

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS
CURSO DE MESTRADO**

**MULTIPLICAÇÃO E CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DE
ESPÉCIES SILVESTRES DE *Manihot***

Deyse Maria de Souza Silveira

**CRUZ DAS ALMAS – BAHIA
2017**

**MULTIPLICAÇÃO E CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DE ESPÉCIES
SILVESTRES DE *Manihot***

Deyse Maria de Souza Silveira
Licenciatura em Biologia
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2015

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Recursos Genéticos Vegetais.

Orientador: Dr. Carlos Alberto da Silva Ledo
Coorientadora: Dra. Mariane de Jesus da Silva de Carvalho

**CRUZ DAS ALMAS – BAHIA
2017**

FICHA CATALOGRÁFICA

S587m	<p>Silveira, Deyse Maria de Souza. Multiplicação e conservação <i>in vitro</i> de espécies silvestres de manihot / Deyse Maria de Souza Silveira. – Cruz das Almas, BA, 2017. 70f.; il.</p> <p>Orientador: Carlos Alberto da Silva Ledo. Coorientadora: Mariane de Jesus da Silva de Carvalho.</p> <p>Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas.</p> <p>1.Mandioca – Propagação <i>in vitro</i>. 2.Mandioca – Reguladores de crescimento. I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II.Título.</p> <p>CDD: 633.682</p>
-------	--

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS
CURSO DE MESTRADO**

**MULTIPLICAÇÃO E CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DE ESPÉCIES
SILVESTRES DE *Manihot***

Comissão Examinadora da Defesa de Dissertação de
Deyse Maria de Souza Silveira

Aprovado em: de de 2017

Prof. Dr. Carlos Alberto da Silva Ledo
Embrapa Mandioca e Fruticultura
Orientador

Prof.^a Dr.^a. Ana Cristina Vello Loyola Dantas
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia

Dr.^a. Cristina Ferreira Nepomuceno
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia

DEDICATÓRIA

A Deus, aquele que soprou em mim o fôlego da vida, dedico essa conquista... A glória é dEle!

AGRADECIMENTOS

Dirijo minha maior gratidão a Deus, motivação primária para que todas as coisas aconteçam em minha vida. Ele permitiu que eu iniciasse e concluísse essa etapa com serenidade, e colocou em meu caminho diversas pessoas que generosamente se dispuseram a me auxiliar.

A realização desta dissertação foi possível em virtude das contribuições que recebi. Por isso, agradeço com carinho ao meu orientador, Dr. Carlos Alberto da Silva Ledo, pela confiança debitada em mim e pelos pareceres científicos emitidos ao longo dessa jornada, e à minha coorientadora, Dra. Mariane de Jesus da Silva de Carvalho, por toda preocupação e empenho em me auxiliar; sua colaboração foi fundamental!

Agradeço também à toda equipe do Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Mandioca e Fruticultura: Karen, Honorato, Fabrine, Maria Inês, Renata, João, Lucas, Maiara e Priscila, que me acolheram e me ajudaram em todas as oportunidades.

Faço uma menção especial ao Dr. Antônio da Silva Souza, que com sua gentileza e profissionalismo sempre compartilhou seu conhecimento e se dispôs a sanar minhas dúvidas por mais simples que fossem, com a mesma paciência. Obrigada por me acompanhar desde a graduação e, diante de tudo que vivenciei ao longo desses anos, digo-lhe com toda convicção: sua conduta me inspira!

Aos meus colegas do mestrado em Recursos Genéticos Vegetais, turma 2015.1, particularmente à Izabel Nunes, agradeço-lhes por contribuírem com a construção deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

Agradeço afetosamente aos meus pais, Maria de Fátima e Marivaldo Marques, por todo amor, apoio e por não medirem esforços para que eu cumprisse essa etapa. Ao meu irmão, Kleiton Silveira, por me estabilizar com sua fé e mansidão; às irmãs com as quais a vida me presenteou, Mariana Bertino e Naara Barbosa, por todo carinho e incentivo, e ao meu primo Antônio Leandro, pela ajuda valiosa que me prestou.

Por fim, agradeço ao meu primeiro orientador da graduação, Elinsmar Vitória Adorno (*in memoriam*), que exerceu a docência com excelência. Seus ensinamentos foram muito além da sala de aula e guardo comigo a alegria com a qual enxergava a vida, independente das circunstâncias.

MULTIPLICAÇÃO E CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DE ESPÉCIES SILVESTRES DE *Manihot*

RESUMO:

As espécies silvestres de *Manihot* apresentam uma grande relevância aos programas de melhoramento genético da espécie cultivada, *M. esculenta* Crantz, uma vez que muitas delas dispõem de melhor qualidade nutricional, tolerância às condições ambientais adversas, assim como resistência a diversas pragas e doenças que acometem a cultura da mandioca. Todavia, essas espécies demonstram resistência à propagação, tanto sexuada quanto assexuadamente. Uma solução pertinente a esse impasse consiste na aplicação de técnicas de propagação *in vitro*, método que baseia-se na multiplicação de plantas utilizando um meio de cultura nutritivo manipulável, as quais são mantidas em ambiente controlado, sob condições assépticas. Além disso, as espécies podem ser conservadas *in vitro*, em condições de crescimento mínimo, mantendo-se cópias de segurança em laboratório por longos períodos, sem a necessidade frequente de realizar subcultivos. Nessa perspectiva, esse trabalho teve como objetivo contribuir para adequação de protocolos de multiplicação e conservação *in vitro* às espécies silvestres de *Manihot*. Para tanto, nos experimentos de multiplicação *in vitro*, o meio de cultura básico utilizado foi composto pelos sais minerais e vitaminas do MS, suplementado com 25 combinações entre cinco concentrações de benzilaminopurina - BAP e do ácido naftalenoacético - ANA, ambos reguladores a 0 mg L⁻¹; 0,025 mg L⁻¹; 0,05 mg L⁻¹; 0,075 mg L⁻¹ e 0,1 mg L⁻¹. Nos experimentos de conservação *in vitro*, o meio de cultura 8S foi utilizado como meio básico, variando sua composição com o acréscimo de 25 combinações entre cinco concentrações de paclobutrazol - PBZ (0 mg L⁻¹; 0,10 mg L⁻¹; 0,20 mg L⁻¹; 0,30 mg L⁻¹ e 0,40 mg L⁻¹) e de sacarose (0 g L⁻¹, 5 g L⁻¹, 10 g L⁻¹, 15 g L⁻¹ e 20 g L⁻¹). Quanto aos resultados nos experimentos de multiplicação *in vitro*, a espécie *M. violaceae* (Pohl) Müll. Arg. demonstrou-se mais responsiva ao meio MS acrescido de 0,05 mg L⁻¹ de ANA, na ausência de BAP. As melhores respostas para a espécie *M. flabellifolia* Pohl foram observadas na dose de 0,025 mg L⁻¹ de ANA, também na ausência de BAP. Já para *M. pseudoglaziovii* Pax & Hoffman, *M. chlorosticta* Standl. & Goldman e *M. pentaphylla* Pohl) os melhores resultados foram obtidos na ausência desses fitorreguladores. Nos experimentos de conservação *in vitro*, cujo objetivo principal é reduzir a taxa de crescimento das plantas, a interação das doses de 0,1 mg L⁻¹ de PBZ e de 5 g L⁻¹ de sacarose revelou um efeito expressivo para a espécie *M. pseudoglaziovii* Pax & Hoffman); para a *M. violacea* (Pohl) Müll. Arg., a concentração de 10 g L⁻¹ de sacarose e 0,2 mg L⁻¹ de PBZ em meio 8S apresentou melhores respostas. A espécie *M. chlorosticta* Standl. & Goldman demonstrou melhor comportamento quando submetida ao tratamento de 0,3 mg L⁻¹ de PBZ e omissão da sacarose. Para os genótipos *M. flabellifolia* Pohl e *M. tristis* Müll. Arg. as concentrações utilizadas de sacarose e de PBZ não se mostraram eficientes para conservação *in vitro*.

Palavras chave: Cultura de tecidos, Fitorreguladores, Mandioca

MICROPROPAGATION AND CONSERVATION *IN VITRO* FOR WILD SPECIES OF *Manihot*

ABSTRACT:

Wild species of *Manihot* show several relevance for the genetic improvement programs of *M. esculenta* Crantz, many of them present a better nutritional quality, tolerance to the adverse environmental conditions, as well as, resistance to so many pests and diseases that affect cassava. However, these species show resistance to propagation, sexually and asexually. A pertinente solution to this impasse consists on the application of *in vitro* propagation techniques, which method is based on the multiplication of plants using a manipulable nutrient culture medium, which are kept under controlled conditions under aseptic conditions. Moreover, species can be conserved *in vitro* under minimal growth conditions, and laboratory copies are maintained for a long time and doesn't need frequent subcultures. In this perspective, this work aims to contribute to the adequacy of *in vitro multiplication* protocols and *in vitro* conservation to the wild species of *Manihot*. *In vitro* multiplication experiments, the alkaline cultivation media used was composed of the minerals and vitamins of the MS, supplemented with 25 combinations between five concentrations of benzylaminopurine - BAP and naphthaleneacetic acid - ANA, both regulators at 0 mg L⁻¹; 0.025 mg L⁻¹; 0.05 mg L⁻¹; 0.075 mg L⁻¹ and 0.1 g L⁻¹. In the *in vitro* preservation experiments, the 8S cultivation media was used as a alkaline one, varying its composition with the addition of 25 combinations between five concentrations of paclobutrazol-PBZ (0 mg L⁻¹, 0.10 mg L⁻¹, 0.20 mg L⁻¹, 0.30 mg L⁻¹ and 0.40 mg L⁻¹) and sucrose (0 g L⁻¹, 5 g L⁻¹, 10 g L⁻¹, 15 g L⁻¹ and 20 g L⁻¹). Regarding the results in the *in vitro* multiplication experiments, the species *M. violaceae* (Pohl) Müll. Arg. Was shown to be more responsive to the MS medium plus 0.05 mg L⁻¹ of ANA in the absence of BAP. The best responses for the *M. flabellifolia* Pohl species were observed at the 0.025 mg L⁻¹ dose of ANA, also in the absence of BAP. Already for *M. pseudoglaziovii* Pax & Hoffman, *M. chlorosticta* Standl. & Goldman and *M. pentaphylla* Pohl) the best results were obtained in the absence of these phyto regulators. The *in vitro* conservation experiments, whose main aim is to reduce the growth rate of plants, the interaction of the 0.1 mg L⁻¹ doses of PBZ and 5 g L⁻¹ of sucrose revealed an expressive effect for the species *M. Pseudoglasiovii* Pax & Hoffman); For *M. violacea* (Pohl) Müll. Arg., The concentration of 10 g L⁻¹ of sucrose and 0.2 mg L⁻¹ of PBZ in 8S cultivation media showed better results. The species *M. chlorosticta* Standl. & Goldman demonstrated better responses when submitted to treatment of 0.3 mg L⁻¹ of PBZ and omission of sucrose. For the genotypes *M. flabellifolia* Pohl and *M. tristis* Müll. Arg. Sucrose concentrations and PBZ used were not efficient for *in vitro* conservation.

KeyWords: Tissue culture, Phyto regulators, *Manihot*

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	9
Capítulo I MULTIPLICAÇÃO <i>IN VITRO</i> ESPÉCIES SILVESTRES DE <i>Manihot</i>	23
Capítulo II CONSERVAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE ESPÉCIES SILVESTRES DE <i>Manihot</i>	47
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	69

INTRODUÇÃO GERAL

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é uma planta originária da América do Sul, cujo centro de origem, diversidade e domesticação mais provável é Brasil (OLSEN, 2004). Atualmente é uma espécie cultivada em muitos países, destacando-se como uma das culturas alimentares mais expressivas em diversas regiões, sendo utilizada não somente na alimentação humana, mas também animal (SUÁREZ; MEDEROS, 2011). A Nigéria, Brasil, Tailândia, Indonésia e a República Democrática do Congo são os cinco principais países produtores dessa cultura, que em conjunto representam 63% do total mundial, com produção anual de 268.277.743 de toneladas de raízes frescas, destas o Brasil foi responsável pela produção de 23.253.514 de toneladas (FAOSTAT, 2014).

De acordo com a hierarquia sistemática, a *M. esculenta* Crantz pertence à classe das Dicotiledôneas, subclasse Archiclamydea, ordem Euphorbiales, família Euphorbiaceae, tribo Manihoteae e gênero *Manihot*, o qual agrupa aproximadamente 100 espécies (ALVES, 2002), sendo que cerca de 68 delas são encontradas no Brasil. Possivelmente a *M. esculenta* Crantz evoluiu como uma espécie cultivada, mediante hibridação natural e seleção realizada principalmente pelo homem, através da propagação de plantas que eram mais palatáveis e apresentavam maior produtividade, já que essa espécie não é encontrada sob a forma silvestre (HERSHEY, 1988).

Baseado nos estudos realizados por Carvalho e Schaal (2001), a *M. flabellifolia* Pohl é considerada o ancestral selvagem mais próximo da mandioca, única espécie comercialmente cultivada (CEBALLOS, 2002). O valor econômico da *M. esculenta* Crantz está relacionado principalmente às suas raízes, reconhecidas pela capacidade de armazenar quantidades elevadas de amido, que lhe conferem um importante valor nutricional, embora as folhas e hastes também sejam consumidas e constituírem uma expressiva fonte de proteínas, vitaminas e minerais. Além da sua utilização na alimentação humana, a mandioca ainda é utilizada na produção de etanol para combustível e na alimentação animal. Sua potencialidade comercial e facilidade de cultivo fazem com que seja uma cultura de grande interesse para agricultores de subsistência e sua capacidade de propagação vegetativa a torna também ideal para melhoria mediante a engenharia genética.

Hábito de crescimento e descrição morfológica

A mandioca é um arbusto de crescimento perene, que pode alcançar de 1 m a 2 m de altura; todavia, algumas cultivares podem chegar a 4 m. Suas características morfológicas são altamente variáveis, indicando um alto grau de hibridação interespecífica (ALVES, 2002).

O caule é especialmente relevante dentro dessa cultura, em razão da sua utilização na propagação vegetativa via estacas ou manivas, segmentos retirados dessa parte da planta que apresentam um formato cilíndrico, com diâmetro que oscila entre 2 cm e 6 cm nas plantas em estágio adulto (CÂMARA; GODOY, 1998), podendo ser encontrados em três colorações principais: cinza-prata, roxo e amarelo esverdeado. O caule é subarborescente, variando, de acordo com o genótipo, entre monopodial de porte ereto e simpodial de porte ramificado, com duas, três ou quatro hastes (CARVALHO; FUKUDA, 2006).

O número total de folhas, sua capacidade fotossintética e sua longevidade são características variáveis determinadas principalmente pelas condições ambientais. Em períodos de seca, as folhas tendem a sofrer abscisão e redução da atividade fotossintética como mecanismo de defesa, com o propósito de evitar a transpiração demasiada em condições de *déficit* hídrico (COELHO FILHO et al., 2009). As folhas são simples e inseridas no caule em disposição alterna-espirlada, longamente pecioladas e lobadas com três, cinco, sete ou mais lobos, que variam também de cor, do verde claro até o roxo, e formatos, destacando-se espatulados lanceolados e oblongos (CARVALHO, 2006). A face inferior das folhas é caracterizada por uma epiderme cerosa, que lhe confere uma aparência brilhante. Os estômatos se localizam principalmente na superfície inferior da folha, todavia funcionais em ambos lados, apesar de serem maiores na superfície superior da folha (CERQUEIRA, 1992).

A mandioca é uma espécie monoica e, portanto, apresenta flores masculinas e flores femininas, ambas dispostas na mesma inflorescência, de curta duração, sendo que as flores femininas têm seu amadurecimento de 1 a 2 semanas antes das flores masculinas e, conseqüentemente, são propensas à polinização cruzada, o que pode explicar o elevado nível de heteroziguidade na mandioca (ALVES, 2002).

O fruto da mandioca é uma cápsula globulosa, de cor marrom-acinzentada, rugosa, com aproximadamente 15 mm de diâmetro (TOLEDO, 1963). Uma vez polinizada, a flor feminina inicia sua formação a partir do ovário e o processo de

amadurecimento é concluído entre 3 e 5 meses, dando assim origem a uma cápsula com três sementes, que se abre por seis valvas quando alcançam seu estágio final (seco) (CARVALHO, 2006).

A semente é o meio de reprodução sexual da planta, mediante a qual podem ser produzidas novas cultivares geneticamente superiores. A semente é ovoide ou elipsoide, mede aproximadamente 1 cm de comprimento, 6 mm de largura e 4 mm de espessura, pigmentada com manchas marrons ou lisas (ALBUQUERQUE, 2008). O endosperma tem a função de proteger e nutrir o embrião, localizado em área central da semente, sendo rico em substâncias de reserva, principalmente óleos. No seu interior estão os cotilédones e o eixo embrionário, que dão origem à nova planta após a germinação da semente (TOLEDO, 1963).

As raízes da mandioca são reconhecidas por serem especialmente energéticas devido a sua grande capacidade de armazenamento de carboidratos. Além disso, também dispõem, em menor quantidade, de proteínas, vitaminas, minerais e fibra (ALMEIDA; FERREIRA FILHO, 2005). Sua coloração, forma, comprimento, diâmetro, peso, profundidade, teores de carboidratos, de amido, de proteínas, de açúcares e de fibras variam amplamente entre os genótipos. Nas plantas provenientes da reprodução sexuada nota-se a presença de raízes axiais tuberosas e frequentemente observa-se a formação de raízes secundárias feculentas. Nas plantas oriundas de propagação assexuada ocorre o modelo pseudo-fasciculado tuberoso, com raízes ricas em amido. Além das raízes tuberosas, existe um raizame fibroso responsável pela absorção de água e nutrientes e pela fixação da planta (CARVALHO, 2006).

Importância alimentar da mandioca

Um dos maiores benefícios do consumo da mandioca à população reside na sua eficiência no fornecimento de energia, em razão do elevado teor de carboidratos que a compõe, tornando-a um dos alimentos predominantes na dieta de um bilhão de pessoas, principalmente em países em desenvolvimento (AGUIAR et al., 2013).

As raízes constituem a parte da planta mais consumida, são ricas em carboidratos, principalmente amido, composto de amilose e amilopectina (BUIRAGO, 1990), dispendo de alto valor energético. Sua limitação nutricional, porém, está relacionada ao baixo teor e qualidade de proteínas, vitaminas e minerais. Entretanto, a parte aérea (hastes e folhas) representa uma importante fonte de

proteínas, além de vitaminas como A, C e do complexo B, e minerais, especialmente cálcio e ferro (ALMEIDA; FERREIRA FILHO, 2005).

Para consumo animal, as hastes e folhas servem de matéria prima na preparação de fenos e silagens, e as raízes podem ser utilizadas *in natura*, cozidas ou desidratadas como farinhas ou em raspas (CHICHERCHIO, 2013). Na alimentação humana, as folhas são consumidas na forma de farinha ou na preparação de alimentos típicos das regiões Norte e Nordeste do Brasil, como a maniçoba. Já as raízes são tradicionalmente consumidas cozidas, fritas e também comumente utilizadas em bolos, biscoitos, pães, tortas, entre outras preparações.

Mandioca e toxidade

Um dos critérios que indicam a forma de utilização das raízes de mandioca é o teor de ácido cianídrico (HCN). As variedades de mandioca são popularmente classificadas, de acordo com sua toxidade, em bravas e mansas, baseando-se na quantidade encontrada de glicosídeos cianogênicos, que, com exceção das sementes, estão presentes em todos os órgãos de mandioca (CALATAYUD; MÚNERA, 2002). As cultivares que possuem menos de 50 mg kg⁻¹ de HCN, na matéria fresca da raiz, são consideradas inócuas, as que apresentam de 50 mg kg⁻¹ a 100 mg kg⁻¹ são classificadas como moderadamente venenosas e as venenosas possuem acima de 100 mg kg⁻¹ (LORENZI et al., 1993). O glicosídeo cianogênico mais comum é a linamarina (95%), produzida na folha e transportada para as raízes (SIRITUNGA; SAYRE, 2003). Sua hidrólise, pela enzima linamarase, leva à liberação do ácido cianídrico, responsável pela toxidade (COOKE; COURSEY, 1981), que atua, possivelmente, como um mecanismo de defesa da planta contra o ataque de pragas e outros patógenos (BENEVIDES et al., 2011).

As variedade que apresentam baixo teor de HCN não apresentam risco de intoxicação. Logo, podem ser consumidas *in natura*, enquanto as que possuem um alto teor, mas abaixo da dose letal, de 10 mg HCN kg de peso vivo⁻¹ (FAO/WHO, 1991), podem ser consumidas após submetidas a algum tipo de processo detoxificante, no qual o cianeto é convertido em tiocianato, que é excretado facilmente pela urina (CEREDA; LOPES, 2003).

