técnicas de criobiologia são alternativa para conservação a longo prazo de recursos genéticos e proporcionam tempo indeterminado de armazenamento em pequenos espaços físicos, estabilidade genética e mimetização da erosão genética (CEBALLO et al., 2017; COPELAND, 2010; SAKAI et al., 2008; SANTOS et al., 2015).

Dentre as várias técnicas, tem-se a vitrificação. Esta consiste na passagem do estado físico líquido para o estado amorfo estável, evitando a formação de cristais de gelo que danificam a membrana celular. CHAROENSUB et al. (2003) relatam um protocolo de vitrificação aplicado com sucesso a 10 cultivares de mandioca. SAKAI et al. (2007) abordam a importância das etapas do desenvolvimento do protocolo da técnica e de derivados da mesma, como o encapsulamento-vitrificação e vitrificação em gotas. DUMET et al (2013) e SANTOS et al. (2015) inferem sobre métodos para armazenamento de recursos vegetais em criobancos, resultado de estudos realizados nos últimos anos, gerando avanços significativos na criogenia de células e sistemas vegetais (GONZALEZ-ARNAO et al., 2008). Uma etapa crucial do procedimento está na adição de osmoprotetores, dentre os quais se pode citar o sorbitol, o glicerol e a sacarose (SANTOS et al., 2007; GONZALEZ-ARNAO et al. 2013). O objetivo do presente trabalho é criopreservar gemas de mandioca 'Vassourinha', testando diferentes concentrações de osmoprotetores.

### 2. METODOLOGIA

Gemas com aproximadamente 2mm foram isoladas de plântulas da cultivar vassourinha multiplicadas in vitro, inoculadas em meio de pré-cultivo MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) com 0,3M de sacarose e mantidas na ausência de luz por 24 horas. Posteriormente, os explantes foram submetidos a cinco diferentes tratamentos de soluções de carregamento (LS): sem adição de solução LS (T1); 0,4M L<sup>-1</sup> de sacarose + 2,0M L<sup>-1</sup> de glicerol (T2); 0,8M L<sup>-1</sup> de sacarose +

2,0M L<sup>-1</sup> de glicerol (T3); 0,4M L<sup>-1</sup> de sorbitol + 2,0M L<sup>-1</sup> de glicerol (T4); e 0,8M L<sup>-1</sup> de sorbitol + 2,0M L<sup>-1</sup> de glicerol (T5).

Os explantes foram tratados com LS por 20 minutos e, em seguida, desidratados por 50 minutos na solução de PVS2 (Plant Vitrification Solution 2), a 25 °C. Em seguida, foram colocados em criotubos e imersos em nitrogênio líquido, onde permaneceram por 24 horas. Decorrido este período, os explantes foram descongelados em banho-maria por 38 ± 2 °C, expostos à solução de descarregamento (sacarose 1,2 M L<sup>-1</sup>) por 20 minutos e inoculados em placas com meio de regeneração MS + 100 mg L<sup>-1</sup> de mio-inositol, sendo o pH ajustado para 5,8 antes da inclusão do ágar (7,5 g L<sup>-1</sup>) + 0,05 mg L<sup>-1</sup> BAP + 0,1 mg L<sup>-1</sup> ANA + 0,2 mg L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub> + 2% sacarose, permanecendo 3 dias em ausência de luz em sala de crescimento. Posteriormente, foram expostos à luz durante 30 dias para avaliação da sobrevivência, sob fotoperíodo de 16 horas de luz, irradiância de 36 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> e temperatura de 25 ± 2 °C.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com três repetições, compostas por uma placa contendo 10 explantes cada. A variável analisada foi a sobrevivência do material vegetal após a vitrificação.

Os dados foram submetidos à análise de variância, e as médias, comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de significância utilizando-se o software estatístico SISVAR<sup>®</sup> (FERREIRA, 2014).

## 2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Houve baixa sobrevivência das gemas nos tratamentos T2 e T4 com criopreservação de 6,67% e 13,34%, após 30 dias da vitrificação (Tabela 1), respectivamente. Nos tratamentos controle, com a aplicação das soluções de LS, sem a imersão em nitrogênio líquido, a sobrevivência de explantes variou de 36 a 66%. A porcentagem encontrada no trabalho foi muito próxima do relatado por Diantina et al. (2016), os quais obtiveram 8,75% de explantes de mandioca utilizando as mesmas concentrações de osmoprotetores do tratamento T2, com um protocolo semelhante ao aplicado para a 'Vassourinha'. Ocorreu a formação de calos nos tratamentos T2 e T4. Possivelmente, os reguladores de crescimento adicionados no meio de regeneração aliados aos hormônios endógenos dos explantes promoveram um balanço hormonal, favorecendo, dessa forma, a formação de calos e pouca recuperação do material. Os tratamentos com criopreservação T1 sem LS, T3 e T5 com LS, em seguida, expostos à solução de PVS2 e imersos em nitrogênio líquido, não sobreviveram, apresentando coloração esbranquiçada. Mesmo ocorrendo a sobrevivência nos tratamentos T2 e T4, não houve diferença significativa entre todos os tratamentos submetidos à técnica. Não ocorreu contaminação em nenhum tratamento, tanto naqueles com ou sem criopreservação.

Tabela 1. Sobrevivência de gemas de 'vassourinha' submetidas à técnica de vitrificação com diferentes tratamentos de solução LS. Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS, 2019.