Em conformidade com Amorim et al. (2006), existem diversos métodos para detoxificar o material cianogênico, como a fenação, a prensagem, a trituração, o aquecimento, o cozimento, a fermentação e a desidratação.

Restrições à cultura da mandioca

Apesar da ampla adaptabilidade às condições adversas de cultivo, a mandioca apresenta fatores limitantes que podem provocar redução significativa no desenvolvimento, que incluem o ataque de pragas, doenças, ervas daninhas e outros fatores agronômicos. Desse modo, torna-se fundamental a compreensão dessas restrições, a fim de eliminá-las ou contê-las. De acordo com os estudos de Carvalho et al. (2015), as pragas mais comuns que acometem essa cultura incluem a mosca-branca (*Aleurothrixus aepim*), o mandarová (*Erinnyis ello* L.), o percevejo-de-renda (*Vatiga* sp.), as brocas-da-haste (*Sternocoelus* spp.), a cochonilha da mandioca aérea (*Phenacoccus manihoti* Matile-Ferrero), além de doenças como a podridão radicular, a antracnose, a bacteriose, o superalongamento, o superbrotamento e as viroses mosaico das nervuras, couro de sapo e mosaico comum (CALVERT; THRESH, 2002).

A cultura da mandioca apresenta grande vulnerabilidade à competição com ervas daninhas, que podem ser responsáveis por perdas de até 90% na produção de raízes (MATTOS; CARDOSO, 2003). Alguns fatores agronômicos também afetam a produtividade da mandioca, como a temperatura do solo, consideradas favoráveis entre 28 °C e 30 °C, enquanto superiores a 37 °C e inferiores a 17 °C podem se tornar prejudiciais (EL-SHAKAWY, 2004). O déficit hídrico, principalmente durante os meses iniciais após o plantio, provoca perdas, bem como solos mal drenados, pois a umidade excessiva pode culminar na podridão das raízes (GOMES; LEAL, 2003).

Reprodução da mandioca

A mandioca pode ser propagada em condições naturais por sementes, o que possibilita a ocorrência de maior variabilidade (REIFSCHNEIDER et al., 2014), fator favorável aos programas de melhoramento genético. Todavia, o método mais utilizado é a estaquia (ALVES, 2002), onde se utilizam segmentos do caule, denominados manivas-sementes ou estacas, contendo de 5 a 7 gemas (SILVA et al., 2009). Essa técnica, além de reduzir o tempo de estabelecimento da planta em relação à propagação sexuada, apresenta como maior benefício a manutenção das

características morfológicas e agronômicas da planta original (FUKUDA; CARVALHO, 2006).

Contudo, apesar dessas vantagens, as manivas são facilmente infectadas, tornando as plantas vulneráveis à doenças, além de apresentarem uma baixa taxa de multiplicação, tendo em vista que de cada planta adulta podem ser extraídas entre 5 e 10 manivas, no período de um ano (SANTOS et al., 2009). Uma alternativa à esse entrave é a propagação vegetativa *in vitro*, considerando que essa técnica possibilita a produção de um grande número de mudas idênticas à planta matriz e, a depender do método utilizado, livres de patógenos (MABANZA et al., 1994); além disso, pode ser realizada independentemente da estação do ano.

Espécies silvestres de *Manihot*

Em virtude do seu potencial como fontes de genes de resistência à diversas doenças e pragas, elevada qualidade nutricional e tolerância a diferentes estresses abióticos comuns à cultura da *M. esculenta* Crantz (NASSAR, 2006), as espécies selvagens de *Manihot* instituem-se como um recurso expressivo aos programas de melhoramento genético da espécie cultivada.

Diversos estudos baseados em observações de campo indicam que um grande número de espécies do gênero *Manihot* apresentam características que podem oferecer genes de interesse ao melhoramento da mandioca. Entre elas destacam-se: a *M. pringlei* S. Watson, com baixo teor de cianeto (GOMEZ et al., 1984); a *M. glaziovii* Müll. Arg., resistente ao vírus do mosaico africano e à cochonilha da mandioca (*Phenacoccus manihoti* Matile-Ferrero) (JENNINGS, 1976).

De acordo com os estudos realizados por NASSAR (2003), a *M. dichotoma* Ule também é resistente à cochonilha da mandioca; a *M. paviaefolia* Pohl é tolerante à toxicidade do solo; a *M. pruinosa* Pohl possui baixo teor de CNH e a *M. tripartita* Müll. Arg. é resistente ao vírus do mosaico africano; já a *M. nana* Müll. Arg. é uma fonte útil para a geração de mandioca de estatura baixa, enquanto a *M. anomala* Pohl apresenta adaptabilidade à sombra e lugares encharcados.

A espécie *M. pseudoglaziovii* Pax & K. Hoffm. é resistente à bacteriose da mandioca (CHÁVEZ et al., 1989) e adaptada às condições de seca; a *M. neusana* Nassar e a *M. grahamii* Hook expressam altos níveis de resistência à broca da haste da mandioca (*Sternocoelus* spp.) (CHÁVEZ, 1990); a *M. tritis* Müll. Arg. e a *M.*

angustifolia Pohl ex Steud dispõem de alto teor de amido (SHEELA et al., 2008). Segundo Carabalí et al. (2010), a *M. tristis* Müll. Arg. também apresenta resistência à mosca branca [*Aleurothrixus aepim* (Goeldi, 1886)] e ao ácaro verde [*Mononychellus tanajoa* (Bondar, 1938)].

A *M. flabellifolia* Pohl contém um elevado teor de proteínas e resistência à mosca branca (AKINBO et al., 2012); em genótipos de *M. oligantha* Pax & K. Hoffm. foram identificados altos teores de proteínas combinadas com um nível muito baixo de HCN, além de apresentarem altos teores de amido e de luteína, e tolerância ao frio (NASSAR et al., 2007).

Outras espécies apresentam grande adaptação a baixas temperaturas, como a *M. attenuata* Müll. Arg., a *M. rubricaulis* I. M. Johnst e a *M. grahamii* Hook (CHÁVEZ, 1990); a *M. pentaphylla* Pohl se adapta bem em solos ricos em cálcio (NASSAR, 2003). a *M. tripartita* (Spreng.) Müll. Arg. apresenta raízes grandes e bem adaptadas aos períodos de seca (NASSAR, 1978). *M. chlorosticta* Standl. & Goldman e *M. pentaphylla* Pohl demonstraram adaptação a solos alcalinos, e *M. violacea* (Pohl) Müll. Arg. a solos com baixa retenção de água (NASSAR, 1979). Por fim, a *M. dichotoma* Ule é uma espécie que apresenta alta produção de raízes (NASSAR et al., 2004).

Desenvolvimentos biotecnológicos

A mandioca é uma cultura que apresenta uma série de atributos promissores, principalmente no que se refere às propriedades nutricionais e facilidade de cultivo. Tendo em vista sua importância econômica e social, um grande interesse em utilizar a biotecnologia em prol dessa cultura está se intensificando cada vez mais. Os programas de melhoramento genético dessa espécie se destinam a solucionar as limitações existentes, de modo a contribuir para o desenvolvimento de variedades mais produtivas e ricas nutricionalmente, além de resistentes a doenças e pragas, e tolerantes às condições adversas de cultivo.

Nessa perspectiva, diversos trabalhos de melhoramento genético foram e têm sido realizados envolvendo espécies silvestres de *Manihot*, considerando que essas constituem valiosos reservatórios genéticos de resistência aos principais estresses bióticos e abióticos que acometem a cultura da mandioca. Além disso, as barreiras a cruzamentos entre espécies desse gênero são frágeis ou praticamente inexistentes,

viabilizando sua utilização no melhoramento de *M. esculenta* Crantz (FUKUDA; PORTO, 1991).

Contudo, diferentemente da espécie cultivada, que pode ser multiplicada por sementes e de forma vegetativa, as espécies silvestres de *Manihot* geralmente apresentam resistência à propagação por qualquer sistema. A biotecnologia também tem atuado a esse favor, mediante o uso de técnicas de cultura de tecidos *in vitro*, baseadas em sistemas de propagação que utilizam meios de cultura nutritivos de composições reguláveis, permitindo sua manipulação de modo a ajustar-se à condições que confirmam um desenvolvimento adequado às plantas. Além disso, esses métodos de propagação apresentam outra vantagem. Visto que, em campo, as plantas estão sujeitas ao ataque de pragas e de doenças, e a alterações ambientais que podem levar à perda de acessos, esse risco é reduzido quando elas são mantidas sob condições controladas em laboratório.

Banco de germoplasma de Mandioca

O maior banco de germoplasma de *Manihot* do Brasil está localizado na Embrapa Mandioca e Fruticultura, onde diversos genótipos de mandioca que são mantidas em campo, possuem cópias de segurança em coleções *in vitro*, minimizando desse modo, o risco de perda por diversos fatores bióticos e abióticos. Para este fim, os acessos são mantidos no Laboratório de Cultura de Tecidos, em sala de conservação de germoplasma com temperatura de $22 \pm 1^{\circ}\text{C}$ e um fotoperíodo de 12 horas com intensidade luminosa de $20 \mu\text{mol.m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Atualmente a coleção *in vitro* de *Manihot esculenta* Crantz dispõe de 248 acessos oriundos de diversas regiões do Brasil e 74 acessos oriundos do exterior (Venezuela; Nigéria, Colômbia). Já a coleção de espécies silvestres de *Manihot* possui 55 acessos, todos oriundos do CIAT (International Center for Tropical Agriculture).

Limitações do cultivo *in vitro* das espécies silvestres de *Manihot*

Apesar do potencial das espécies silvestres de *Manihot* ao melhoramento da *Manihot esculenta* Crantz e da sua resistência a qualquer sistema de propagação vegetativa, ainda existem poucos estudos dedicados ao aprimoramentos dos métodos de conservação e multiplicação *in vitro* dessas espécies, tornando-se evidente a necessidade da adequação de metodologias dessas práticas de cultura de tecidos,

que sanem essas restrições e permitam a multiplicação rápida e a conservação do germoplasma, de modo a contribuir para a preservação e a inclusão de espécies silvestres em programas de melhoramento genético da mandioca.

Diante do exposto, este trabalho teve como objetivo contribuir com aperfeiçoamento das estratégias de multiplicação *in vitro*, considerando-as como uma ferramenta que possibilita a produção em grande escala de mudas, em curto período e em reduzido espaço físico, tornando-as prontamente disponíveis para os melhoristas. Adicionalmente, o aprimoramento de técnicas de conservação *in vitro* do germoplasma, sob condições de crescimento mínimo, como meio de manter os acessos em condição de segurança por mais tempo, sem a necessidade frequente de realizar subcultivos.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, J. L. P. de; SOUZA, T. C. R. de; LÔBO, C. F. A importância da mandioca. In: FIALHO, J. de F.; VIEIRA, E. A. (ed.). **Mandioca no Cerrado**: orientações técnicas. 2. ed. rev. e ampl. Brasília, DF: Embrapa, 2013. p. 14-26.
- AKINBO, O.; LABUSCHAGNE, M. T.; MARÍN, J.; OSPINA, C.; SANTOS, L.; BARRERA, E.; GUTIÉRREZ, J.; EWA, F.; OKOGBENIN, E.; FREGENE, M. QTL analysis for root protein in a backcross family of cassava derived from *Manihot esculenta* ssp. *flabellifolia*. **Tropical Plant Biology**, v. 5, n. 2, p. 161-172, 2012.
- ALBUQUERQUE, A. S. **Mandioca para farinha**: aspectos históricos, etimológicos e morfoanatômicos. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2008. 17 p., (Embrapa Amazônia Oriental. Documentos, 325).
- ALMEIDA, J. de; FERREIRA FILHO, J. R. Mandioca: uma boa alternativa para alimentação animal. **Bahia Agrícola**, v. 7, n. 1, p. 50-56, 2005.
- ALVES, A. A. C. Cassava botany and physiology. In: HILLOCKS, R. J.; THRESH, J. M.; BELLOTTI, A. C. (ed.). **Cassava**: biology, production and utilization. Wallingford: CAB International, 2002. p. 67-89.
- AMORIM, S. L. de; MEDEIROS, R. M. T. de; RIET-CORREA, F. Intoxicações por plantas cianogênicas no Brasil. **Ciência Animal**, v. 16, n. 1, p. 17-26, 2006.
- BENEVIDES, C. M. de J.; SOUZA, M. V.; SOUZA, R. D. B.; LOPES, M. V. Fatores antinutricionais em alimentos: revisão. **Segurança Alimentar e Nutricional**, v. 18, n. 2, p. 67-79, 2011.
- BUITRAGO A., J. A. **La yuca en la alimentación animal**. Cali: CIAT, 1990. 446 p.
- CALATAYUD, P.-A.; MÚNERA, D. F. Defensas naturales de la yuca a las plagas e artrópodos. In: OSPINA, B. CEBALLOS, H. (ed.). **La yuca en el tercer milenio**: sistemas modernos de producción, procesamiento, utilización y comercialización. Cali: CIAT, 2002. p. 250-254.
- CALVERT, L. A.; THRESH, J. M. The viruses and virus diseases of cassava. In: HILLOCKS, R. J.; THRESH, J. M.; BELLOTTI, A.C. (ed.). **Cassava**: biology, production and utilization. Wallingford: CAB International, 2002. p. 237-260.
- CÂMARA, G. M. S.; GODOY, O. P. Desempenho vegetativo produtivo de cultivares de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) a partir de manivas com diferentes diâmetros. **Scientia Agricola**, v. 55, n. 2, p. 326-331, 1998.
- CARABALÍ, A.; BELLOTTI, A. C.; MONTOYA-LERMA, J.; FREGENE, M. Resistance to whitefly, *Aleurotrachelus socialis*, in wild populations of cassava, *Manihot tristis*. **Journal of Insect Science**, v. 10, n. 170, p. 1-10, 2010.

CARVALHO, J. E.; FUKUDA, W. M. G. Estrutura da planta e morfologia. In: SOUZA, L. DA S.; FARIAS, A. R. N.; MATTOS, P. L. P. de; FUKUDA, W. M. G. (ed.). **Aspectos socioeconômicos e agrônômicos da mandioca**. Cruz das Almas, BA: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2006. p. 126-137.

CARVALHO, L. J. C. B.; SCHAAL, B. A. Assessing genetic diversity in the cassava (*Manihot esculenta* Crantz) germplasm collecting in Brazil using PCR-based markers. **Euphytica**, v. 120, n. 1, p. 133-142, 2001.

CARVALHO, P. C. L. de. Classificação botânica. In: MATTOS, P. L. P. de; FARIAS, A. R. N.; FERREIRA FILHO, J. R. (ed.). **Mandioca: o produtor pergunta, a Embrapa responde**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2006. p. 15-23.

CARVALHO, R. da S.; RINGENBERG, R.; PIETROWSKI, V. **Guia para reconhecimento dos principais insetos, ácaros-praga e inimigos naturais da cultura da mandioca**. Brasília, DF: Embrapa, 2015. 63p.

CEBALLOS, H. La yuca em Colombia y el mundo: nuevas perspectivas para un cultivo milenario. In: OSPINA, B., CEBALLOS, H. (ed.). **La Yuca en el tercer milenio: sistemas modernos de producción, procesamiento, utilización y comercialización..** Cali: CIAT, 2002. p. 1-13.

CEREDA, M.; LOPES, A. M. Determinação do potencial de intoxicação em ratos, de linamarina extraída de mandioca. In: SEMINARIO LATINO AMERICANO DE CIENCIA DE ALIMENTOS, 5., 2003, Campinas, SP. **Anais...** Campinas: UNICAMP, 2003. p. 48.

CERQUEIRA, Y. M. Efeito da deficiência de água na anatomia foliar de cultivares de mandioca *Manihot esculenta* Crantz. I - Densidade estomática. **Sitientibus**, n. 10, p. 103-115, 1992.

CHÁVEZ, R.; REYES, R.; ROCA, W.M. *In vitro* culture for the conservation of wild *Manihot* species. In: MUJEEB-KAZI, A.; SITCH, L. A. (ed.). **Review of advances in plant biotechnology, 1985-88**. Mexico, DF: CIMMYT, 1989. p. 19-30.

CHÁVÉZ, R. **Especies silvestres de *Manihot*: un recurso valioso**. **Yuca Boletín Informativo**, v. 14, n. 1, p. 2-5, 1990.

CHICHERCHIO, C. L. S. Mandioca e principais derivados. In: CONAB. **Perspectivas para a agropecuária**. Brasília, DF, 2013. p. 1-154.

COELHO FILHO, M. A.; SILVA, T. S. M. da; GOMES JUNIOR, F. de A.; COELHO, E. F.; OLIVEIRA, V. V. M. de. **Crescimento e evapotranspiração da cultura da mandioca solteira e consorciada em condições irrigadas**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE AGROMETEOROLOGIA, 16., 2009, Belo Horizonte. Mudanças climáticas, recursos hídricos e energia para uma agricultura sustentável: [trabalhos

apresentados]. Viçosa, MG: UFV; Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2009. 1 CD-ROM.

COOKE, R. D.; COURSEY, D. G. Cassava: a major cyanide containing food crop. In: VENNESLAND, B.; CONN, E. E.; KNOWLES, C. J.; WISELY, J.; WISSING, F. (ed.). **Cyanide in biology**. New York: Academic Press, 1981. p. 93-114.

EL-SHARKAWY, M. A. Cassava biology and physiology. **Plant Molecular Biology**, v. 56, p. 481-501, 2004.

FAO - Food and Agriculture Organization. **Fao stat Database Gateway**. 2014. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx>>. Acesso em: 06 dez. 2016.

FAO - Food and Agriculture Organization - World Health Organization (FAO/WHO). **FAO/W HO Food Standards Programme, Codex Alimentarius Commission**, XII, Supplement 4. FAO/W HO, Rome, 1991.

FUKUDA, W. M. G.; CARVALHO, H. W. L. de. **Propagação rápida de mandioca no Nordeste brasileiro**. Cruz das Almas, BA: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2006. 6 p. (Embrapa Mandioca e Fruticultura. Circular Técnica, 45).

FUKUDA, W. M. G.; PORTO, M. C. M. A mandioca no Brasil. In: HERSHEY, C. H. (ed.). **Mejoramiento genético de la yuca en América Latina**, Cali: CIAT, 1991. p. 15-42,

GÓMEZ, G.; VALDIVIESO, M.; ZAPATA, L.E.; PARDO, C. Technical note: cyanide elimination, chemical composition and evaluation in bread making of oven dried cassava peeled root chips or slices. **Journal of Food Technology**, v. 19, p. 493-498, 1984.

GOMES, J. C.; LEAL, E. C. **Cultivo da mandioca para a Região dos Tabuleiros Costeiros**. Cruz das Almas, BA: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2003. (Embrapa Mandioca e Fruticultura. Sistemas de Produção, 11). Disponível em: <https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Mandioca/mandioca_tabcosteiros/plantio.htm>. Acesso em: 11 jan. 2017.

HERSHEY, C. H. Cassava breeding. CIAT Headgunters. In: HOWELER, R. H.; KAWANO, K. (ed.). **Cassava breeding and agronomy research in Asia**. Proceedings of a workshop held in Thailand, 1987. Cali: CIAT, 1988. p. 99-116.

JENNINGS, D. L. Breeding for resistance to African cassava mosaic disease: progress and prospects. In: NESTEL, B. L. (ed.). **African cassava mosaic**. Report of an interdisciplinary workshop held at Muguga, Kenya. Ottawa: International Development Research Centre, 1976. p.39-44.

LORENZI, J. O.; RAMOS, M. T. B.; MONTEIRO, D. A.; VALLE, T. L.; GODOY JÚNIOR, G.G. Teor de ácido cianídrico em variedades de mandioca cultivadas em quintais do Estado de São Paulo. **Bragantia**, v. 52, n. 1, p. 1-5, 1993.

MABANZA, J.; RODRIGUEZ-ANDRIYAMASI, A. V.; MAHOUKA, J.; BOUMBA, B. Evaluation of cleaned cassava varieties in Congo. In: INTERNATIONAL SCIENTIFIC MEETING ON CASSAVA BIOTECHNOLOGY NETWORK, 2., 1994, Bogor. **Proceedings...** Bogor: Cassava Biotechnology Network, 1994. p.194-201.

MATTOS, P. L. P. de; CARDOSO, E. M. R. **Cultivo da mandioca para o estado do Pará**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2003. (Embrapa Mandioca e Fruticultura. Sistemas de produção, 13). Disponível em: <https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Mandioca/mandioca_p ara/cultivares.htm>. Acesso em: 17 jan. 2017.

NASSAR, N. M. A. Wild *Manihot* species of central Brazil for cassava breeding. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 58, p. 257-261, 1978.

NASSAR, N. M. A. Cassava, *Manihot esculenta* Crantz genetic resources: VI. Anatomy of a diversity center. **Genetics and Molecular Research**, v. 2, n. 2, p. 214-222, 2003.