Tratamentos	Sobrevivência (%)	
	Com criopreservação	Sem criopreservação
T1	0 Ba	36,67 Ab
T2	13,34 Ba	36,67 Ab
T3	0 Ba	66,67 Aa
T4	6,67 Ba	43,34 Ab
T5	0 Ba	50,00 Ab

Médias seguidas por letras, maiúsculas na linha e minúsculas na coluna, diferem pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

SAKAI et al. (2002) e CHAROENSUB et al. (2003) obtiveram taxas médias de 80% e 70%, respectivamente, utilizando o tratamento T2, sendo que este último aborda um protocolo semelhante aplicado com sucesso a 10 cultivares de mandioca, podendo inferir que a 'Vassourinha' não respondeu como o esperado em comparação com as outras cultivares em relação ao mesmo LS do tratamento T2. SANTOS et al. (2015) obtiveram 72% de sobrevivência dos explantes, sem a adição de LS. A diferença entre as taxas de sobrevivência deste trabalho em relação aos demais trabalhos citados pode estar relacionada com diferentes materiais genéticos submetidos à vitrificação. Ressalta-se que não há na literatura trabalhos de criopreservação com a 'Vassourinha'.

De acordo com os resultados obtidos, sugere-se que a criopreservação da cultivar Vassourinha passe por adaptações na metodologia, testando-se outras concentrações de crioprotetores e tempos de exposição.

#### 4. CONCLUSÕES

Na criopreservação da cultivar de mandioca 'Vassourinha' obteve-se até 13% de sobrevivência de gemas.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BETTONI, J.C. Criopreservação: uma ferramenta para conservação de recursos genéticos de videira. **Agropecuária Catarinense**, Florianópolis, v. 32, n. 2, p. 92-97, 2019.

CARDOSO, M.N.; DE ARAUJO, A.G.; DA SILVA, A.V.C.; DE OLIVEIRA, L.A.R.; & DA SILVA LÉDO, A. Influência de luz e sacarose no crescimento in vitro de mandioca. **Nucleus**, Ituverava, v. 15, n. 1, p. 85 a 93, 2018.

CEBALLOS, H.; HERSHEY, C.H. Cassava (*Manihot esculenta Crantz*). In Genetic Improvement of Tropical Crops. Springer, Cham. Springer International Publishing AG, Part of Springer **Nature**, p. 129-180, 2017.

CHAROENSUB, R. PHANSIRI, S. YONGMANITICHAI, W. SAKAI, A. Routine cryopreservation of in vitro-grown axillary apices of cassava (*Manihot esculenta Crantz*) by vitrification: importance of a simple mononodal culture. **Scientia Horticulturae**, v. 98, n. 4, p. 485-492, 2003.

COPELAND, K.K. **Estudos fisiológicos e bioquímicos para criopreservação de embriões zigóticos de Coqueiro Anão Verde de Jiqui do Brasil**. 2010. 52f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Curso de Pós-graduação em Biotecnologia em Recursos Naturais, Universidade Federal de Sergipe.

DIANTINA, S.; EFENDI, D.; MARISKA, I. Response of two cassava accessions on vitrification and modification of vitrification techniques. **AIP Conference Proceedings**, p. 020057, 2016.

DUMET, D.; DIEBIRU, E.; ADEYEMI, A.; AKINYEMI, O.; GUEYE, B.; & FRANCO, J. Cryopreservation for the 'in perpetuity' conservation of yam and cassava genetic resources. **CryoLetters**, v 34, n. 1, p. 107-118, 2013.

FERREIRA, D.F. Sisvar: A computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras. v. 35, n. 6, p. 1039- 1042, dez. 2014.

GONZALEZ-ARNAO, M.T.; ENGELMANN, F. **Crioconservation de plantas en America Latina y el Caribe**. San Jose: Caribe, IICA, 2013.

GONZALEZ-ARNAO, M.T. PANTA, A; ROCCA, W.M.; ESCOBAR, R.H.; ENGELMANN, F. Development and large scale application of cryopreservation techniques for shoot and somatic embryo cultures of tropical crops. **Plant Cell Tissue Organic Culture**, v. 92, n. 1 p. 1-13, 2008.

HEGDE, V.; MAKESHKUMAR, T.; SHEELA, M.N.; CHANDRA, Visalakshi, C.; KOUNDINYA, A.V.V.; ANIL, S.R.; MUTHURAJ, R; DARSHAN, S. Production of synthetic seed in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Journal of Root Crops**, v. 42, n. 2, p. 5-9, 2017.

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

SAKAI, A.; MATSUMOTO, T.; HIRAI, D.; CHAROENSUB, R. Sobrevivência de ápices tropicais resfriados a -196 C por vitrificação. In: **Resistência ao frio da planta**. Springer, Boston, MA, 2002. p. 109-119.

SAKAI, A.; HIRAI, D.; NIINO, T. Development of PVS-Based Vitrification and Encapsulation-Vitrification Protocols. *Plant Cryopreservation: A Practical Guide*. New York, NY: Springer, 2008. Cap. 3, p. 33-57.

SAKAI, A.; ENGELMANN, F. Vitrification, encapsulation-vitrification and droplet-vitrification: a review. **CryoLetters**, v 28, n. 3, p. 151-172, 2007.

SANTOS, I.R.; SALOMÃO, A.N.; **Criopreservação de germoplasma vegetal**. Recursos genéticos vegetais, Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, p. 545-573, 2007.

SANTOS, I.R.I.; SALOMAO, A.N.; MUNDIM, R.C. Avaliação da tolerância de ápices caulinares de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) à criopreservação. **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia-Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento (INFOTECA-E)**, 2015.