NASSAR, N. M. A.; VIZZOTTO, C. S.; SCHWARTZ, C. A.; PIRES JUNIOR, O.R. Cassava diversity in Brazil: the case of carotenoid-rich landraces. **Genetics and Molecular Research**, v. 6, n. 1, p. 116-121, 2007.

NASSAR, N. M. A. Three Brazilian *Manihot* species with tolerance to stress conditions. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 59, p. 553-555, 1979.

NASSAR, N. M. A.; ALVES, J.; SOUZA, E. de. UnB 033: an interesting interspecific cassava hybrid. **Revista Ceres**, v. 51, n. 296, p. 495-499, 2004.

NASSAR, N. M. A. Mandioca: Uma opção contra a fome estudos e lições do Brasil e do mundo. **Ciência hoje**, vol. 39, n.231, p. 31 - 34, 2006.

OLSEN, K.M. **SNPs, SSRs and inferences on cassava's origin**. Plant Molecular Biology, v. 56, p.517-526, 2004.

REIFSCHNEIDER, F. J. B.; NASS, L. L.; HENZ, G. P. (org.). **Uma pitada de biodiversidade na mesa dos brasileiros**. 1. ed. Brasília, DF, 2014. 156 p.

SANTOS, V. S.; SOUZA, A. S.; VIANA, A. E. S.; FERREIRA FILHO, J. R.; SOUZA, K. A. de; MENEZES, M. C. **Multiplicação rápida, método simples e de baixo custo na produção de material propagativo de mandioca**. Cruz das Almas, BA: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2009. 23 p. (Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 44).

SHEELA, M.N.; RADHIKA, V.S.; SUSAN JOHN, K.; ABRAHAM, K. Variation in crude protein, dry matter and starch in inbred and backcross lines of cassava. **Journal of Root Crops**, v. 34, n. 2, p. 115-119, 2008.

SILVA, B. B. da; MENDES, F. B. G.; KAGEYAMA, P. Y. **Desenvolvimento econômico, social e ambiental da agricultura familiar pelo conhecimento agroecológico**. Mandioca Piracicaba: Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2009. Disponível em: <<http://www.almanaquedocampo.com.br/imagens/files/caracter%C3%ADsticas%20da%20mandioca%20esalq.pdf>>. Acesso em: 17 de jan. 2017.

SIRITUNGA, D.; SAYRE, R. T. Generation of cyanogen-free transgenic cassava. **Planta**, v. 217, p. 367-373, 2003.

SUÁREZ, L.; MEDEROS, V. Apuntes sobre el cultivo de la yuca (*Manihot esculenta* Crantz). Tendencias actuales. **Cultivos Tropicales**, v. 32, n. 3, p. 27-35, 2011.

TOLEDO, A. P. de. Anatomia e desenvolvimento ontogenético do fruto e da semente de mandioca. **Bragantia**, v. 22, p. LXXI-LXXVI, 1963. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/brag/v22nunico/82.pdf>>. Acesso em: 15 nov. 2016.

CAPÍTULO I
MULTILICAÇÃO *IN VITRO* DE ESPÉCIES SILVESTRES DE *Manihot*¹

¹ Artigo a ser submetido ao periódico Pesquisa Agropecuária Brasileira

MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DE ESPÉCIES SILVESTRES DE *Manihot*

RESUMO:

A multiplicação *in vitro* é uma técnica de cultura de tecidos bastante expressiva devido sua eficiência na produção de mudas em qualquer escala, consistindo em um conjunto de métodos de propagação a partir do cultivo de pequenos propágulos em um meio de cultura adequado, sob condições assépticas que possibilitem a regeneração das plantas e posterior resgate, de maneira que possam ser reintroduzidas em campo, quando necessário. Para isso, nos experimentos de multiplicação *in vitro*, visando o o estabelecimento de protocolos adaptados as espécies silvestres de *Manihot*, o meio de cultura básico utilizado foi composto pelos sais minerais e vitaminas do MS, modificado, com vinte e cinco tratamentos advindos da combinação entre cinco concentrações de benzilaminopurina - BAP e de ácido naftalenoacético – ANA, nas doses de 0 mg L⁻¹; 0,025 mg L⁻¹; 0,05 mg L⁻¹; 0,075 mg L⁻¹ e 0,1 mg L⁻¹. Foram utilizados cinco genótipos de espécies silvestres de *Manihot* *M. violaceae* Pohl Müll. Arg., *M. pseudoglaziovii* Pax & Hoff, *M. chlorosticta* Standl. & Goldman, *M. flabellifolia* Pohl e *M. pentaphylla* Pohl. A avaliação foi realizada aos 120 dias após a inoculação dos explantes e as variáveis avaliadas foram: altura de planta (cm), número de microestacas com 1 cm, número de raízes, número de brotações, número de folhas verdes e número de folhas senescentes. No genótipo *M. violaceae* Pohl Müll. Arg. obteve-se resultados favoráveis apenas na concentração de 0,05 mg L⁻¹ de ANA. Já para a espécie *M. flabellifolia* Pohl, foram obtidos os melhores resultados também na ausência de BAP, porém na dose de 0,025 mg L⁻¹ de ANA. Meios de cultura sem a adição dos reguladores vegetais ANA e BAP favoreceram o melhor comportamento *in vitro* das espécies *M. pseudoglaziovii* Pax & Hoff, *M. chlorosticta* Standl & Goldman e *M. pentaphylla* Pohl.

Palavras chave: Auxina, Citocinina, Mandioca

IN VITRO MULTIPLICATION OF WILD SPECIES OF *Manihot*

ABSTRACT:

In vitro multiplication is a very expressive tissue culture technique due to its efficiency in the production of seedlings at any scale, consisting of a set of propagation methods from the cultivation of small propagules in a appropriate cultivation media, under aseptic conditions that enables the regeneration of the plants and subsequent rescue, so that they can be reintroduced in the field, when necessary. For this, *in vitro* multiplication experiments, aiming at the establishment of protocols adapted to the wild species of *Manihot*, the alkaline cultivation media used was composed by minerals and vitamins of the modified MS, with twenty five treatments resulting from the combination of five concentrations of benzylaminopurine - BAP and Naphthaleneacetic acid - ANA at doses of 0 mg L⁻¹; 0.025 mg L⁻¹; 0.05 mg L⁻¹; 0.075 mg L⁻¹ and 0.1 mg L⁻¹. Five genotypes of wild species of *Manihot* *M. violaceae* Pohl Müll were used. Arg., *M. pseudoglaziovii* Pax & Hoff, *M. chlorosticta* Standl. & Goldman, *M. flabellifolia* Pohl and *M. pentaphylla* Pohl. The evaluation was performed at 120 days after inoculation of the explants and the variables evaluated were: plant height (cm), number of microheads with 1 cm, number of roots, number of shoots, number of green leaves and number of senescent leaves. In the genotype *M. violaceae* Pohl Müll. Arg. Better results were obtained just at the concentration of 0.05 mg L⁻¹ of ANA. For *M. flabellifolia* Pohl), the best results were also obtained in the absence of BAP, but at the dose of 0.025 mg L⁻¹ of ANA. Cultivation media without the addition of plant regulators ANA and BAP favored the best *in vitro* behavior of the species *M. pseudoglasiovii* Pax & Hoff, *M. chlorosticta* Standl & Goldman and *M. pentaphylla* Pohl.

Keywords: Auxin, Cytokinin, Cassava.

INTRODUÇÃO

A biotecnologia vegetal é uma das conquistas mais importantes da ciência no desenvolvimento da agricultura moderna, integrando múltiplas estratégias tecnológicas e bioquímicas que visam aprimorar a produção e qualidade vegetal, gerando produtos e serviços (KERBAUY; ESTELITA, 1996).

Dentro dessa perspectiva fundamenta-se a cultura de tecidos, compreendida como um conjunto de processos para a introdução de um material vegetal sob condições de esterilidade em um substrato nutritivo especialmente formulado, posteriormente incubados em condições ambientais controladas, com a finalidade de estimular e controlar os fenômenos de diferenciação, multiplicação e morfogênese celulares, baseando-se no princípio da totipotência (COELHO, 1999; GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

A multiplicação *in vitro* é uma das técnicas de cultura de tecidos que oferece uma alternativa à propagação vegetativa convencional, por ser uma das ferramentas mais eficientes à produção em larga escala, representando um conjunto de métodos de propagação a partir do cultivo de pequenos propágulos (células, tecidos e órgãos), em um meio de crescimento apropriado, sob condições assépticas que favoreçam a regeneração da planta (CARVALHO et al., 2006), de modo que possa, quando necessário, ser reintroduzida em campo. Este processo exige condições ambientais específicas no que tange à luminosidade, fotoperíodo, temperatura e umidade relativa (WENDLING et al., 2006), podendo ainda atender outros requisitos peculiares à espécie que será cultivada.

Esse sistema revela uma série de vantagens em relação aos métodos convencionais de propagação vegetativa, como a obtenção de um número elevado de plantas saudáveis com homogeneidade genética e em tempo reduzido; a propagação de plantas dificilmente regeneradas por métodos tradicionais; a necessidade de espaço reduzido; a independência sazonal e a possibilidade de obtenção de plantas isentas de patógenos (KOZAI et al., 1997). Todavia, existem alguns fatores desfavoráveis, como os relativos ao alto investimento inicial para a compra de equipamentos; a necessidade de mão de obra especializada; a possibilidade de ocorrência de variação somaclonal e os riscos de contaminação (STANICA, 2002).

Diversos elementos influenciam o êxito da micropropagação, como a seleção do explante, a composição do meio de cultura, as condições de incubação e controle de contaminações.

A qualidade do explante e sua resposta *in vitro* são significativamente influenciadas pela seleção do material vegetal doador. Entre os fatores mais relevantes para o sucesso do processo estão o estágio fisiológico, a idade da planta, o genótipo, a fitossanidade, o tamanho do explante e sua localização na planta progenitora (LAMEIRA et al., 2000).

A definição do tipo de explante irá variar de acordo com a finalidade da propagação. Preliminarmente, qualquer parte da planta que seja capaz de expressar sua totipotência é passível de ser utilizada (TORRES et al., 2000), tanto as partes reprodutivas (pólen, anteras, embriões, óvulos, esporos, sementes) quanto as vegetativas (meristemas, caules, folhas, raízes).

O meio de cultura é uma solução aquosa, na qual são dissolvidos macro e micronutrientes (sais minerais), vitaminas, uma fonte de carboidrato orgânico e reguladores de crescimento, componentes essenciais tendo em vista que durante o cultivo *in vitro* a planta tende a apresentar um comportamento heterotrófico e, por essa razão, o meio de cultura deve simular as condições nutricionais encontradas no seu estado natural, suprindo assim suas necessidades metabólicas (VILLA et al., 2009; MORAIS et al., 2012;). Além do fornecimento de nutrientes essenciais à sobrevivência, esses meios nutritivos desempenham diversas funções, como sustentação para o explante (habitualmente se acrescenta ao meio de cultura substâncias solidificantes como ágar ou Phytigel®), controle do crescimento e desenvolvimento do material vegetal (CARVALHO; VIDAL, 2003).

Os hormônios vegetais desempenham um papel muito importante no controle do crescimento e diferenciação das plantas. São produzidos em determinadas áreas do organismo vegetal, em resposta a estímulos adequados, e translocados para a área onde irão promover ou inibir alguma atividade metabólica das células (SALISBURY; ROSS, 1992). Contudo, as plantas mantidas *in vitro* muitas vezes não são capazes de sintetizar essas substâncias em quantidade suficiente, de modo que é necessário adicioná-las ao meio de cultura. Outra categoria de reguladores de crescimento que são comumente utilizados na cultura de tecidos são chamados fitorreguladores, substâncias sintéticas que exercem um efeito similar ao dos hormônios endógenos (PASQUAL et al., 1997).

Os grupos de reguladores de crescimento tradicionalmente conhecidos são as auxinas, as citocininas, as giberelinas, o etileno e o ácido abscísico. De acordo com Rogalaski et al. (2003), o uso desses reguladores encontra-se entre os fatores que mais contribuem para o êxito da micropropagação, destacando-se entre eles as citocininas e as auxinas. A interação entre essas duas classes de reguladores apresenta a capacidade de controlar o desenvolvimento e a formação da parte aérea, gemas e calos (CALDAS et al., 1999).

Dentre as auxinas de maior relevância está o ácido naftalenacético (ANA), que desempenha um papel expressivo no desenvolvimento das plantas, principalmente no estímulo do crescimento das partes aéreas e no enraizamento do explante inicial estabelecido *in vitro*, sendo muito utilizadas em espécies de difícil enraizamento (SOUZA JUNIOR, 2007). Na classe das citocininas, a 6-benzilaminopurina (BAP) é uma das mais responsivas, atuando na regulação da divisão celular das partes aéreas nos vegetais e promovendo o crescimento de gemas laterais (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1999). Esses dois reguladores de crescimento também são muito utilizados em associação e essa interação normalmente favorece a multiplicação e desenvolvimento das plantas *in vitro*, considerando-se que a alta proporção de citocinina é importante na indução de brotações, ao passo que uma proporção superior de auxina favorece a rizogênese (KERBAUY, 2004).

Quanto as condições de incubação o local onde os explantes são mantidos deve favorecer seu desenvolvimento e para isso é necessário que haja um eficiente controle das condições ambientais. A intensidade luminosa varia em média de $25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de irradiância. O fotoperíodo empregado normalmente é de 16 horas, a temperatura entre 30°C e 15°C e a umidade relativa controlada com o auxílio de um desumidificador. Esse ambiente deve conter estantes metálicas, com lâmpadas fluorescentes (branca-fria) acopladas na parte inferior das prateleiras, onde serão dispostos os frascos de cultivo (LAMEIRA et al., 2000).

Multiplicação *in vitro* de espécies silvestres de *Manihot*

Dentre as espécies nas quais o protocolo de multiplicação *in vitro* já se encontra bem estabelecido está a *Manihot esculenta* Crantz e a aplicação dessa técnica abrange diversas finalidades, como o aumento da taxa de multiplicação, mantendo a qualidade e uniformidade no desenvolvimento da planta (SOUZA et al., 2013).

O meio de cultura MS, desenvolvido por Murashige e Skoog (1962), é o mais amplamente difundido, sendo utilizado na propagação *in vitro* de diversas espécies, inclusive a *M. esculenta* Crantz, entretanto, a composição desenvolvida para essa espécie não apresentou eficiência na multiplicação *in vitro* de espécies silvestres de *Manihot*. Diante de impasses como esse, habitualmente são realizadas adequações no meio básico (MS, no caso), alterando sua composição para atender as especificidades da cultura a ser propagada, como indica essa pesquisa.

Nesse contexto, os experimentos realizados neste capítulo tiveram como objetivo contribuir com o estabelecimento de protocolos de multiplicação *in vitro* de cinco espécies silvestres de *Manihot*.

MATERIAL E MÉTODOS

Local de realização dos experimentos

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Cultura de Tecidos (LCT) do Núcleo de Biologia Avançada (NBIO), da Embrapa Mandioca e Fruticultura, em Cruz das Almas, Bahia.

Material vegetal

Foram conduzidos cinco experimentos, estudando, em cada um deles, as seguintes espécies silvestres de *Manihot*: *M. violaceae* (Pohl) Müll. Arg., *M. pseudoglaziovii* Pax & Hoff, *M. chlorosticta* Standl. & Goldman, *M. flabellifolia* Pohl e *M. pentaphylla* Pohl, previamente estabelecidas no LCT.

Preparação do meio de cultura

Para cada experimento, ao meio de cultura básico, composto pelos sais minerais e vitaminas do MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), foi feita a adição das combinações entre cinco concentrações de benzilaminopurina (BAP) e cinco doses do ácido naftalenoacético (ANA), ambos os reguladores a 0 mg L⁻¹; 0,025 mg L⁻¹; 0,05 mg L⁻¹; 0,075 mg L⁻¹ e 0,1 mg L⁻¹. O pH foi ajustado para 5,8, regulando-o, quando necessário, com NaOH ou HCl (0,1 N). Como agente gelificante foi adicionado

Phytigel® (2,4 g L⁻¹), dissolvido por aquecimento em forno de microondas. Por fim, uma alíquota de 10 mL foi distribuída por tubo de ensaio de 25 mm de diâmetro e 150 mm de altura, em um total de 20 tubos por tratamento, que, subsequentemente, foram tampados, embalados e submetidos a autoclavagem por 20 minutos, a 120 °C.

Instalação dos experimentos

Essa etapa foi realizada em câmara de fluxo laminar (Figura 1A), onde, utilizando pinças e bisturis, foram seccionadas as plantas de mandioca (Figura 1B), obtendo-se microestacas de aproximadamente 1 cm de tamanho (Figura 1C), contendo uma gema. O explante foi posteriormente introduzido em tubo de ensaio (Figura 1D) contendo 10 mL de meio de cultura, fechado com filme de PVC esticável e etiquetado com o código de identificação correspondente ao tratamento do meio de cultura, a espécie propagada e a data do cultivo (Figura 1E).

As culturas então foram incubadas em sala de crescimento (Figura 1F), em condições ambientais que favorecessem o desenvolvimento rápido das plantas: temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 16 horas com intensidade luminosa de $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

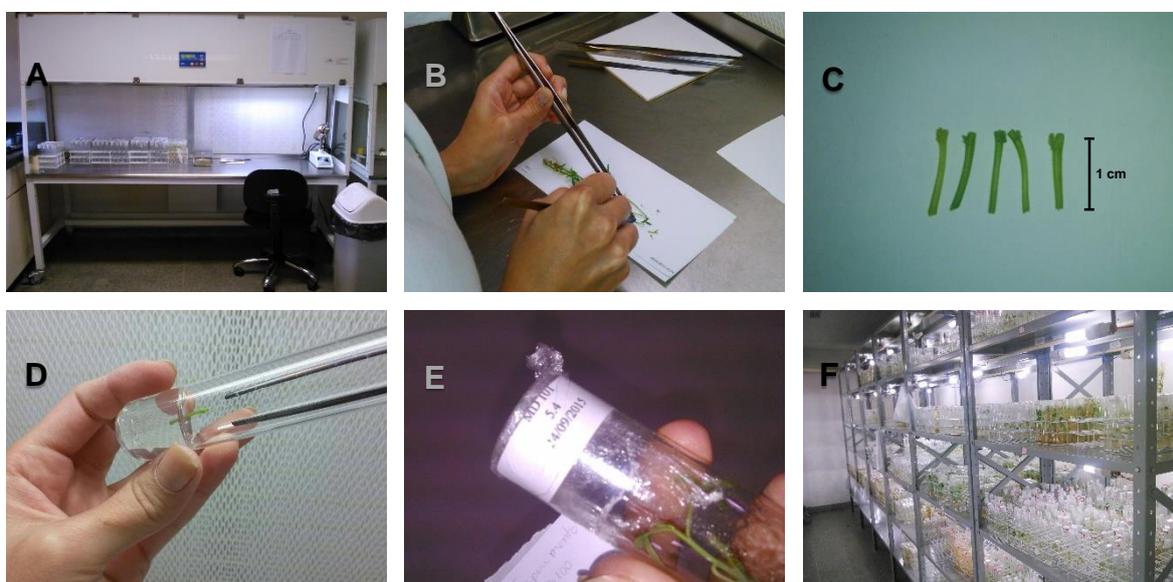


Figura 1. Etapas da multiplicação *in vitro*. Câmara de fluxo laminar (A); Seccionamento do explante (B); Explantes (C); Microestacas *in vitro* devidamente etiquetadas (D e E) e Sala de crescimento (F). Fotos: Deyse Silveira.

Avaliação dos experimentos

A avaliação foi realizada aos 120 dias após a inoculação dos explantes, sendo as características avaliadas: altura de planta (AP; cm), número de microestacas com 1 cm (NM), número de raízes (NR), número de brotações (NB), número de folhas verdes (NFV) e número de folhas senescentes (NFS).

Análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 5 x 5, com 20 repetições, cada uma representada por uma planta cultivada em um tubo de ensaio. Cada combinação dos fatores estudados, BAP e ANA, nos experimentos de multiplicação *in vitro*, foi aplicada aos cinco genótipos selecionados de forma isolada, resultando, portanto, em cinco experimentos.

Os dados coletados na avaliação foram submetidos ao teste F da análise de variância. Para as médias dos fitorreguladores foram ajustados modelos de regressão polinomial. As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do programa estatístico SISVAR (Ferreira, 2013).

Os valores do número de microestacas, número de raízes, número de brotações, número de folhas verdes e número de folhas senescentes foram transformados em $\sqrt{x + 0,5}$, visando o atendimento das pressuposições da análise de variância.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em razão da grande variabilidade genética do gênero *Manihot* e da falta de informações sobre o comportamento *in vitro* das espécies silvestres de mandioca, foram instalados cinco experimentos, cujos resultados são, então, apresentados e discutidos de forma sequencial.

Experimento I: Efeito de diferentes concentrações de BAP e de ANA na micropropagação da espécie *Manihot violaceae* (Pohl) Müll. Arg.

Na Tabela 1, é possível verificar que houve efeito altamente significativo ($p < 0,01$) da interação BAP x ANA para altura de planta (AP), número de microestacas

(NM), número de brotações (NB) e número de folhas senescentes (NFS), ao passo que para a variável número de folhas verdes (NFV) apenas o fator BAP isolado apresentou efeito significativo ($p < 0,05$). Já para o número de raízes (NR) não houve efeito significativo das concentrações dos reguladores vegetais testados nos tratamentos aos quais foi submetido o genótipo *M. violaceae* (Pohl) Müll. Arg.

Tabela 1. Resumo da análise de variância para altura de planta (AP; em cm), número de microestacas (NM), número de raízes (NR), número de brotações (NB), número de folhas verdes (NFV) e número de folhas senescentes (NFS) do genótipo *Manihot violaceae* (Pohl) Müll. Arg., em função das concentrações de BAP e de ANA (mg L^{-1}).

FV	GL	QM					
		AP	NM	NR	NB	NFV	NFS
BAP	4	60,27**	5,07**	1,10 ^{ns}	0,28**	0,74*	4,78**
ANA	4	82,95**	0,83**	0,73 ^{ns}	0,31**	0,46 ^{ns}	0,33 ^{ns}
BAP x ANA	16	98,08**	0,71**	0,59 ^{ns}	0,42**	0,25 ^{ns}	0,88**
Erro	315	13,10	0,19	1,10	0,08	0,27	0,34
CV (%)		25,40	12,70	30,06	18,63	21,96	18,55
Média geral		14,25	11,53	6,66	1,86	5,39	9,73

ns = não significativo; ** e * significativo a 1 e 5%, respectivamente, pelo teste de F.

O desenvolvimento *in vitro* das plantas foi bastante variado, como evidenciam os respectivos coeficientes de variação (CVs), que oscilam entre 12,70% e 30,06%, respectivamente para o número de microestacas e o número de raízes (Tabela 1). Todavia, em cultura de tecidos os CVs são elevados, demonstrando que mesmo sob condições de cultivo controladas a distribuição dos erros associadas ao modelo estatístico do delineamento inteiramente casualizado nem sempre segue o pressuposto da normalidade (CARVALHO, 2013), tendência essa confirmada por diversos estudos, entre eles o relacionado com a micropropagação de *Manihot esculenta* Crantz (VIDAL et al., 2013), no qual foram encontrados CVs que variaram entre 18,99% e 63,51%. Na multiplicação *in vitro* de *Eremanthus incanus* (Less.) Less., Miranda (2016) encontrou CVs que oscilaram entre 12, 25% e 99,53%, enquanto na propagação *in vitro* de *Plinia sp.*, Sasso (2009) observou-se CVs de até 134,3%. No caso da mandioca, é provável que os elevados coeficientes de variação aconteçam em função da dificuldade em se homogeneizar a condição de cada microestaca utilizada na instalação do experimento, notadamente sob o ponto de vista fisiológico.

Os modelos de regressão polinomial encontram-se na Tabela 2, na qual é possível observar os ajustes de modelos de 1º e 2º graus, com coeficientes de determinação (R²) variando de 52,16% a 98,95%.

Tabela 2. Equações de regressão polinomial, coeficientes de determinação (R₂), dose ótima e valores estimados da altura de planta (cm), número de microestacas, número de brotações, número de folhas verdes e número de folhas senescentes do genótipo *Manihot violaceae* (Pohl) Müll. Arg. em função das concentrações de BAP e de ANA (mg L⁻¹).

Interações	Doses (mg L ⁻¹)	Equação	R ₂ (%)	Dose ótima	Valor estimado
Altura de planta (cm)					
BAP (ANA)	0	$\hat{y}^{**} = 1818,3x^2 - 165,2x + 17,265$	52,16	0,05	13,51
BAP (ANA)	0,075	$\hat{y}^{**} = -2157,4x^2 + 232,62x + 10,309$	98,95	0,05	16,58
ANA (BAP)	0	$\hat{y}^{**} = 2524,4x^2 - 274,33x + 16,513$	83,84	0,05	9,06
ANA (BAP)	0,025	$\hat{y}^{**} = -1680,3x^2 + 118,69x + 15,289$	98,12	0,04	17,38
ANA (BAP)	0,05	$\hat{y}^{**} = 52,967x + 10,713$	70,58	0,1	16,01
ANA (BAP)	0,1	$\hat{y}^{**} = 1260x^2 - 172,1x + 18,205$	96,66	0,07	12,33
Número de microestacas					
BAP (ANA)	0,025	$\hat{y}^{**} = -1344,3x^2 + 198,22x + 6,6475$	62,93	0,07	13,95
BAP (ANA)	0,05	$\hat{y}^{**} = -1390,5x^2 + 180,38x + 6,9619$	81,94	0,06	12,81
BAP (ANA)	0,075	$\hat{y}^{**} = -1100,2x^2 + 149,29x + 7,3485$	90,57	0,07	12,41
ANA (BAP)	0	$\hat{y}^{**} = 1684,5x^2 - 174,38x + 10,826$	93,81	0,05	6,31
ANA (BAP)	0,075	$\hat{y}^{**} = -59,576x + 17,574$	78,85	0	17,57
ANA (BAP)	0,1	$\hat{y}^* = -19,143x + 12,554$	57,49	0	12,55
Número de brotações					
BAP (ANA)	0	$\hat{y}^{**} = -617,3x^2 + 64,036x + 0,9567$	82,14	0,05	2,62
BAP (ANA)	0,05	$\hat{y}^* = 215,09x^2 - 18,114x + 1,736$	53,57	0,04	1,35
ANA (BAP)	0	$\hat{y}^{**} = 8,3197x + 1,3292$	63,81	0,1	2,16
ANA (BAP)	0,025	$\hat{y}^* = 235,54x^2 - 12,926x + 1,8202$	76,58	0,03	1,64
ANA (BAP)	0,05	$\hat{y}^{**} = 655,24x^2 - 74,19x + 2,999$	96,46	0,06	0,90
ANA (BAP)	0,1	$\hat{y}^* = 6,5357x + 1,3958$	64,11	0,1	2,05
Número de folhas verdes					
BAP		$\hat{y}^* = -59,809x^2 + 5,0861x + 2,3407$	61,13	0,04	2,45
Número de folhas senescentes					
BAP(ANA)	0,025	$\hat{y}^{**} = -1666,7x^2 + 227,09x + 4,5448$	90,57	0,07	12,28
BAP(ANA)	0,05	$\hat{y}^* = 50,325x + 7,5064$	81,07	0,1	12,51
ANA(BAP)	0	$\hat{y}^{**} = 1036,6x^2 - 86,048x + 7,3471$	81,63	0,04	5,56

** e * significativo a 1 % e 5 % de probabilidade, respectivamente, pelo teste F da ANAVA.

Considerando-se a concentração dos reguladores de crescimento, observa-se que a interação da dose de 0,1 mg L⁻¹ para ambos (Tabela 2) influenciaram o aumento na formação de brotações, apresentando a maior média (2,05). Resultado legitimado por Skoog e Miller (1957), enunciando que o equilíbrio de citoninina e auxina é fundamental para a regeneração de brotações.

Estima-se que a dose de 0,04 mg L⁻¹ de BAP induza a obtenção de melhores resultados referentes ao número de folhas verdes (2,45). Já na interação entre as doses de 0,05 mg L⁻¹ de ANA e 0,1 mg L⁻¹ de BAP encontrou-se os maiores valores

para número de folhas senescentes (12,51), demonstrando um expressivo sinal de envelhecimento das plantas.

De acordo com os valores estimados obtidos a partir das equações de regressão (Tabela 2), a maior média estimada para altura de planta (17,38) é favorecida pela combinação das doses de 0,025 mg L⁻¹ de BAP e de 0,04 mg L⁻¹ de ANA. Quanto ao número de microestacas, a maior média (17,57) foi encontrada no tratamento com adição de 0,075 mg L⁻¹ de BAP e ausência de ANA.

Associando as duas variáveis que são mais decisivas no processo de micropropagação, encontrou-se resultados favoráveis na ausência de BAP dentro da dose 0,05 mg L⁻¹ de ANA, onde as médias estimadas para altura de planta e número de microestacas foram de 9,06 cm e 6,31 cm, respectivamente.

Experimento II: Efeito de diferentes concentrações de BAP e de ANA na micropropagação da espécie *Manihot pseudoglaziovii* Pax & Hoff).

O resumo da análise de variância (Tabela 3) revela que o número de raízes, o número de brotos e o número de folhas senescentes foram estimulados pela concentração de BAP isoladamente, visto que essa fonte de variação apresentou efeito altamente significativo ($p < 0,01$). A interação entre BAP e ANA foi significativa ($p < 0,05$) apenas para os resultados obtidos na altura de planta. Nota-se uma variação de 22,14% a 29,24% nos coeficientes de variação (CV) para número de brotos e altura de planta, respectivamente

Tabela 3. Resumo da análise de variância para altura de planta (AP; em cm), número de microestacas (NM), número de raízes (NR), número de brotações (NB), número de folhas verdes (NFV) e número de folhas senescentes (NFS) de espécie *Manihot pseudoglaziovii* Pax & Hoff), função das concentrações de BAP e de ANA (mg L⁻¹).

FV	GL	QM					
		AP	NM	NR	NB	NFV	NFS
BAP	4	91,98 [*]	0,22 ^{ns}	6,63 ^{**}	0,87 ^{**}	0,56 ^{ns}	1,54 ^{**}
ANA	4	10,11 ^{ns}	0,24 ^{ns}	2,03 [*]	0,17 ^{ns}	0,45 ^{ns}	0,28 ^{ns}
BAP x ANA	16	38,25 [*]	0,60 ^{ns}	1,04 ^{ns}	0,18 ^{ns}	0,33 ^{ns}	0,75 ^{ns}
Erro	266	21,11	0,38	0,79	0,12	0,31	0,47
CV (%)		29,24	29,24	27,08	22,14	23,08	26,00
Média geral		15,71	10,13	11,18	2,00	5,67	6,94

ns = não significativo; ** e * significativo a 1 e 5%, respectivamente, pelo teste de F.

Na Tabela 4 estão os modelos de regressão polinomial, onde se observa os coeficientes de determinação (R^2) variando de 55,77% a 96,58% para altura de planta e número de raízes.

Tabela 4. Equações de regressão polinomial, coeficientes de determinação (R^2), dose ótima e valores estimados da altura de planta (cm), número de microestacas, número de brotações, número de folhas verdes e número de folhas senescentes da espécie *Manihot pseudoglaziovii* Pax & Hoff, em função das concentrações de BAP e de ANA (mg L^{-1}).

Interações	Doses (mg L^{-1})	Equação	R^2 (%)	Dose ótima	Valor estimado
Altura de planta (cm)					
BAP (ANA)	0	$\hat{y}^{**} = 1531,8x^2 - 209,79x + 19,493$	55,77	0,07	12,31
ANA (BAP)	0	$\hat{y}^{**} = -36,093x + 19,095$	55,77	0	19,09
Número de raízes					
BAP		$\hat{y}^{**} = -56,782x + 13,68$	96,58	0	13,68
ANA		$\hat{y}^{ns} = 11,30281$	-	0	11,30
Número de brotações					
BAP		$\hat{y}^{**} = -102,4x^2 + 10,501x + 1,4$	90,95	0,05	1,67
Número de folhas senescentes					
BAP		$\hat{y}^{**} = -664,88x^2 + 76,481x + 5,6861$	74,34	0,06	7,89

** e * significativo a 1 % e 5 % de probabilidade, respectivamente, pelo teste F da ANAVA.

O melhor resultado referente à taxa de brotação (1,67) foi encontrados na presença do BAP, sendo $0,05 \text{ mg L}^{-1}$ a melhor dose estimada (Tabela 5), enquanto uma dose ligeiramente superior (0,06) prevê o aumento no número de folhas senescentes (7,89).

Contudo, a micropropagação de *Manihot pseudoglaziovii* Pax & Hoff demonstrou-se viável na ausência do ácidonaftaleno acético e da benzilaminopurina, tendo em vista que as médias estimadas para altura de planta (19,09) e número de raízes (13,68) foram maiores em meio de cultura sem esses reguladores. Resultados similares foram encontrados na micropropagação de *Melissa officinalis* L. (REIS et al., 2008), *Splanum betaceum* Cav. (COPATTI et al., 2016), *Rosmarinus officinalis* L. (DILL, 2014), *Plathymentia reticulata* Benth. (MOURA et al., 2012) e *Hancornia speciosa* Gomes (OLIVEIRA et al., 2016), onde em meio de cultura MS sem acréscimo de BAP e ANA, os explantes mostraram-se mais responsivos. De acordo com Mallón et al. (2011), este comportamento pode ser atribuído à presença de concentrações endógenas de auxinas e citocininas suficientes para induzir seu desenvolvimento *in vitro*.

Experimento III: Efeito de diferentes concentrações de BAP e de ANA na micropropagação de *Manihot chlorostita* Standl. & Goldman).

O fator BAP isolado apresentou efeito significativo para todas as variáveis, havendo também efeito significativo da interação BAP x ANA para número de microestacas, número de raízes, número de folhas verdes e número de folhas senescentes (Tabela 5).

Tabela 5. Resumo da análise de variância para altura de planta (AP; em cm), número de microestacas (NM), número de raízes (NR), número de brotações (NB), número de folhas verdes (NVF) e número de folhas senescentes (NFS) do genótipo *Manihot chlorostica* Standl. & Goldman), em função das concentrações de BAP e de ANA (mg L^{-1}).

FV	GL	QM					
		AP	NM	NR	NB	NVF	NFS
BAP	4	182,65*	3,29**	3,198**	0,64**	0,81**	2,50**
ANA	4	202,08*	1,98**	2,66**	0,23*	0,07 ^{ns}	2,09**
BAP x ANA	16	102,65 ^{ns}	0,63*	0,96**	0,11 ^{ns}	0,24*	0,70*
Erro	248	67,56	0,32	0,26	0,09	0,14	0,38
CV (%)		31,94	15,36	14,08	18,14	19,67	20,30
Média geral		25,74	13,61	13,17	2,25	3,25	9,30

ns = não significativo; ** e * significativo a 1 e 5%, respectivamente, pelo teste de F.

Alguns trabalhos de pesquisa envolveram concentrações semelhantes às encontradas neste estudo, como o de Mendonça et al. (2015), onde o meio de cultura MS foi suplementado com ANA e BAP nas doses de $0,0 \text{ mg L}^{-1}$; $0,01 \text{ mg L}^{-1}$; $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ e $1,0 \text{ mg L}^{-1}$, para a espécie silvestre *Manihot chlorosticta* Standl. & Goldman, verificando-se que elas não favoreceram a multiplicação *in vitro* dessa espécie silvestre.

Semelhantemente aos resultados encontrados neste experimento, onde as plantas que apresentaram as maiores médias para altura (25,64 cm e 25,54 cm) e número de microestacas (19,35), foram submetidas ao meio MS sem adição de ANA e de BAP (Tabela 6). A omissão desses fitorreguladores também favoreceu a proliferação de brotos (2,63), resultado também encontrado na propagação *in vitro* de *Amburana acreana* (Ducke) A. C. Sm. (FERMINO JUNIOR et al., 2012). Esses resultados indicam que a suplementação do meio de cultura com esses reguladores é dispensável, no que tange ao estímulo para o desenvolvimento das variáveis mencionadas.

Tabela 6. Equações de regressão polinomial, coeficientes de determinação (R^2), dose ótima e valores estimados da altura de planta (cm), número de microestacas, número de raízes, número de brotações, número de folhas verdes e número de folhas senescentes do genótipo *Manihot chlorosticta* Standl. & Goldman), em função das concentrações de BAP e de ANA (mg L^{-1}).

Interações	Doses (mg L^{-1})	Equação	R^2 (%)	Dose ótima	Valor estimado
Altura de planta (cm)					
BAP		$\hat{y}^{ns}=25,64$	-		25,64 ¹
ANA		$\hat{y}^{ns}=25,54$	-		25,54 ¹
Número de microestacas					
BAP (ANA)	0	$\hat{y}^*=1280x^2 - 199,78x + 19,179$	99,02	0,08	11,38
BAP (ANA)	0,025	$\hat{y}^{**}=-70,462x + 17,165$	83,62	0,00	17,16
ANA (BAP)	0	$\hat{y}^{**}=-71,231x + 19,356$	93,49	0,00	19,35
ANA (BAP)	0,025	$\hat{y}^{**}=-41,299x + 15,131$	50,72	0,00	15,13
ANA (BAP)	0,05	$\hat{y}^{**}=-1562,2x^2 + 144,36x + 12,174$	97,83	0,05	15,51
Número de raízes					
BAP (ANA)	0,025	$\hat{y}^{**}=-183,53x^2 + 21,84x + 3,1093$	86,18	0,06	3,76
BAP (ANA)	0,1	$\hat{y}^{**}=-280,54x^2 + 34,657x + 3,0785$	73,88	0,06	4,15
ANA (BAP)	0,05	$\hat{y}^{**}=-292,22x^2 + 39,828x + 3,1048$	94,22	0,07	4,46
ANA (BAP)	0,075	$\hat{y}^{**}=6,1884x + 3,4934$	64,65	0,10	4,11
ANA (BAP)	0,1	$\hat{y}^{**}=-234,91x^2 + 29,06x + 3,1253$	85,04	0,06	4,02
Número de brotações					
BAP		$\hat{y}^{**}=-8,5193x + 2,6343$	78,09	0,00	2,63
ANA		$\hat{y}^*=-155,26x^2 + 13,719x + 2,1338$	64,20	0,04	2,44
Número de folhas verdes					
BAP (ANA)	0,025	$\hat{y}^*=455,4x^2 - 62,339x + 4,4727$	69,23	0,07	2,34
BAP (ANA)	0,075	$\hat{y}^{**}=-16,318x + 4,2723$	69,48	0	4,27
BAP (ANA)	0,1	$\hat{y}^{**}=-14,81x + 3,875$	54,83	0	3,87
Número de folhas senescentes					
BAP (ANA)	0	$\hat{y}^{**}=-63,911x + 12,689$	82,77	0	12,69
BAP (ANA)	0,025	$\hat{y}^{**}=-46,866x + 12,174$	58,29	0	12,17
ANA (BAP)	0	$\hat{y}^{**}=-59,658x + 13,344$	83,28	0	13,34
ANA (BAP)	0,025	$\hat{y}^{**}=-40,983x + 11,56$	66,58	0	11,56
ANA (BAP)	0,075	$\hat{y}^{**}=-1345,9x^2 + 132,77x + 8,2809$	74,65	0,05	11,55

** e * significativo a 1 % e 5 % de probabilidade, respectivamente, pelo teste F da ANAVA; ¹baseado na média dos valores observados.

Em contrapartida, a ausência desses reguladores pode favorecer o envelhecimento fisiológico, tendo em vista que o maior número de folhas senescentes (13,34) foi estimado nas plantas mantidas nesse tratamento. Porém, de modo geral,

não houve grandes oscilação entre as médias encontradas nos demais tratamentos para esta variável.

Quanto ao número de folhas verdes, o meio que continha $0,075 \text{ mg L}^{-1}$ de ANA, sem acréscimo do BAP, resultou na maior média para essa variável (4,27). De forma semelhante, na proliferação *in vitro* de brotos de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown, (ASMAR et al., 2012), a ausência dessa citocinina também favoreceu o desenvolvimento de um maior número de folhas verdes.

Para altura de planta não foi possível ajustar uma equação de regressão que representasse matematicamente a relação entre essa variável e as concentrações dos fitorreguladores estudadas.

Experimento IV: Efeito de diferentes concentrações de BAP e de ANA na micropropagação *in vitro* da espécie *Manihot flabellifolia* Pohl).

A análise de variância dos dados (Tabela 7) indicou que houve efeito significativo da interação entre os reguladores de crescimento para a maioria das variáveis, exceto altura de planta e número de folhas senescentes, sendo que para esta variável os fatores isolados apresentaram efeito significativo.

Tabela 7. Resumo da análise de variância para altura de planta (AP, em cm), número de microestacas (NM), número de raízes (NR), número de brotações (NB), número de folhas verdes (NFV) e número de folhas senescentes (NFS) da espécie *Manihot flabellifolia* Pohl), em função das concentrações de BAP e de ANA (mg L^{-1}).

FV	GL	QM					
		AP	NM	NR	NB	NFV	NFS
BAP	4	47,19 ^{ns}	5,54 ^{**}	3,30 ^{**}	2,90 ^{**}	1.23 ^{**}	3.38 ^{**}
ANA	4	69,38 ^{ns}	1,67 ^{**}	2,86 ^{**}	1,82 ^{**}	1.83 ^{**}	2.30 ^{**}
BAP x ANA	16	14,87 ^{ns}	0,43 ^{**}	0,99 ^{**}	0,90 ^{**}	0.39 [*]	0.48 ^{ns}
Erro	118	39,99	0,20	0,17	0,35	0.22	0.44
CV (%)		109,52	25,58	19,44	26,37	24,19	26,67
Média geral		5,77	2,94	4,43	5,11	3,62	6,30

ns = não significativo; ** e * significativo a 1 e 5%, respectivamente, pelo teste de F.

Foram obtidos os melhores resultados para número de raízes (7,54) no tratamento contendo $0,025 \text{ mg L}^{-1}$ de ANA e ausência de BAP (Tabela 8). Resposta similar foi observada na multiplicação *in vitro* de segmentos caulinares de *Satureja hortensis* L. (NAVROSKI et al., 2014), onde em meio com baixa concentração de ANA e ausência de BAP obteve-se um maior enraizamento, evidenciando a atuação da

auxina no desenvolvimento das raízes. A ausência de BAP dentro da dose de 0,025 mg L⁻¹ de ANA também demonstrou efeito significativo para o número de folhas verdes, que apresentou uma média aproximada de 5 folhas por planta.

Tabela 8. Equações de regressão polinomial, coeficientes de determinação (R²), dose ótima e valores estimados da altura de planta (cm), número de microestacas, número de raízes, número de brotações, número de folhas verdes e número de folhas senescentes de espécie *Manihot flabellifolia* Pohl, em função das concentrações de BAP e de ANA (mg L⁻¹).

Interações	Doses (mg L ⁻¹)	Equação	R ² (%)	Dose ótima	Valor estimado
Número de microestacas					
BAP (ANA)	0	$\hat{y}^{**} = 941,71x^2 - 146,65x + 6,8222$	84,3	0,08	1,11
BAP (ANA)	0,025	$\hat{y}^{**} = 1190,5x^2 - 192,18x + 8,7664$	92,7	0,08	1,01
Número de raízes					
BAP (ANA)	0	$\hat{y}^{**} = -1004,3x^2 + 74,715x + 5,0186$	96,69	0,04	6,41
BAP (ANA)	0,025	$\hat{y}^{**} = -54,689x + 7,5439$	94,99	0,00	7,54
BAP (ANA)	0,1	$\hat{y}^{**} = -1243,8x^2 + 95,248x + 4,8386$	73,04	0,04	6,66
ANA (BAP)	0,05	$\hat{y}^{**} = 1633,4x^2 - 171,71x + 6,8095$	60,09	0,05	2,30
ANA (BAP)	0,075	$\hat{y}^{**} = 1081,9x^2 - 106,06x + 5,5124$	90,53	0,05	2,91
Número de brotações					
BAP (ANA)	0	$\hat{y}^{**} = -1824,4x^2 + 193,87x + 2,5254$	97,78	0,05	7,68
BAP (ANA)	0,025	$\hat{y}^{**} = -2337,8x^2 + 213,56x + 3,49$	91,57	0,05	8,37
ANA (BAP)	0,075	$\hat{y}^* = 1447,6x^2 - 115,43x + 6,5095$	97,77	0,04	4,21
Número de folhas verdes					
BAP (ANA)	0	$\hat{y}^{**} = -953,51x^2 + 80,665x + 3,6372$	92,39	0,04	5,34
BAP (ANA)	0,025	$\hat{y}^{**} = -29,667x + 5,0917$	65,80	0	5,09
ANA (BAP)	0,025	$\hat{y}^{**} = 931,97x^2 - 103,44x + 4,9566$	75,35	0,06	2,09
ANA (BAP)	0,05	$\hat{y}^{**} = 1204,4x^2 - 142,59x + 6,367$	76,78	0,06	2,15
ANA (BAP)	0,075	$\hat{y}^{**} = 1649,5x^2 - 120,29x + 4,5019$	91,47	0,04	2,31
Número de folhas senescentes					
BAP		$\hat{y}^{**} = -44,663x + 8,1471$	81,40	0	8,14
ANA		$\hat{y}^{**} = -27,185x + 7,4335$	56,13	0	7,43

** e * significativo a 1 % e 5 % de probabilidade, respectivamente, pelo teste F da ANAVA.

De acordo com a equação de regressão (Tabela 8), estima-se que os melhores resultados para número de microestacas poderão ser encontradas em plantas submetidas às concentrações de 0,025 mg L⁻¹ de ANA e 0,08 mg L⁻¹ de BAP. Essa variável revela-se fundamental para o processo de micropropagação, tendo em vista que ela define a quantidade de explantes para realização de novos subcultivos, determinando assim a taxa de multiplicação (VIDAL et al., 2009).

As citocininas, dentre outras atuações, agem estimulando a formação de brotos, principalmente quando associados a uma auxina. Porém a natureza e a concentração desses reguladores irão variar de acordo com a espécie (GANA, 2010). Na espécie selecionada para este experimento, *Manihot flabellifolia* Pohl, a interação das doses de 0,025 mg L⁻¹ de ANA e de 0,05 mg L⁻¹ de BAP propiciou a maior média para número de brotos (8,37). Na ausência desses reguladores, se encontrou as maiores médias quanto ao número de folhas senescentes (8,14 e 7,43).

Experimento V: Efeito de diferentes concentrações d BAP e de ANA na micropropagação *in vitro* de *Manihot pentaphylla* Pohl.

Todas as variáveis mostraram efeito significativo para a interação ANA x BAP, exceto o número de folhas verdes, que, entretanto, apresentou resultados significativos para os fatores isolados BAP e ANA (Tabela 9).

Tabela 9. Resumo da análise de variância para altura de planta (AP; em cm), número de microestacas (NM), número de raízes (NR), número de brotações (NB), número de folhas verdes (NFV) e número de folhas senescentes (NFS) de *Manihot pentaphylla* Pohl, em função das concentrações de BAP e de ANA (mg L⁻¹).

FV	GL	QM					
		AP	NM	NR	NB	NFV	NFS
BAP	4	198,90**	3,47**	10,88**	0,40*	10,21**	1,76 ^{ns}
ANA	4	133,24**	6,91**	6,11**	1,62**	4,05**	6,06**
BAP x ANA	16	75,01**	1,71**	0,87**	0,37**	0,39 ^{ns}	3,91**
Erro	380	13,06	0,47	0,34	0,14	0,42	0,70
CV (%)		27,41	16,58	31,85	19,87	18,23	25,04
Média geral		13,18	17,44	3,43	3,35	12,84	11,59

ns = não significativo; ** e * significativo a 1 e 5%, respectivamente, pelo teste de F.

Foram obtidos os melhores resultados para altura de planta (17,90 cm) na ausência dos reguladores vegetais ANA e BAP (Tabela 10), bem como para número de microestacas (22,62) e número de raízes (5,75). Quanto ao número de brotos, a maior média estimada (4,36) aconteceu no tratamento sem adição de ANA, mas contendo 0,1 mg L⁻¹ de BAP.

Tabela 10. Equações de regressão polinomial, coeficientes de determinação (R^2), dose ótima e valores estimados da altura de planta (cm), número de microestacas, número de brotações, número de folhas verdes e número de folhas senescentes de *Manihot pentaphylla* Pohl), em função das concentrações de BAP e de ANA (mg L^{-1}).

Interações	Doses (mg L^{-1})	Equação	R^2 (%)	Dose ótima	Valor estimado
Altura de planta (cm)					
BAP (ANA)	0,025	$\hat{y}^{**} = 1793,9x^2 - 207,98x + 18,68$	63,33	0,06	12,65
BAP (ANA)	0,05	$\hat{y}^{**} = 1520,1x^2 - 141,91x + 13,387$	93,88	0,05	10,70
ANA (BAP)	0	$\hat{y}^{**} = -52,93x + 17,908$	69,85	0,00	17,90
ANA (BAP)	0,05	$\hat{y}^* = 855,03x^2 - 144,37x + 16,598$	88,94	0,08	10,50
ANA (BAP)	0,075	$\hat{y}^{**} = 1040,7x^2 - 72,959x + 11,159$	61,00	0,04	9,88
ANA (BAP)	0,1	$\hat{y}^{**} = -33,527x + 16,084$	63,18	0,00	16,08
Número de microestacas					
BAP (ANA)	0,05	$\hat{y}^{**} = 2081,9x^2 - 240,11x + 20,029$	92,94	0,06	13,11
BAP (ANA)	0,075	$\hat{y}^{**} = 2198,3x^2 - 279,62x + 20,926$	70,48	0,06	12,03
ANA (BAP)	0	$\hat{y}^* = -42,895x + 22,62$	95,32	0,00	22,62
ANA (BAP)	0,025	$\hat{y}^* = -41,172x + 17,645$	62,37	0,00	17,64
ANA (BAP)	0,075	$\hat{y}^* = 3136,5x^2 - 425,05x + 25,929$	89,84	0,07	11,53
ANA (BAP)	0,1	$\hat{y}^* = -41,149x + 20,033$	63,25	0,00	20,03
Número de raízes					
BAP (ANA)	0,05	$\hat{y}^{**} = 820,82x^2 - 109,71x + 5,4799$	92,29	0,07	1,81
BAP (ANA)	0,075	$\hat{y}^{**} = 525,46x^2 - 71,595x + 5,112$	55,28	0,07	2,67
BAP (ANA)	0,1	$\hat{y}^{**} = -24,762x + 3,4894$	75,78	0,00	3,49
ANA (BAP)	0	$\hat{y}^* = -17,562x + 5,7576$	78,93	0	5,75
ANA (BAP)	0,025	$\hat{y}^{**} = -23,233x + 5,4429$	82,50	0	5,44
ANA (BAP)	0,05	$\hat{y}^{**} = -27,629x + 4,4539$	66,41	0	4,45
ANA (BAP)	0,075	$\hat{y}^* = 472,03x^2 - 51,357x + 2,5569$	99,64	0,05	1,16
ANA (BAP)	0,1	$\hat{y}^* = -426,33x^2 + 9,1338x + 4,6181$	79,38	0,01	4,66
Número de brotos					
BAP (ANA)	0,075	$\hat{y}^* = -13,965x + 3,7382$	69,31	0,00	3,74
ANA (BAP)	0,075	$\hat{y}^{**} = 501,58x^2 - 76,745x + 5,4756$	92,82	0,08	2,54
ANA (BAP)	0,1	$\hat{y}^{**} = -23,249x + 4,3616$	95,69	0,00	4,36
Número de folhas verdes					
BAP		$\hat{y}^* = 1228,4x^2 - 178,59x + 17,375$	92,84	0,07	10,88
ANA		$\hat{y}^* = 652,29x^2 - 103,12x + 15,601$	93,69	0,08	11,52
Número de folhas senescentes					
BAP (ANA)	0,025	$\hat{y}^* = 36,019x + 11,271$	75,38	0,1	14,87
BAP (ANA)	0,05	$\hat{y}^* = 22,622x + 8,4166$	78,50	0,1	10,68
ANA (BAP)	0,075	$\hat{y}^* = 2053x^2 - 275,17x + 18,558$	92,03	0,07	9,36
ANA (BAP)	0,1	$\hat{y}^* = -61,488x + 15,006$	95,22	0	15,01

** e * significativo a 1 % e 5 % de probabilidade, respectivamente, pelo teste F da ANAVA.

De acordo com os valores estimados pela equação de regressão (Tabela 10), apenas a adição de $0,08 \text{ mg L}^{-1}$ de ANA propicia a manutenção de um maior número de folhas verdes (11,52). Já o tratamento com $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP, também na ausência

de ANA, favorece a senescência das folhas, porém essa mesma combinação apresentou médias relevantes para altura de planta (16,08), número de microestacas (20,03) e número de brotos (4,36).

CONCLUSÕES

Para a *Manihot violaceae* (Pohl) Müll. Arg. e *M. flabellifolia* Pohl dentro das concentrações de BAP e ANA estudadas foram encontrados resultados favoráveis a multiplicação *in vitro*.

Na multiplicação *in vitro* dos genótipos *M. pseudoglaziovii* Pax & Hoff, *M. chlorosticta* Standl. & Goldman e *M. pentaphylla* Pohl não há necessidade da adição de ANA e BAP no meio de cultura.

REFERÊNCIAS

- ASMAR, S. A.; RESENDE, R. F.; ARARUNA, E. C.; MORAIS, T. P.; LUZ, J. M. Q. Concentrações de BAP sobre a proliferação *in vitro* de brotos de *Lippia alba* [(Mill.) N. E. Brown]. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. esp., p.149-153, 2012. Disponível em: <www.scielo.br/pdf/rbpm/v14nspe/04.pdf> Acesso em: 09 mar. 2017.
- CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA M. E. Meios nutritivos. 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, 1999. v. 2, p. 87-132.
- CARVALHO, J. M. F. C.; VIDAL, M. S. **Noções de cultivo de tecidos vegetais**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2003. 40 p. (Embrapa Algodão. Documentos, 116).
- CARVALHO, J. M. F. C.; SILVA, M. M. de A.; MEDEIROS, M. J. L. e. **Fatores inerentes à micropropagação**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2006. 28 p. (Embrapa Algodão. Documentos, 148). Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPA/18325/1/DOC148.pdf>>. Acesso em: 12 jan. 2017.
- CARVALHO, M. de J. da S. de. **Adequação da condição de crescimento mínimo para a conservação *in vitro* de germoplasma de citros**. 2013. 84 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, Bahia.
- COELHO, M. C. F. **Germinação de sementes e propagação *in vitro* de sucupira branca (*Pterodon pubescens* (Benth.) Benth.)**. 1999. 119 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Lavras.
- COPATTI, A.; LOY, F.; CRUZ, J. G.; SCHWARTZ, C. D.; MELLO-FARIAS, P. Reguladores vegetais na propagação *in vitro* de Tamarileiro (*Solanum betaceum*). **Revista Congrega Urcamp**, v. 13A, p. 822-831, 2016. Disponível em: <trabalhos.congrega.urcamp.edu.br/index.php/jpgp/article/view/960/1033>. Acesso 01 mar. 2017.
- DILL, L. **Estratégias de micropropagação de *Calibrachoa sellowiana* (Sendtn.) Wijsman e *Rosmarinus officinalis* L.** Curitiba: Universidade Federal de Santa Catarina, 2014. 37 p. Disponível em: <<https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/127418/TCC.Leandro%20Dill.2014.pdf?sequence=1&isAllowed=y>>. Acesso em: 09 mar. 2017.
- FERMINO JUNIOR, P.C. P.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Germinação e propagação *in vitro* de cerejeira (*Amburana acreana* (Ducke) A.C. Smith-Fabaceae). **Ciência Florestal**, v. 22, n. 1, p. 1-9, 2012. Disponível em: <<http://www.bioline.org.br/pdf?cf12001>>. Acesso em: 09 mar. 2017.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2013.

GANNA, A. S. The role of synthetic growth hormones in crop multiplication and improvement. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 51, p. 10330-10334, 2010.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. 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. v. 1, p. 183-260.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília, DF: ABCTP: Embrapa-CNPq, 1999. p. 99-170.

KERBAUY, G. B.; ESTELITA, M. E. M. Formation of protocorm-like bodies from sliced root apices of *Clowesia warszewiczii*. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 8, n. 2, p. 157-159, 1996.

KERBAUY, G. B. **Fisiologia vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 452 p.

KOZAI, T.; KUBOTA, C.; BYOUNG, R. J. **Environmental control for the large-scale production of plants through in vitro techniques**. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 51, p. 49-56, 1997.

LAMEIRA, O. A.; LEMOS, O. F.; MENEZES, I. C. de; PINTO, J. E. B. P. **Cultura de tecidos (manual)**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2000. 41p. (Embrapa Amazônia Oriental. Documentos, 66).

MALLÓN, R.; RODRÍGUEZ-TOBOL, J.; GONZÁLEZ, M. L. Shoot regeneration from *in vitro* - derived leaf and root explants of *Centaurea ulreiae*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 106, p. 523-530, 2011.

MENDONÇA, J. de O.; LEDO, C. A. da; SOUZA, A. da S.; CARVALHO, M. de J. da S. de. Reguladores de crescimento ANA e BAP na micropropagação de espécie silvestre de mandioca *Manihot chlorosticta* Standl. & Goldman. In: JORNADA CIENTÍFICA, 9., 2015. **Resumos...** Cruz das Almas, BA: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2015. Disponível em: <<https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/1031462/1/ReguladoresdecrescRegula.pdf>>. Acesso em: 14 de jan. 2017.

MIRANDA, N. A.; TITON, M.; PEREIRA, I. M.; FERNANDES, J. S. C.; CONÇALVES, J. F.; ROCHA, F. M. Meio de cultura, reguladores de crescimento e formas de vedação de tubos de ensaio na multiplicação *in vitro* de candeia (*Eremanthus incanus* (Less.) Less). **Scientia Forestalis**, v. 44, n. 112, p. 1009-1018, 2016.

MORAIS, T. P.; LUZ, J. M. Q.; SILVA, S. M.; RESENDE, R. F.; SILVA, A. S. Aplicações da cultura de tecidos em plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 1, p. 110-121, 2012.

MOURA, L. C. de; TITON, M.; MIRANDA, N. A.; MOREIRA, T. P.; OLIVEIRA, M. L. R. Multiplicação e alongamento *in vitro* de vinhático (*Plathymenia reticulata*). **Scientia Forestalis**, v. 40, n. 96, p. 499 - 505, 2012. Disponível em: <<http://www.ipef.br/publicacoes/scientia/nr96/cap08.pdf>>. Acesso em: 09 mar. 2017.

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

NAVROSKI, M. C. I.; WALDOW, D. A. G.; REINIGER, L. R. S.; GOLLE, D. P.; CURTI, A. R.; PEREIRA, M. O. Multiplicação *in vitro* de segmentos apicais caulinares de segurelha (*Satureja hortensis* L.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, n. 1, p. 117-121, 2014.

OLIVEIRA, K. S. de; FREIRE, F. A. de M.; ALOUFA, M. A. I. Efeito de 6-benzilaminopurina e ácido naftalenoacético sobre a propagação *in vitro* de *Hancornia speciosa* Gomes. **Floresta**, v. 46, n. 3, p. 335-342, 2016. Disponível em: <<http://revistas.ufpr.br/floresta/index>>. Acesso em: 01 mar. 2017.

PASQUAL, M.; HOFFMANN, A; RAMOS, J. D. **Cultura de tecidos vegetais: tecnologia e aplicações**. Lavras: UFLA/FAEPE, 1997. 159 p.

REIS, E, S.; PINTO, J. E. B. P.; ROSADO, L. D. S.; CORRÊA, R. M. Influência do meio de cultura na germinação de sementes *in vitro* e taxa de multiplicação de *Melissa officinalis* L. **Ceres**, v. 55, n. 3, p. 160-167, 2008. Disponível em <www.redalyc.org/pdf/3052/305226701014.pdf>. Acesso em: 01 mar. 2017.

ROGALSKI, M.; GUERRA, M. P.; SILVA, A. L. Multiplicação *in vitro* da ameixeira 'Santa Rosa': efeito da citocinina BAP. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 25, n. 2, p. 365-367, 2003.

SALISBURY, F.; ROSS, C. W. **Plant physiology**. Belmont: Wadsworth, 1992. 682 p.

SASSO, S. A. Z. **Propagação vegetativa de jabuticabeira**. 2009. 64 f. Dissertação(Mestrado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco. Disponível em: <[repositorio.utfpr.edu.br/jspui/bitstream/1/271/1/PB_PPGA_M_Sasso, Simone Aparecida Zolet_2009.pdf](http://repositorio.utfpr.edu.br/jspui/bitstream/1/271/1/PB_PPGA_M_Sasso_Aparecida_Zolet_2009.pdf)>. Acesso em: 14 de jan. 2017.

SKOOG, F.; MILLER, C. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultured *in vitro*.. **Symposia of the Society for Experimental Biology**, V. 54, N. 11, P.118-131, 1957.

SOUZA JUNIOR, L. de. **Tipo de minijardim clonal e efeito do ácido indolbutírico na miniestaqueia de *Grevillea robusta* A. Cunn. (Proteaceae)**. 2007. 66 f. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

SOUZA, A. da S.; JUNGHANS, T. G.; SOUZA, F. V. D.; SANTOS-SEREJO, J. A. dos; MENEZES, M. C.; SILVEIRA, D. G., SANTOS, V. da S. Micropropagação da mandioca. In: JUNGHANS, T. G.; SOUZA, A. da S. (ed.). **Aspectos práticos da micropropagação de plantas**. 2 ed. rev. e ampl. Brasília, DF: Embrapa , 2013. p. 345-371.

STANICA, F. C. Si colab, 2002 – **Micropropagation of horticultural plants**. Editura Ceres, București.

TORRES, A. C.; FERREIRA, A. T.; SÁ, F. G. de; BUSO, J. A.; CALDAS, L. S.; NASCIMENTO, A. S.; BRÍGIDO, M. de M.; ROMANO, E. **Glossário de biotecnologia vegetal**. Brasília, DF: Embrapa Hortaliças, 2000. 128 p.

WENDLING, I.; DUTRA, L. F.; GROSSI, F. **Produção de mudas de espécies lenhosas**. Colombo: Embrapa Florestas, 2006. 56 p. (Embrapa Florestas. Documentos, 130).

VIDAL , A. M.; SOUSA, F. V. D.; COSTA, M. A. P. de C.,; SOUZA, A. da S. Micropropagação de variedades de mandioca cultivadas no Nordeste. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MANDIOCA, 13., 2009, Botucatu. **Anais**. Botucatu: FAPESP, 2009. p. 479-483. Disponível em:<www.cerat.unesp.br/Home/compendio/trabalhos/agricultura/55MICROPROPAGA_____O_DE_VARIEDADES_DE_MANDIOCA_CULTIVADAS_NO_NORDESTE.pdf>. Acesso: 09 mar. 2017.

VIDAL, A. M.; SOUZA, A. da S.; MENEZES, M. C.; SILVEIRA, D. M. de S.; SILVA NETO, H. P. daS.; SANTOS, E. B. **Micropropagação da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) em meio suplementado com um fertilizante solúvel**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MANDIOCA, 15., 2013, Salvador. **Anais...** Salvador: Sociedade Brasileira de Mandioca, 2013. Não paginado. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/95634/1/MICROPROPAGACA_O-DA-MANDIOCA-084-melhoram-21611-ANTONIO-SOUZA.pdf>. Acesso em: 14 de Jan. 2017.

VILLA, F.; PASQUAL, M.; ASSIS, F. A.; PIO, L. A. S. Sacarose e um aditivo orgânico complexo na micropropagação de amoreira-preta (*Rubus* sp.). *Plant Cell Culture and Micropropagation*, v. 5, n. 1, p. 1- 8, 2009.

CAPÍTULO II
CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DE ESPÉCIES SILVESTRES DE *Manihot*

CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DE ESPÉCIES SILVESTRES DE *Manihot*

RESUMO:

A conservação *in vitro* sob condições de crescimento lento permite prolongar os períodos entre uma subcultura e outra, sem afetar a viabilidade da planta, além de reduzir o risco de contaminação e possibilitar a preservação de grandes coleções em espaço reduzido. Esse é um método especialmente útil para as espécies silvestres de *Manihot*, que, distintivamente da espécie cultivada, são notoriamente difíceis de manter em coleções de campo fora do seu habitat natural. Para isso, nos experimentos descritos neste capítulo, tiveram como objetivo estabelecer protocolos de conservação *in vitro* de cinco espécies silvestres de *Manihot*, utilizando para este fim o meio de cultura 8S, como meio básico, suplementado com vinte e cinco tratamentos advindos das combinações entre cinco concentrações de paclobutrazol (0 mg L⁻¹; 0,10 mg L⁻¹; 0,20 mg L⁻¹; 0,30 mg L⁻¹ e 0,40 mg L⁻¹) e sacarose (0 g L⁻¹, 5 g L⁻¹, 10 g L⁻¹, 15 g L⁻¹ e 20 g L⁻¹), aplicados em cinco genótipos de espécies silvestres de *Manihot*, *M. violaceae* (Pohl) Müll. Arg., *M. chlorosticta* Standl. & Goldman, *M. flabellifolia* Pohl, *M. pseudoglaziovii* Pax & Hoff e *M. tristis* Müll. Arg. Após 120 de cultivo, as variáveis avaliadas, altura de planta (cm), número de microestacas com 1 cm, número de raízes (NR), número de brotações (NB), número de folhas verdes e número de folhas senescentes, permitiram verificar que a combinação entre as doses de 0,1 mg L⁻¹ de paclobutrazol e 5 g L⁻¹ de sacarose em meio básico 8S revelou um efeito expressivo para a conservação *in vitro* do genótipo *M. pseudoglaziovii* Pax & Hoff; para a *M. violacea* (Pohl) Müll. Arg. a concentração de 10 g L⁻¹ de sacarose associada à 0,2 mg L⁻¹ de paclobutrazol apresentou melhores resultados, enquanto a espécie *M. chlorosticta* Standl. & Goldman demonstrou melhor comportamento quando submetida ao tratamento de 0,3 mg L⁻¹ de paclobutrazol sem sacarose; Para as espécies *M. flabelifolia* Pohl e *M. tristis* Müll. Arg. as concentrações utilizadas de sacarose e de paclobutrazol não se mostraram eficientes para conservação *in vitro* das plantas.

Palavras chave: Paclobutrazol, Preservação *in vitro* de germoplasma, Sacarose

IN VITRO CONSERVATION OF WILD SPECIES OF *Manihot*

ABSTRACT:

The *in vitro* conservation under a slow growing conditions allows to increase periods between one subculture and another, without affecting the plant viability, besides reducing the risk of contamination and allowing the preservation of large collections in a reduced space. This is a particularly useful method for the wild species of *Manihot*, which, distinct from the cultivated species, are notoriously difficult to maintain in field collections outside their natural habitat. For this, in the experiments described in this chapter, the objective was to establish *in vitro* conservation protocols of five wild species of *Manihot*, using for this purpose the 8S culture medium as a basic medium, supplemented with twenty-five treatments resulting from the combinations of five concentrations of paclobutrazol (0 mg L⁻¹, 0.10 mg L⁻¹, 0.25 mg L⁻¹ and 0.40 mg L⁻¹) and sucrose (0 gL⁻¹, 5 gL⁻¹, 10 gL⁻¹, 15 gL⁻¹ And 20 gL⁻¹), applied to five genotypes of wild species of *Manihot*, *M. violaceae* (Pohl) Müll. Arg., *M. chlorosticta* Standl. & Goldman, *M. flabellifolia* Pohl, *M. pseudoglaziovii* Pax & Hoff and *M. tristis* Müll. Arg. After 120 days of cultivation, the evaluated variables, plant height (cm), number of micro-shoots with 1 cm, number of roots, number of shoots, number of green leaves and number of senescent leaves allowed to verify that the combination between the doses of 0.1 mg L⁻¹ paclobutrazol and 5 g L⁻¹ sucrose in 8S showed an expressive effect for the *in vitro* conservation of the genotype *M. pseudoglaziovii* Pax & Hoff; For *M. violacea* (Pohl) Müll. Arg. The concentration of 10 g L⁻¹ of sucrose associated with 0.2 mg L⁻¹ of paclobutrazol showed better responses, whereas the *M. chlorosticta* Standl. & Goldman demonstrated better behavior when submitted to paclobutrazol 0.3 mg L⁻¹ treatment without sucrose; The species *M. flabelifolia* Pohl and *M. tristis* Müll. Arg. The concentrations of sucrose and paclobutrazol used were not efficient for *in vitro* plant conservation.

Keywords: Paclobutrazol, *In vitro* germplasm preservation, Sucrose

INTRODUÇÃO

O germoplasma é o material vegetal que integra informações referentes à composição genética das diferentes espécies, compreendendo, portanto, uma relevante fonte de variabilidade genética disponível para o melhoramento de plantas (BESPALHOK et al., 2007). Sua conservação é realizada por meio de três estratégias complementares: conservação *in situ*, *on farm* e *ex situ*.

A conservação *in situ* refere-se à preservação de recursos genéticos realizada em reservas genéticas, reservas extrativistas e reservas de desenvolvimento sustentável, podendo ser também em áreas protegidas, seja de âmbito federal, estadual ou municipal (BRASIL, 2016). Consiste em preservar e manter populações específicas, no seu habitat natural, e no caso das espécies cultivadas ou domesticadas, no ambiente em que tenham desenvolvido suas características específicas, sendo, dessa forma, um sistema de conservação dinâmico, considerando-se que essas espécies estão sujeitas à seleção ambiental determinado por fatores bióticos e abióticos (SIMON, 2010; VALOIS et al., 1996).

A conservação *on farm* é um componente importante da conservação *in situ*. Consiste na preservação dos recursos genéticos de espécies cultivadas por agricultores e comunidades locais e tradicionais, detentoras de grande diversidade vegetal, essenciais para a segurança alimentar das populações, possibilitando sua evolução mediante recursos naturais e intervenção humana (BRASIL, 2016; RANA et al., 2008; SANTONIERI, 2015).

Em complementariedade à conservação *in situ* e *on farm* está a conservação de espécies, tanto silvestres quanto cultivadas, fora do ambiente natural, denominada conservação *ex situ* (JOSÉ, 2010). Esta é, muitas vezes a única forma viável para a conservação de espécies raras e ameaçadas de extinção (RAMSAY et al., 2000), sendo uma estratégia crescentemente utilizada não somente para os recursos genéticos considerados de alto risco de erosão genética, mas para os que têm importância na alimentação humana e na agricultura, garantindo o seu fácil acesso no futuro.

Existem várias técnicas de conservação de germoplasma *ex situ*, como jardins botânicos, banco de germoplasma (BAG) em campo, BAG *in vitro* e banco de sementes. Dentre elas a cultura de tecidos representa um imenso potencial para a preservação da biodiversidade, pois possibilita o cultivo *in vitro* de espécies

endêmicas, espécies protegidas, novas variedades e até mesmo espécies ameaçadas de extinção, haja vista que são mantidas em ambiente protegido, sob condições controladas, evitando, desse modo, a exposição das plantas a estresses ambientais, insetos e infecções patogênicas (WITHERS; ENGELMANN, 1997). Porém, o cultivo *in vitro* necessita de frequentes subcultivos, o que pode, em alguns casos, induzir instabilidade genética (BAIRU et al., 2011), colocando em risco a aplicação dessa metodologia para a preservação de alguns genótipos. Uma alternativa válida é a aplicação de técnicas de conservação por crescimento lento, que permitem a diminuição do número de subcultivos e consequente redução dos riscos de variação genética e dos custos operacionais, considerando que não necessita de constante manutenção.

Conservação *in vitro* sob condições de crescimento lento, por meio da redução do metabolismo celular, do crescimento dos tecidos e do desenvolvimento dos explantes, permite prolongar os períodos entre uma subcultura e outra, sem afetar sua viabilidade. Essa técnica reduz o risco de contaminação e das chances do aparecimento de variabilidade somaclonal, e permite preservar grandes coleções em espaço reduzido. O retardo no crescimento é normalmente alcançado por meio da variação de fatores químicos (composição do meio de cultivo), fatores físicos (alterações das condições de incubação) e da combinação de ambos (ASHMORE, 1997; MARCO-MEDINA; CASAS, 2012; ROCA et al., 1991).

As modificações no meio de cultivo podem envolver alterações na concentração ou natureza dos reguladores de crescimento, redução na concentração de elementos minerais, adição de compostos osmóticos como manitol, sorbitol e sacarose, e acréscimo de retardantes de crescimento (WITHERS, 1997). A indução ao crescimento lento também inclui as variações nas condições ambientais, principalmente em relação à redução da temperatura, da intensidade luminosa e do fotoperíodo.

Nas plantas em campo, um dos principais fatores que determinam o crescimento é a síntese, o transporte e o metabolismo do açúcar, uma excelente fonte de carbono e energia (LEMOINE et al., 2013). Contudo, como as culturas *in vitro* não possuem condições adequadas para a realização da fotossíntese, por conseguinte, a adição de açúcares ao meio de cultura é essencial para atender a demanda energética (AZCÓN-BIETO; TALÓN, 2013; RUKUNDO et al., 2012), atuando sobre a fisiologia, o crescimento e a diferenciação das células. A sacarose constitui a fonte de carboidrato

mais utilizada no meio de cultura e vários estudos concluíram que ela exerce influência sobre a taxa de crescimento celular (DECCETTI, 2004; LEIFERT et al., 1995).

O crescimento lento em culturas *in vitro* pode também ser promovido pela adição de agentes osmóticos, que se refere a substâncias que induzem alterações no potencial osmótico do meio de cultura, sem interferir no metabolismo do carbono da planta (FARIA et al., 2006). A sacarose também é um agente osmótico frequentemente utilizado e age no meio de cultura captando, por gradiente osmótico, a água intracelular remanescente, permitindo que o crescimento aconteça de forma mais lenta (ARRIGONI-BLANK et al., 2014; DUMET et al., 1993).

Para muitas espécies de plantas, os inibidores de crescimento aplicados ao meio de conservação *in vitro* são necessários para controlar o crescimento e retardar o envelhecimento (SILVA, 2008; TAIZ; ZEIGER, 2004). O paclobutrazol consiste em um regulador de crescimento vegetal que atua inibindo a biossíntese da giberelina, reduzindo sensivelmente tanto a divisão quanto o alongamento celular, e, conseqüentemente retardando o crescimento da planta sem que ocorra citotoxicidade (RADEMACHER, 2000; SILVA et al., 2003).

Outros parâmetros que afetam a eficiência da conservação por crescimento lento a se considerar é o tipo de explante, pois, geralmente, o crescimento lento é aplicado em tecidos organizados como segmentos do caule, ao invés de tecidos indiferenciados, tais como calos, por serem mais propensos a variação somaclonal.

Conservação *in vitro* de espécies silvestres de *Manihot*

Numa perspectiva a longo prazo, as técnicas para a conservação *in vitro* de mandioca são geralmente mais econômicas e menos arriscadas em comparação a coleções de campo. Conjuntamente apresentam outras vantagens, como a redução do espaço necessário para manutenção dessas espécies, a redução de perdas devido a fatores climáticos e inerentes ao solo, a possibilidade de manter cópias de segurança das plantas que estão em campo e a facilidade de intercâmbio de germoplasma. Esse é um método especialmente útil para as espécies silvestres de *Manihot*, que distintivamente da espécie cultivada, são notoriamente difíceis de manter em coleções de campo fora do seu habitat natural e até mesmo *in vitro*.

Porém, esse tipo de conservação utiliza técnicas totalmente manipuláveis e conseqüentemente adaptáveis às condições particulares exigidas por cada espécie,

o que justifica a necessidade de estudos específicos que estabeleçam protocolos adequados de conservação.

Nessa perspectiva, esse trabalho se designou a avaliar os efeitos de diferentes concentrações de paclobutrazol e sacarose, na conservação *in vitro*, sob crescimento lento, em cinco espécies silvestres de *Manihot*, visando contribuir com o estabelecimento de protocolos de conservação *in vitro* dessas espécies selecionadas.

MATERIAL E MÉTODOS

Local de realização dos experimentos

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Cultura de Tecidos (LCT) do Núcleo de Biologia Avançada (NBIO) da Embrapa Mandioca e Fruticultura, em Cruz das Almas, Bahia.

Material vegetal

Foram utilizados cinco genótipos silvestres de *Manihot*, *M. violaceae* Pohl Müll. Arg., *M. chlorosticta* Standl. & Goldman, *M. flabellifolia* Pohl, *M. pseudoglaziovii* Pax & Hoff e *M. tristis* Müll. Arg.), previamente micropropagadas no LCT.

Preparação do meio de cultura

O meio de cultura básico utilizado foi o 8S (CIAT, 1984), acrescido das concentrações de paclobutrazol (PBZ) (0 mg L⁻¹; 0,10 mg L⁻¹; 0,20 mg L⁻¹; 0,30 mg L⁻¹ e 0,40 mg L⁻¹) e de sacarose (0 g L⁻¹, 5 g L⁻¹, 10 g L⁻¹, 15 g L⁻¹ e 20 g L⁻¹), combinadas entre si. O pH dos meios foi ajustado para 5,8 acrescentando, quando necessário NaOH ou HCl 1N. Como agente gelificante foi adicionado Phytigel® (2,4 g L⁻¹), dissolvido por aquecimento em forno de microondas. Por fim, uma alíquota de 10 mL foi distribuída por tubo de ensaio de 25 mm de diâmetro e 150 mm de tamanho, em um total de 20 tubos por tratamento, que foram fechados com papel de alumínio, embalados em sacos plásticos e submetidos a autoclavagem por 20 minutos, a 120°C.

Instalação dos experimentos

Essa etapa foi realizada em câmara de fluxo laminar, na qual, utilizando pinça e bisturi, as plantas foram seccionadas em segmentos nodais de aproximadamente 1 cm, contendo uma gema. Cada explante foi posteriormente introduzido no tubo de ensaio contendo os 10 mL do meio de cultura, fechado com filme esticável de PVC e etiquetado com o código de identificação correspondente ao tratamento do meio de cultura, a espécie propagada e a data do cultivo. As culturas então foram incubadas em sala de conservação (Figura 2), sob condições ambientais que favorecem o crescimento lento das plantas: temperatura de 22 ± 1 °C e um fotoperíodo de 12 horas com intensidade luminosa de $18,5 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

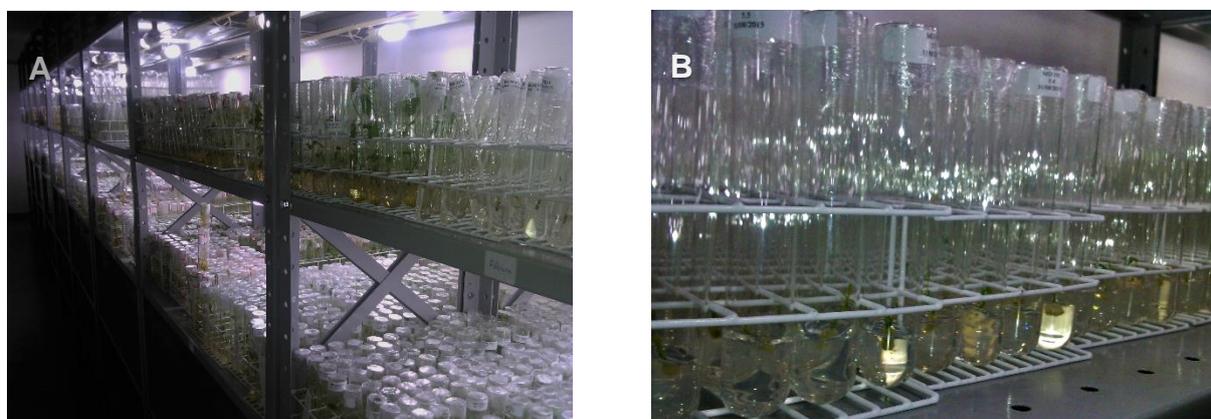


Figura 2. Sala de conservação (A) e detalhe dos tubos de ensaio nas estantes (B). Foto: Deyse Silveira

Avaliação dos experimentos

A avaliação foi realizada aos 120 dias após a inoculação dos explantes, sendo as características avaliadas: altura de planta (AP; cm), número de microestacas com 1 cm (NM), número de raízes (NR), número de brotações (NB), número de folhas verdes (NFV) e número de folhas senescentes (NFS).

Análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial 5×5 , com 20 repetições, cada uma representada por uma planta cultivada em um tubo de ensaio. Cada combinação dos fatores estudados, PBZ e

sacarose, foi aplicada nos cinco genótipos selecionados de forma isolada, resultando, portanto, em cinco experimentos.

Os dados coletados na avaliação foram submetidos ao teste F da análise de variância. As médias do paclobutrazol e da sacarose foram ajustados modelos de regressão polinomial. As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2013).

Os valores do número de microestacas, número de raízes, número de brotações, número de folhas verdes e número de folhas senescentes foram transformados em $\sqrt{x + 0,5}$, visando o atendimento das pressuposições da análise de variância.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Experimento I: Efeito de diferentes concentrações de paclobutrazol (PBZ) e sacarose (SAC) na conservação *in vitro* do genótipo *Manihot pseudoglaziovii* Pax & Hoff.

Utilizando-se como meio de cultura básico o 8S, foram testados neste, bem como nos subsequentes experimentos, diferentes concentrações de paclobutrazol (PBZ), como retardante de crescimento, e sacarose (SAC), como fonte de carbono e regulador osmótico, considerando-se que para que a conservação *in vitro* de germoplasma seja eficiente é imprescindível que a redução do metabolismo esteja associada à manutenção da viabilidade das plantas. Nessa perspectiva, duas das seis variáveis avaliadas (altura de planta e número de folhas senescentes) devem apresentar médias inferiores correlacionadas a valores mais elevados das demais variáveis (número de microestacas, número de raízes, número de brotos e número de folhas vivas), como forma de identificar que o crescimento mínimo não inviabilize a multiplicação, recuperação e resgate posterior das plantas.

Na Tabela 1 observa-se, no resumo da análise de variância, que a interação PBZ x SAC apresentou efeito altamente significativo ($p < 0,01$) para todas as variáveis avaliadas no genótipo *M. pseudoglaziovii* Pax & Hoff. Os coeficientes de variação (CV) obtidos nesse estudo oscilaram entre 10,54%, para número de brotos (NB), e 36,96%, para número de folhas senescentes (NFS), valores que podem estar associados à instabilidade das plantas em experimentos *in vitro*, sendo considerados normais para

trabalhos em cultura de tecidos vegetais (WERNER et al., 2012), assegurando assim uma boa precisão experimental.

Tabela 1. Resumo da análise de variância para altura de planta (AP, em cm), número de microestacas (NM), número de raízes (NR), número de brotações (NB), número de folhas verdes (NFV) e número de folhas senescentes (NFS) do genótipo *Manihot pseudoglaziovii* Pax & Hoff, em função das concentrações de paclobutról (PBZ; mg L⁻¹) e de sacarose (SAC; g L⁻¹).

FV	GL	QM					
		AP	NM	NR	NB	NFV	NFS
PBZ	4	139,58**	2,43**	0,29*	0,036 ^{ns}	0,42 ^{ns}	1,03**
SAC	4	1282,29**	22,11**	35,95**	0,057**	7,98**	1,44**
PBZ x SAC	16	129,22**	2,61**	3,38**	0,036**	1,17**	0,37**
Erro	389	8,03	0,12	0,12	0,02	0,18	0,13
CV (%)		30,90	14,15	18,30	10,54	16,24	36,96
Média geral		9,17	5,75	3,79	1,17	6,83	0,59

ns = não significativo; * (P<0,05); ** (P<0,01).

Na Tabela 2 estão os modelos de regressão polinomial, onde se observa os ajustes dos modelos de 1º e 2º graus, com coeficiente de determinação (R²) variando de 60,46% à 99,67%, na variável número de raízes (NR).

Tabela 2. Equações de regressão polinomial, coeficientes de determinação (R²), doses ótimas e valores estimados da altura de planta (cm), número de microestacas, número de brotações, número de folhas verdes e número de folhas senescentes do genótipo *Manihot pseudoglaziovii* Pax & Hoff, em função das concentrações de paclobutról (PBZ; mg L⁻¹) e de sacarose (SAC; g L⁻¹).

Interações	Doses	Equações	R ² (%)	Doses ótimas	Valores estimados
Altura de planta (cm)					
PBZ (SAC)	0	$\hat{y}^{**} = 194,385x^2 - 22,83x + 2,0198$	93,13	0,06	1,35
PBZ (SAC)	5	$\hat{y}^{**} = -134,94x^2 + 39,107x + 8,5023$	78,44	0,14	11,33
PBZ (SAC)	15	$\hat{y}^{**} = -92,534x^2 + 21,723x + 12,577$	99,35	0,12	13,85
PBZ (SAC)	20	$\hat{y}^{**} = -47,891x^2 + 6,2169x + 14,1$	91,97	0,06	14,30
SAC (PBZ)	0	$\hat{y}^{**} = -0,0449x^2 + 1,4547x + 2,2396$	95,57	16,20	14,02
SAC (PBZ)	0,1	$\hat{y}^{**} = -0,0387x^2 + 1,405x + 1,7771$	99,11	18,15	14,52
SAC (PBZ)	0,2	$\hat{y}^{**} = -0,0408x^2 + 1,2907x + 2,6777$	81,44	15,82	12,88
SAC (PBZ)	0,3	$\hat{y}^{**} = -0,04x^2 + 1,218x + 3,3391$	84,42	15,23	12,61
Número de microestacas					
PBZ (SAC)	0	$\hat{y}^{**} = 48,004x^2 - 11,263x + 1,5455$	95,88	0,12	8,80
PBZ (SAC)	5	$\hat{y}^{**} = -90,284x^2 + 25,474x + 6,0208$	86,11	0,14	7,82
PBZ (SAC)	10	$\hat{y}^{**} = -4,1315x + 7,764$	72,86	0	7,76

Tabela 2. Continuação

PBZ (SAC)	15	$\hat{y}^{**} = -51,698x^2 + 11,7x + 7,5095$	94,78	0,11	8,17
PBZ (SAC)	20	$\hat{y}^{**} = -7,5245x + 8,7853$	87,88	0	8,78
SAC (PBZ)	0	$\hat{y}^{**} = -0,0308x^2 + 0,9071x + 1,8354$	91,31	14,73	8,51
SAC (PBZ)	0,1	$\hat{y}^{**} = -0,0294x^2 + 0,9109x + 1,8017$	93,05	15,49	8,86
SAC (PBZ)	0,2	$\hat{y}^{**} = -0,028x^2 + 0,837x + 1,8732$	85,07	14,95	8,13
SAC (PBZ)	0,3	$\hat{y}^{**} = -0,0266x^2 + 0,6806x + 2,7745$	70,98	12,79	7,13
Número de raízes					
PBZ (SAC)	0	$\hat{y}^{**} = 47,959x^2 - 12,469x + 0,2878$	85,71	0,13	0,52
PBZ (SAC)	5	$\hat{y}^{**} = -66,122x^2 + 22,331x + 2,3201$	61,10	0,17	4,21
PBZ (SAC)	10	$\hat{y}^{**} = 41,801x^2 - 10,927x + 4,0022$	72,49	0,13	3,29
PBZ (SAC)	15	$\hat{y}^{**} = -48,113x^2 + 16,52x + 5,0007$	97,75	0,17	6,49
PBZ (SAC)	20	$\hat{y}^{**} = -35,021x^2 + 8,7863x + 6,3687$	60,46	0,13	6,92
SAC (PBZ)	0	$\hat{y}^{**} = -0,0122x^2 + 0,5164x + 0,2269$	97,67	21,16	5,69
SAC (PBZ)	0,1	$\hat{y}^{**} = -0,0007x^2 + 0,4086x + 0,0915$	99,67	29,19	6,05
SAC (PBZ)	0,2	$\hat{y}^{**} = -0,0059x^2 + 0,4241x + 0,5804$	77,10	35,94	8,20
SAC (PBZ)	0,3	$\hat{y}^{**} = -0,0323x^2 + 0,8674x + 0,2366$	97,47	13,43	6,06
Número de brotações					
PBZ (SAC)	5	$\hat{y}^{**} = -7,449x^2 + 2,5224x + 1,131$	62,55	0,17	1,34
PBZ (SAC)	20	$\hat{y}^{**} = 7,0502x^2 - 2,8531x + 1,3745$	94,35	0,20	1,09
SAC (PBZ)	0	$\hat{y}^{**} = 0,0136x + 1,0494$	83,20	20,00	1,32
SAC (PBZ)	0,4	$\hat{y}^{**} = 0,0159x + 0,9964$	78,33	20,00	1,31
Número de folhas vivas					
PBZ (SAC)	0	$\hat{y}^{**} = 43,844x^2 - 10,699x + 3,8231$	93,67	0,12	3,17
PBZ (SAC)	5	$\hat{y}^{**} = -62,971x^2 + 16,512x + 7,389$	84,69	0,13	8,47
PBZ (SAC)	15	$\hat{y}^{**} = -4,3481x + 8,4279$	68,65	0	8,43
PBZ (SAC)	20	$\hat{y}^{**} = -4,9165x + 7,9922$	84,23	0	7,99
SAC (PBZ)	0	$\hat{y}^{**} = -0,0294x^2 + 0,7644x + 3,9391$	96,81	13,00	8,91
SAC (PBZ)	0,1	$\hat{y}^{**} = -0,0258x^2 + 0,6866x + 4,0239$	75,85	13,31	8,59
SAC (PBZ)	0,2	$\hat{y}^{**} = -0,0259x^2 + 0,6741x + 3,9804$	95,01	13,01	8,37
SAC (PBZ)	0,3	$\hat{y}^{**} = -0,0259x^2 + 0,5804x + 4,509$	74,68	11,20	7,76
Número de folhas senescentes					
PBZ (SAC)	0	$\hat{y}^* = 1,1797x - 0,0778$	75,90	0,4	1,5
PBZ (SAC)	5	$\hat{y}^{**} = -16,405x^2 + 6,0938x + 0,2501$	65,15	0,19	0,81
SAC (PBZ)	0	$\hat{y}^{**} = 0,0543x - 0,0488$	66,17	20	0,92
SAC (PBZ)	0,1	$\hat{y}^{**} = -0,0068x^2 + 0,1977x + 0,0637$	87,38	14,54	1,50

** e * significativo a 1% e 5% de probabilidade, respectivamente, pelo teste F da ANAVA.

Na ausência da sacarose e 0,06 mg L⁻¹ de PBZ estima-se encontrar as menores alturas (1,35 cm) de planta. Todavia, partindo da premissa de que a altura de planta deve estar associada a outras variáveis, a dose de 0,1 mg L⁻¹ de paclobutrazol combinada com 5 g L⁻¹ de sacarose apresentou bons resultados, considerando que proporcionou uma das menores médias estimadas para altura de planta (11,33 cm) e a menor média para número de folhas senescentes (0,8). Adicionalmente, a combinação dessas duas concentrações de paclobutrazol e sacarose estão

associadas a valores mais elevados para número de microestacas (7,82), número de raízes (4,21), número de brotos (1,34) e número de folhas vivas (8,47), revelando o efeito expressivo dessa interação na conservação *in vitro* de *M. pseudoglaziovii* Pax & Hoff.

Experimento II: Efeito de diferentes concentrações de paclobutrazol (PBZ) e sacarose (SAC) na conservação *in vitro* da espécie *Manihot violacea* (Pohl) Müll. Arg.

Verifica-se no resumo da análise de variância (Tabela 3) que a interação BAP x ANA também foi significativa para todas as variáveis. Nota-se também uma flutuação de 4,56% (NB) para 28,93% (NFS) nos coeficientes de variação (CV).

Tabela 3. Resumo da análise de variância para altura de planta (AP, em cm), número de microestacas (NM), número de raízes (NR), número de brotações (NB), número de folhas verdes (NFV) e número de folhas senescentes (NFS) da espécie *Manihot violacea* (Pohl) Müll. Arg., em função das concentrações de paclobutrazol (PBZ; mg L⁻¹) e de sacarose (SAC; g L⁻¹).

FV	GL	QM					
		AP	NME	NR	NB	NFV	NFS
PBZ	4	97,03**	3,70**	1,49**	0,03 ^{ns}	1,10**	1,67**
SAC	3	731,77**	17,05**	20,50**	0,06 ^{ns}	1,18**	7,20**
PBZ x SAC	12	31,82**	0,76**	0,468**	0,06**	0,76**	0,71*
Erro	232	7,46	0,14	0,22	0,02	0,27	0,32
CV (%)		25,92	13,14	30,41	4,56	22,79	28,93
Média Geral		10,54	7,82	2,41	1,03	4,94	3,72

ns = não significativo; ** e * significativo a 1 e 5%, respectivamente, pelo teste de F.

Na Tabela 4 estão os modelos de regressão polinomial, onde se observa os coeficientes de determinação (R²) variando de 51,18 à 100% para número de folhas senescentes e altura de plantas, respectivamente.

Tabela 4. Equações de regressão polinomial, coeficientes de determinação (R²), dose ótima e valores estimados da altura da planta (cm), número de microestacas, número de brotações, número de folhas verdes e número de folhas senescentes do genótipo *Manihot violácea* em função das concentrações PBZ (mg L⁻¹) e sacarose (g L⁻¹).

Interações	Doses	Equação	R ² (%)	Dose ótima	Valor estimado
Altura de planta					
PBZ (SAC)	10	$\hat{y}^{**} = -123,99x^2 + 53,033x + 6,403$	99,89	0,22	12,12
PBZ (SAC)	20	$\hat{y}^{**} = -87,595x^2 + 37,878x + 10,542$	96,82	0,22	14,64
SAC (PBZ)	0	$\hat{y}^{**} = -0,0477x^2 + 1,7287x - 4,0548$	81,19	18,12	11,61

Tabela 4. Continuação

SAC (PBZ)	0,1	$\hat{y}^{**} = -0,0747x^2 + 2,5082x - 7,3493$	99,83	16,79	13,70
SAC (PBZ)	0,2	$\hat{y}^{**} = -0,0614x^2 + 2,2622x - 6,8006$	85,03	18,42	27,64
SAC (PBZ)	0,3	$\hat{y}^{**} = -0,0336x^2 + 1,329x + 1,2756$	99,79	19,78	14,42
SAC (PBZ)	0,4	$\hat{y}^{**} = -0,0472x^2 + 1,7851x - 5,3354$	100,00	18,91	11,54
Número de microestacas					
PBZ (SAC)	10	$\hat{y}^{**} = -118,84x^2 + 50,709x + 4,4984$	92,54	0,21	9,91
PBZ (SAC)	20	$\hat{y}^{**} = -65,974x^2 + 28,162x + 7,8843$	79,19	0,21	10,89
SAC (PBZ)	0	$\hat{y}^{**} = 0,3081x + 1,8264$	85,46	20,00	1,95
SAC (PBZ)	0,1	$\hat{y}^{**} = -0,0689x^2 + 2,2788x - 7,1521$	99,99	16,54	11,69
SAC (PBZ)	0,2	$\hat{y}^{**} = -0,0602x^2 + 2,0293x - 6,4898$	74,96	16,85	10,61
SAC (PBZ)	0,3	$\hat{y}^{**} = -0,0436x^2 + 1,4372x - 1,5547$	97,73	16,48	10,29
SAC (PBZ)	0,4	$\hat{y}^{**} = -0,0325x^2 + 1,2965x - 4,1308$	97,42	19,95	8,8
Número de raízes					
PBZ (SAC)	10	$\hat{y}^* = 13,613x^2 - 4,4513x + 1,5423$	91,86	0,16	1,18
PBZ (SAC)	15	$\hat{y}^{**} = 49,278x^2 - 15,164x + 2,5557$	95,92	0,15	1,39
SAC (PBZ)	0	$\hat{y}^{**} = 0,2925x - 1,4853$	99,53	20,00	4,36
SAC (PBZ)	0,1	$\hat{y}^{**} = 0,208x - 1,1$	84,76	20,00	3,06
SAC (PBZ)	0,2	$\hat{y}^* = 0,0271x^2 - 0,3421x + 1,2644$	93,68	6,31	0,18
SAC (PBZ)	0,3	$\hat{y}^{**} = 0,2755x - 1,4118$	99,96	20,00	4,10
SAC (PBZ)	0,4	$\hat{y}^* = -0,0131x^2 + 0,6681x - 3,101$	98,95	25,50	5,42
Número de brotos					
PBZ (SAC)	20	$\hat{y}^{**} = -0,3566x + 1,1309$	61,22	0	1,13
SAC (PBZ)	0	$\hat{y}^* = 0,0018x^2 - 0,0335x + 1,1324$	93,33	9,31	0,98
SAC (PBZ)	0,1	$\hat{y}^{**} = 0,0056x^2 - 0,1669x + 2,1719$	94,53	14,90	0,93
Número de folhas verdes					
PBZ (SAC)	10	$\hat{y}^{**} = 42,719x^2 - 18,968x + 6,3215$	66,99	0,22	4,22
SAC (PBZ)	0,2	$\hat{y}^{**} = 0,2784x + 0,9893$	99,99	20,00	6,56
SAC (PBZ)	0,3	$\hat{y}^* = 0,1233x + 3,5385$	78,12	20,00	6,00
SAC (PBZ)	0,4	$\hat{y}^* = -0,0363x^2 + 1,0823x - 2,225$	82,06	14,91	5,84
Número de folhas senescentes					
PBZ (SAC)	10	$\hat{y}^{**} = -45,502x^2 + 17,871x + 2,7504$	91,11	0,2	4,50
SAC (PBZ)	0	$\hat{y}^{**} = 0,2002x + 0,6675$	69,33	20	4,67
SAC (PBZ)	0,1	$\hat{y}^* = 0,1934x + 1,9438$	99,00	20	5,81
SAC (PBZ)	0,2	$\hat{y}^{**} = -0,0254x^2 + 0,7795x - 2,0139$	51,18	15,34	3,96
SAC (PBZ)	0,3	$\hat{y}^{**} = -0,0339x^2 + 0,9628x - 1,8461$	99,52	14,20	4,99
SAC (PBZ)	0,4	$\hat{y}^{**} = -0,0322x^2 + 1,1049x - 4,8788$	96,41	17,16	4,60

** e * significativo a 1 % e 5 % de probabilidade, respectivamente, pelo teste de F da ANAVA.

Neste experimento, a maior média estimada para número de raízes (5,42) ocorreu na associação de 0,4 mg L⁻¹ de PBZ e 25,50 g L⁻¹ de sacarose (Tabela 4), enquanto para número de brotos a dose 20 g L⁻¹ de sacarose, na ausência de PBZ apresentou a maior média estimada (1,13).

A interação entre as concentrações de 10 g L⁻¹ de sacarose e 0,2 mg L⁻¹ de PBZ influenciou tanto o número de folhas verdes (4,22), quanto o número de folhas

senescentes (4,50), além de apresentar um comportamento positivo quanto à altura da planta (12, 12) e número de microestacas (9,91), revelando-se o melhor tratamento para a espécie *Manihot violácea*.

Experimento III: Efeito de diferentes concentrações de paclobutrazol (PBZ) e sacarose (SAC) na conservação *in vitro* de *Manihot chlorosticta* Standl. & Goldman.

No resumo da análise de variância (Tabela 5) nota-se que a interação PBZ x SAC continuou sendo significativa para todas as variáveis analisadas. O coeficiente de variação neste experimento oscilou entre 15,20% (NR) a 62,86% (AP).

Tabela 5. Resumo da análise de variância para altura de planta (AP, em cm), número de microestacas (NM), número de raízes (NR), número de brotações (NB), número de folhas verdes (NFV) e número de folhas senescentes (NFS) de *Manihot chlorosticta* Standl. & Goldman, em função das concentrações de (PBZ; mg L⁻¹) e de sacarose (SAC; g L⁻¹).

FV	GL	QM					
		AP	NM	NR	NB	NFV	NFS
PBZ	4	472,35**	11,00**	2,17**	0,70**	4,58**	1,54**
SAC	3	48,72**	1,07*	1,54**	0,63**	5,19**	0,73**
PBZ x SAC	12	108,54**	3,14**	0,50**	0,23**	1,42**	0,55**
Erro	110	13,23	0,32	0,08**	0,04	0,28	0,12
CV (%)		62,86	30,54	15,20	18,74	30,49	36,45
Média geral		5,79	3,90	3,43	0,81	5,79	0,62

ns = não significativo; ** e * significativo a 1 e 5%, respectivamente, pelo teste de F.

Na Tabela 6 é possível verificar que o coeficiente de determinação (R²) flutuou 62,67% para número de folhas verdes e 97,72% para número de brotos

Tabela 6. Equações de regressão polinomial, coeficientes de determinação (R²), doses ótimas e valores estimados da altura de planta (cm), número de microestacas, número de raízes, número de brotações, número de folhas verdes e número de folhas senescentes de *Manihot chlorosticta* Standl. & Goldman, em função das concentrações de paclobutrazol (PBZ; mg L⁻¹) e de sacarose (SAC; g L⁻¹).

Interações	Doses	Equações	R ² (%)	Doses ótimas	Valores estimados
Altura de planta (cm)					
PBZ (SAC)	10	$\hat{y}^{**} = 20,481x + 1,708$	66,21	0,4	9,9
SAC (PBZ)	0	$\hat{y}^{**} = 0,1174x^2 - 2,2428x + 11,627$	96,95	9,55	1,00
SAC (PBZ)	0,1	$\hat{y}^{**} = 0,1093x^2 - 1,8171x + 12,347$	88,50	8,31	4,79
SAC (PBZ)	0,2	$\hat{y}^* = -0,0593x^2 + 1,0387x + 2,2794$	78,92	8,76	6,83
SAC (PBZ)	0,3	$\hat{y}^{**} = -0,4551x + 8,5458$	90,95	0	8,54
Número de microestacas					

Tabela 6. Continuação

SAC (PBZ)	0	$\hat{y}^{**} = 0,0682x^2 - 1,3585x + 7,6771$	96,66	9,96	0,91
SAC (PBZ)	0,1	$\hat{y}^{**} = 0,6149x - 0,6508$	72,65	20	11,65
SAC (PBZ)	0,2	$\hat{y}^{**} = -0,0526x^2 + 0,9689x + 1,0125$	71,98	9,21	5,47
SAC (PBZ)	0,3	$\hat{y}^{**} = -0,3214x + 6,0833$	91,29	0	6,08
Número de raízes					
PBZ (SAC)	10	$\hat{y}^{**} = 6,3333x + 1,46$	63,06	0,4	3,99
SAC (PBZ)	0	$\hat{y}^{**} = 0,2558x + 0,1667$	82,40	20	6,78
SAC (PBZ)	0,1	$\hat{y}^{**} = 0,411x - 0,7937$	72,51	20	9,01
Número de brotos					
SAC (PBZ)	0	$\hat{y}^{**} = 0,0119x^2 - 0,3097x + 2,3958$	97,72	13,01	0,38
SAC (PBZ)	0,2	$\hat{y}^{**} = -0,0066x^2 + 0,0788x + 0,9812$	84,61	7,16	1,26
SAC (PBZ)	0,3	$\hat{y}^{**} = -0,0821x + 1,625$	73,25	0	1,65
SAC (PBZ)	0,4	$\hat{y}^{**} = -0,0286x + 1,1667$	68,18	0	1,16
Número de folhas verdes					
PBZ (SAC)	10	$\hat{y}^{**} = 9x + 1,3933$	62,67	0,4	4,99
PBZ (SAC)	20	$\hat{y}^{**} = 77,778x^2 - 40,222x + 5,9$	69,74	0,26	0,7
SAC (PBZ)	0	$\hat{y}^{**} = 0,0329x^2 - 0,6771x + 5,1563$	84,87	10,29	1,67
SAC (PBZ)	0,2	$\hat{y}^{**} = -0,2943x + 6,1222$	94,53	0	6,12
SAC (PBZ)	0,3	$\hat{y}^{**} = -0,4114x + 7,5$	92,16	0	7,5
SAC (PBZ)	0,4	$\hat{y}^{**} = -0,2318x + 7,3$	84,45	0	7,3
Número de folhas senescentes					
SAC (PBZ)	0,1	$\hat{y}^{**} = 0,2414x - 1,6905$	84,06	20	3,14
SAC (PBZ)	0,2	$\hat{y}^{**} = -0,0803x + 1,6889$	92,16	0	1,60
SAC (PBZ)	0,4	$\hat{y}^{**} = 0,0156x^2 - 0,3084x + 1,3964$	97,40	10	0,12

** e * significativo a 1% e 5% de probabilidade, respectivamente, pelo teste F da ANAVA.

A menor média estimada para altura de planta (1,00 cm) ocorreu na dose aproximada de 10 g L⁻¹ de sacarose na ausência de PBZ, revelando que os explantes não se desenvolveram, levando-se em consideração que as microestacas utilizadas como explantes já apresentavam o tamanho de 1cm. Já a concentração de 0,3 mg L⁻¹ de PBZ sem acréscimo de sacarose demonstrou melhor comportamento ao ser associada à altura de planta (8,54 cm), ao número de microestacas (6,08) e às maiores médias para número de brotos (1,65) e número de folhas verdes (7,5). A menor média para número de folhas senescentes foi encontrada na combinação entre 10 g L⁻¹ de sacarose e 0,4 mg L⁻¹ de PBZ.

Experimento IV: Efeito de diferentes concentrações de paclobutrazol (PBZ) e sacarose (SAC) na conservação *in vitro* do genótipo *Manihot flabelifolia* Pohl.

Na Tabela 7 consta o resumo da análise de variância, onde é possível comprovar que a interação PBZ x SAC foi significativa para número de raízes, número de folhas vivas e número de folhas senescentes. Em relação à altura de planta, ao

número de microestacas e ao número de brotos o fator isolado SAC apresentou efeito significativo. Observa-se uma variação de 9,07% (NB) à 48,49% (AP) nos CV's.

Tabela 7. Resumo da análise de variância para altura de planta (AP, em cm), número de microestacas (NM), número de raízes (NR), número de brotações (NB), número de folhas verdes (NFV) e número de folhas senescentes (NFS) do genótipo *Manihot flabelifolia* Pohl, em função das concentrações de paclobutrazol (PBZ; mg L⁻¹) e de sacarose (SAC; g L⁻¹).

FV	GL	QM					
		AP	NM	NR	NB	NFV	NFS
PBZ	4	0,43 ^{ns}	0,16*	0,04**	0,04*	1,10**	0,32 ^{ns}
SAC	3	2,98*	0,23*	0,02 ^{ns}	0,04*	0,33 ^{ns}	0,16 ^{ns}
PBZ x SAC	11	0,40 ^{ns}	0,07 ^{ns}	0,05**	0,02 ^{ns}	0,33*	0,33*
Erro	137	0,65	0,07	0,01	0,01	0,15	0,14
CV (%)		48,49	19,46	14,85	9,07	19,18	38,57
Média geral		1,66	1,39	0,04	1,12	1,66	0,60

ns = não significativo; ** e * significativo a 1 e 5%, respectivamente, pelo teste de F.

Na Tabela 8 estão os modelos de regressão polinomial, onde observa-se os ajustes de modelos de 1^o e 2^o graus, com coeficiente de determinação (R²) variando de 52,80% para número de folhas senescentes à 100% para número de folhas verdes e número de folhas senescentes.

Tabela 8. Equações de regressão polinomial, coeficientes de determinação (R²), doses ótimas e valores estimados da altura de planta (cm), número de microestacas, número de brotações, número de folhas verdes e número de folhas senescentes do genótipo *Manihot flabelifolia* Pohl, em função das concentrações de paclobutrazol (PBZ; mg L⁻¹) e de sacarose (SAC; g L⁻¹).

Interações	Doses	Equações	R ² (%)	Doses ótimas	Valores estimados
Altura de planta (cm)					
SAC		$\hat{y}^{ns} = 1,64$	-		1,64 ¹
Número de microestacas					
SAC		$\hat{y}^{ns} = 1,35$	-		1,35 ¹
Número de raízes					
PBZ (SAC)	15	$\hat{y}^* = 3,5714x^2 - 1,9286x + 0,2214$	85,71	0,27	0,4
PBZ (SAC)	20	$\hat{y}^{**} = 17,857x^2 - 11,071x + 1,6071$	93,33	0,31	0,11
SAC (PBZ)	0	$\hat{y}^* = 0,025x - 0,1667$	75,00	20	0,33
SAC (PBZ)	0,0001	$\hat{y}^{**} = 0,0071x^2 - 0,1357x + 0,5357$	93,33	9,56	0,11
Número de brotos					

Tabela 8. Continuação

PBZ		$\hat{y}^{ns} = 1,14$	-		1,14 ¹
SAC		$\hat{y}^{ns} = 1,10$	-		1,10 ¹
Número de folhas verde					
PBZ (SAC)	10	$\hat{y}^{**} = -8,125x + 6,0143$	81,52	0,4	6,01
PBZ (SAC)	20	$\hat{y}^{**} = -71,29x^2 + 33,733x + 0,4756$	99,96	0,24	4,47
SAC (PBZ)	0	$\hat{y}^{**} = -0,0658x^2 + 1,0958x + 2$	100,00	8,33	6,56
SAC (PBZ)	0,1	$\hat{y}^{**} = -0,0329x^2 + 0,8186x - 0,1786$	94,00	12,44	4,91
Número de folhas senescentes					
PBZ (SAC)	15	$\hat{y}^{**} = 12,464x^2 - 7,5588x + 1,3293$	52,80	0,3	0,18
PBZ (SAC)	20	$\hat{y}^{**} = 40,417x^2 - 24,658x + 4,0625$	100,00	0,31	0,30
SAC (PBZ)	0	$\hat{y}^{**} = 0,1292x - 0,4306$	90,89	20	2,15
SAC (PBZ)	0,1	$\hat{y}^{**} = 0,0246x^2 - 0,5537x + 3,1286$	87,76	11,25	0,13

** e * significativo a 1% e 5% de probabilidade, respectivamente, pelo teste F da ANAVA; ¹ baseado na média dos valores observados.

Na análise das variáveis: altura de planta, número de microestacas e número de brotos não foi possível o ajuste de um modelo significativo para as concentrações de sacarose e PBZ. Assim como os valores encontrados nas médias das demais variáveis avaliadas nesse experimento, pode-se inferir que a redução do metabolismo foi decisiva para a inviabilidade dessa espécie, tornando-se necessária a execução de estudos envolvendo outros meios de cultura e concentrações de PBZ e sacarose.

Experimento V: Efeito de diferentes concentrações de paclobutrazol (PBZ) e sacarose (SAC) na conservação *in vitro* de *Manihot tristis* Müll. Arg.

Na Tabela 9 é possível verificar que a interação entre o paclobutrazol e a sacarose foi significativa apenas para número de raízes. O fator sacarose isolado foi significativo para altura de planta, número de microestacas, número de raízes e número de folhas vivas. O fator PBZ foi significativo para número de folhas senescentes. Observa-se também uma variação de 10,24% (NB) a 58,74% (AP) nos coeficientes de variação (CV).

Tabela 9. Resumo da análise de variância para altura de planta (AP, em), número de microestacas (NM), número de raízes (NR), número de brotações (NB), número de folhas verdes (NFV) e número de folhas senescentes (NFS) de *Manihot tristis* Müll. Arg., em função das concentrações de paclobutrazol (PBZ; mg L⁻¹) e de sacarose (SAC; g L⁻¹).

FV	GL	QM					
		AP	NM	NR	NB	NFV	NFS
PBZ	4	14,82 ^{ns}	0,47 ^{ns}	0,87 ^{**}	0,00 ^{ns}	0,19 ^{ns}	0,11 ^{**}
SAC	3	128,27 ^{**}	3,56 ^{**}	7,34 ^{**}	0,00 ^{ns}	1,26 ^{**}	0,02 ^{ns}
PBZ x SAC	12	11,55 ^{ns}	0,27 ^{ns}	0,52 ^{**}	0,00 ^{ns}	0,24 ^{ns}	0,02 ^{ns}
Erro	155	8,44	0,25	0,13	0,02	0,22	0,02
CV (%)		58,79	24,34	29,76	10,24	19,61	19,11
Média geral		4,9428571	3,97	1,29	1,12	5,42	0,06

ns = não significativo; ** e * significativo a 1 e 5%, respectivamente, pelo teste de F.

Na Tabela 10 estão os modelos de regressão polinomial, onde observa-se os ajustes de modelos de 1º e 2º grau, com coeficientes de determinação (R²) variando de 50% à 94,15% para a variável número de raízes.

Tabela 10. Equações de regressão polinomial, coeficientes de determinação (R²), doses ótimas e valores estimados da altura de planta (cm), número de microestacas, número de brotações, número de folhas verdes e número de folhas senescentes de *Manihot tristis* Müll. Arg., em função das concentrações de paclobutrazol (PBZ; mg L⁻¹) e de sacarose (SAC; g L⁻¹).

Interações	Doses	Equações	R ² (%)	Doses ótimas	Valores estimados
Altura de planta (cm)					
SAC		$\hat{y}^{ns} = 5,15$	-		5,15 ¹
Número de microestacas					
SAC		$\hat{y}^{ns} = 4,09$	-		4,09 ¹
Número de raízes					
PBZ (SAC)	5	$\hat{y}^* = -1,5x + 0,45$	50,00	0	0,45
SAC (PBZ)	0	$\hat{y}^{**} = 0,2063x - 0,4318$	94,15	20	3,69
SAC (PBZ)	0,1	$\hat{y}^{**} = 0,1141x - 0,6364$	60,57	20	4,07
SAC (PBZ)	0,2	$\hat{y}^{**} = 0,2354x - 1,2361$	92,24	20	3,47
SAC (PBZ)	0,3	$\hat{y}^{**} = 0,1369x - 0,1944$	74,16	20	2,54
SAC (PBZ)	0,4	$\hat{y}^{**} = 0,2029x - 1$	74,08	20	3,06
Número de folhas verdes					
SAC		$\hat{y}^{ns} = 5,45$	-		5,45 ¹
Número de folhas senescentes					
SAC		$\hat{y}^{ns} = 0,6$	-		0,6 ¹

** e * significativo a 1% e 5% de probabilidade, respectivamente, pelo teste F da ANAVA; ¹baseado na média dos valores observados.

Não houve interação, nem efeito significativo para altura de planta, número de microestacas, número de folhas verdes e número de folhas senescentes, apresentando médias estimadas de 5,15 cm; 4,09; 5,45 e 0,6, respectivamente (Tabela 10). Apesar de apresentar influência de forma isolada para estas variáveis, não foi possível o ajuste de uma equação com significância para a sacarose.

CONCLUSÕES

Para a espécie *Manihot pseudoglaziovii* Pax & Hoff, a interação da dose de 0,1 mg L⁻¹ de paclobutrazol e 5 g L⁻¹ de sacarose revelou um efeito expressivo na conservação *in vitro*, considerando a associação de uma das menores médias encontradas para altura de planta e número de folhas senescentes à valores mais elevados para médias estimadas do número de microestacas, número de raízes, número de brotos e número de folhas vivas.

Para o genótipo *Manihot violacea* (Pohl) Müll. Arg., a concentração de 10 g L⁻¹ de sacarose e 0,2 mg L⁻¹ de PBZ apresentou os melhores resultados.

Para *Manihot chlorosticta* Standl. & Goldman, a adição de 0,3 mg L⁻¹ de PBZ e omissão da sacarose demonstrou melhor comportamento, favorecendo a redução no crescimento da planta e mantendo o desenvolvimento ao associar a altura de planta ao número de microestacas, maiores médias para número de brotos e número de folhas verdes.

Para os genótipos *Manihot flabelifolia* (Pohl) e *Manihot tristis* Müll. Arg., as concentrações utilizadas de sacarose e de PBZ não se mostraram eficientes para conservação *in vitro* dessas espécies.

Diante dos resultados divergentes, nota-se que a resposta morfogênica é expressivamente influenciada pelo genótipo, evidenciando a necessidade da execução de mais estudos visando uma melhor adequação dos protocolos para cada espécie.

REFERÊNCIA

ARRIGONI-BLANK, M. de F.; TAVARES, F. F.; BLANK, A. F.; SANTOS, M. C. dos; MENEZES, T. S. A.; SANTANA, A. D. D. de. *In vitro* conservation of sweet potato genotypes. **Scientific World Journal**, v. 2014, p. 1–7, 2014.

ASHMORE, S. E. **Status report on the development and application of *in vitro* techniques for the conservation and use of plant genetic resources**. Rome: International Plant Genetic Resources Institute, 1997. 67 p.

AZCÓN-BIETO, J.; TALÓN, M. **Fundamentos de fisiología vegetal**. 2. ed. Madrid: McGraw-Hill – Interamericana España, 2013. 651 p.

BAIRU, M. W.; AREMU, A. O.; STADEN, J V. Somaclonal variation in plants: causes and detection methods. **Plant Growth Regulation**, v. 63, n. 2, p. 147-173, 2011.

BESPALHOK, J. C. F.; GUERRA, E. P.; OLIVEIRA, R. Uso e conservação do germoplasma. In: BESPALHOK, J. C. F.; GUERRA, E. P.; OLIVEIRA, R. **Melhoramento de plantas**. Disponível em: <<http://www.bespa.agrarias.ufpr.br/paginas/livro/capitulo%203.pdf>> (2007). Acesso em: 06 de jan. 2017.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **Conservação ex situ, in situ e on farm**. 2016. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/biodiversidade/conservacao-e-promocao-do-uso-da-diversidade-genetica/agrobiodiversidade/conserva%C3%A7%C3%A3o-in-situ,-ex-situ-e-on-farm>>. Acesso em: 06 nov. 2016.

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

DECCETTI, S. F. C. **Ambiente de cultivo e respostas morfofisiológicas durante o processo de micropropagação de *Annona glabra* L.** 2004. 93 p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

DUMET, D.; ENGELMANN, F.; CHABRILLANGE, N.; DUVAL, Y.; DEREUDDRE, J. Importance of sucrose for the acquisition of tolerance to desiccation and cryopreservation of oil palm somatic embryos. **CryoLetters**, v. 14, p. 243-250, 1993.

FARIA, G. A.; COSTA, M. A. P. de C.; JUNGHANS, T. G.; LEDO, C. A. S.; SOUZA, A. S. Efeito da sacarose e sorbitol na conservação *in vitro* de *Passiflora giberti* N. E. Brown. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 28, n. 2, p. 267 - 270, 2006.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2013.

JOSÉ, S. C. B. R. **Manual de curadores de germoplasma - vegetal: conservação *ex situ* (colbase - sementes)**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e

Biotecnologia, 2010. 12 p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Documentos, 317).

LEIFERT, C.; MURPHY, K. P.; PETER, J. L. Mineral and carbohydrate nutrition of plant cell and tissue cultures. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 14, n. 2, p.83-109, 1995.

LEMOINE, R.; LA CAMERA, S.; ATANASSOVA, R.; DÉDALDÉCHAMP, F.; ALLARIO, T.; POURTAU, N.; BONNEMAIN, J. L.; LALOI, M.; COUTOS-THÉVENOT, P.; MAUROUSSET, L.; FAUCHER, M.; GIROUSSE, C.; LEMONNIER, F.; PARRILLA, J.; DURAND, M. Source-to-sink transport of sugar and regulation by environmental factors. **Frontiers in Plant Science**, v. 4, p. 272, 2013.

MARCO-MEDINA, A.; CASAS, J. L. Polyamine content during minimal growth storage of *Thymus moroderi* explants. **Biologia Plantarum**, v. 56, n. 3, p. 590-594, 2012.

RADEMACHER, W. Growth retardants: effects on gibberellin biosynthesis and other metabolic pathways. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 51, p. 501-531, 2000.

RAMSAY M. M., JACKSON A. D., PORLEY R. D. 2000. **A pilot study for the ex situ conservation of UK bryophytes**. In: BGCI (ed) Eurogard 2000 — II European botanic garden congress. EBGC, Las Palmas de Gran Canaria, pp 52 – 57.

RANA, R. B.; GARFORTH, C. J.; STHAPIT, B. R. Farmers' management of rice varietal diversity in the mid-hills of Nepal: implications for on-farm conservation and crop improvement. **Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization**, v. 7, p. 50-62, 2008.

ROCA, W. M.; ARIAS, D. I.; CHAVÉZ, 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.

RUKUNDO, P; CARPENTIER, S. C; SWENNEN, R. Development of in vitro technique to screen for drought tolerant banana varieties by sorbitol induced osmotic stress. **African Journal of Plant Science**, v. 6, p. 416-425, 2012.

SANTONIERI, L. R. **Agrobiodiversidade e conservação ex situ: reflexões sobre conceitos e práticas a partir do caso da Embrapa/Brasil**. 2015. 503 f. Tese (Doutorado em Antropologia Social) - Instituto de Filosofia e Ciências Humanas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo.

SILVA, C. M. M. de S.; FAY, E. F.; VIEIRA, R. F. Degradação do paclobutrazol em solos tropicais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 38, n. 10, p. 1223-1227, 2003.

SILVA, K. S. **Uso de paclobutrazol em tomateiro cultivado em dois ambientes**. 2008. 79 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Estadual Paulista.

Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira, São Paulo. Disponível em: <<http://www.ppga.feis.unesp.br/teses2008/katiane2008.pdf>>. Acesso em: 20 nov. 2016.

SIMON, M. F. **Manual de curadores de germoplasma - vegetal: conservação in situ**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2010. 14 p. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Documentos, 322.

TAIZ, L; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 722 p.

VALOIS, A. C. C.; SALOMÃO, A. N.; ALLEM, A. C. **Glossário de recursos genéticos vegetais**. Brasília, DF: Embrapa-SPI, 1996. 62 p.

WERNER, E. T.; MOTTA, L. B.; MARTINS, M. Q.; LIMA, A. B. P.; SCHMILDT, E. R.. Coeficiente de variação como medida da precisão em experimentos de cultura de tecidos de plantas. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, v. 8, n. 1-2, p. 27-36, 2012. Disponível em: <<http://177.105.2.193/ojs/index.php/PlantCellCultureMicropropagation/article/view/61/18>> Acesso: 08 mar. 2017.

WITHERS, L. A.; ENGELMANN, F. **In vitro conservation of plant genetic resources**. In: ALTMAN, A. (ed.). **Biotechnology in agriculture**. Ney York: Marcel Dekker, 1997. p. 57-88.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As espécies silvestres de *Manihot* apresentam um alto potencial de aproveitamento nos programas de melhoramento genético de *Manihot esculenta* Crantz, devido às suas características de tolerância e resistência a diversos fatores bióticos e abióticos que acometem essa cultura. Entretanto, ainda existem poucos estudos dedicados ao aprimoramento dos métodos de micropropagação e conservação dessas espécies.

Os experimentos desenvolvidos neste trabalho visaram a adaptação dos protocolos de propagação e conservação *in vitro*, já bem estabelecidos para *Manihot esculenta* Crantz, à espécies silvestres do gênero, sendo notável, diante dos resultados obtidos, a influência do genótipo sobre a resposta morfogênica das plantas nos tratamentos aos quais foram submetidos, indicando a importância da adequação da metodologia utilizada às peculiaridades de cada espécie.

As espécies *Manihot flabelifolia* Pohl e *M. tristis* Müll. Arg. não foram responsivos às concentrações utilizadas de sacarose e de PBZ em meio 8S, revelando a ineficiência das doses selecionadas para conservação *in vitro*, o que indica que novos estudos, com diferentes concentrações das substâncias testadas e ou utilizar outros agentes osmóticos e retardantes de crescimento, para ajustar protocolos que favoreçam a capacidade regenerativa dessas espécies.