

**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**

**CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DE GERMOPLASMA DE  
MANDIOCA (*Manihot esculenta* Crantz) EM  
DIFERENTES TEMPERATURAS E CONCENTRAÇÕES  
DE NITRATO DE PRATA**

**Lili Costa Maia Alencar Simões de Freitas**

**CRUZ DAS ALMAS – BAHIA  
2018**

**CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DE GERMOPLASMA DE MANDIOCA  
(*Manihot esculenta* Crantz) EM DIFERENTES TEMPERATURAS E  
CONCENTRAÇÕES DE NITRATO DE PRATA**

**Lili Costa Maia Alencar Simões de Freitas**  
Bacharel em Engenharia Agrônômica  
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2016

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

**Orientador:** Dr. Carlos Alberto da Silva Ledo  
**Coorientadora:** Ma. Karen Cristina Fialho dos Santos

**CRUZ DAS ALMAS – BAHIA  
2018**

## FICHA CATALOGRÁFICA

F866c

Freitas, Lili Costa Maia Alencar Simões de.  
Conservação *in vitro* de gemoplasma de  
mandioca (*Manihot esculenta Crantz*) em diferentes  
temperaturas e concentrações de nitrato de prata /  
Lili Costa Maia Alencar Simões de Freitas. \_ Cruz  
das Almas, BA, 2018.  
84f.; il.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto da Silva  
Ledo

Co-Orientador: Profª. Drª. Karen Cristina Fialho  
dos Santos

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal  
do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências  
Agrárias, Ambientais e Biológicas. Mestrado em  
Recursos Genéticos Vegetais.

1. Cultivo da Mandioca. 2. Conservação *in vitro*.  
3. Crescimento de Plantas I. Universidade Federal  
do Recôncavo da Bahia - UFRB, Centro de Ciências  
Agrárias, Ambientais e Biológicas – CCAAB.  
II. Título.

CDD: 633.682

**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**

**CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DE GERMOPLASMA DE MANDIOCA  
(*Manihot esculenta* Crantz) EM DIFERENTES TEMPERATURAS E  
CONCENTRAÇÕES DE NITRATO DE PRATA**

Comissão Examinadora da Defesa de Dissertação de  
Lili Costa Maia Alencar Simões de Freitas

Aprovada em: 29 de agosto de 2018

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

Dr<sup>a</sup>. Viviane Peixoto Borges  
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia  
Examinador Externo

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Moema Angélica Chaves da Rocha  
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia  
Examinador Externo

## DEDICATÓRIA

Sou grata a Deus, que me amparou em cada etapa desse trabalho e não me deixou fraquejar.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a meu orientador, Dr. Carlos Alberto da Silva Ledo, pela confiança depositada em mim, desde o dia em que tivemos o primeiro contato e toda sua paciência, dedicação e ensinamentos.

A Ma. Karen Cristina Fialho dos Santos pela co-orientação, simpatia e confiança depositada em mim. Meu muito obrigada!

A Dr. Antônio da Silva Souza, por toda atenção e humildade em colaborar no momento que mais precisei, além de toda calma em tirar minhas dúvidas, por mais simples que fossem. Sou muito grata! Exemplo de um ser humano íntegro, ético e sempre disposto a ajudar.

Aos meus colegas do Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Mandioca e Fruticultura, especialmente Honorato, Tânia, Inês e Tamires, que me ajudaram sempre que necessário durante a montagem dos experimentos, assim como pelos ensinamentos acadêmicos bastante úteis.

A CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

Carinhosamente agradeço a meus pais, que não mediram esforços para me ajudar nessa etapa tão importante da minha vida. Também a toda minha família, em especial a minha irmã Andreia pelas palavras de incentivo nos momentos difíceis. A Tom pelo companheirismo, otimismo e generosidade no momento certo.

## CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DE GERMOPLASMA DE MANDIOCA (*Manihot esculenta* Crantz) EM DIFERENTES TEMPERATURAS E CONCENTRAÇÕES DE NITRATO DE PRATA

### RESUMO:

A manutenção de condições de crescimento mínimo associada ao uso de agentes osmóticos que promovam a redução do crescimento das plantas, e o aumento do intervalo entre os subcultivos, são fatores determinantes na conservação *in vitro* de germoplasma. Para que essa técnica ocorra com sucesso, é necessário reduzir as concentrações dos sais minerais, das vitaminas e da fonte de energia presentes no meio de cultura e principalmente reduzir a temperatura de cultivo, além de eliminar a presença do etileno mediante a adição de componentes inibidores desse gás, como o nitrato de prata. O objetivo deste trabalho foi avaliar diferentes temperaturas e concentrações de nitrato de prata na conservação *in vitro* de mandioca, visando maior eficiência no processo de manutenção dos acessos *in vitro*. O trabalho foi composto por dois experimentos, conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Mandioca e Fruticultura. Em ambos, os acessos utilizados foram: Mandioca João Grande (BGM1325), Fécula Branca (BGM1632), BRS Kiriris (BGM1728), S/N (121) (BGM2004) e BRS Prata (BGM2019). Os explantes utilizados foram segmentos nodais de plantas de mandioca *in vitro*. No primeiro experimento, o meio de cultura utilizado foi o 8S e as plantas foram cultivadas sob temperaturas de 18 °C, 20 °C e 22 °C, em câmaras climatizadas e a 22 °C, na sala de conservação (testemunha), sob fotoperíodo de 12 horas e intensidade luminosa de 20  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . No segundo experimento, as plantas foram cultivadas apenas sob a temperatura de 22 °C (sala de conservação), com o mesmo fotoperíodo e intensidade luminosa do primeiro experimento, cultivadas no meio de cultura 8S acrescido de 0 mg L<sup>-1</sup> (controle), 5 mg L<sup>-1</sup> e 10 mg L<sup>-1</sup> de nitrato de prata. As variáveis analisadas para ambos os experimentos foram: altura da parte aérea (cm), número de brotos, número de folhas vivas, número de folhas senescentes, número de microestacas, peso fresco da parte aérea (g), peso seco da parte aérea (g), peso fresco de raízes (g) e peso seco de raízes (g). Para os dois experimentos foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado e os dados submetidos ao teste F da análise de variância. Para as médias das temperaturas e concentrações de nitrato de prata foram avaliadas pelo teste de Tukey a 5% de significância e para a média dos acessos, utilizou-se o teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Com o auxílio do programa estatístico R para ambos. Conclui-se que independente da temperatura em estudo, os acessos BGM1325 e BGM1632 apresentaram menor altura da parte aérea e menor número de folhas senescentes. A temperatura testemunha na sala de conservação e a temperatura de 20 °C e 22 °C demonstram resultados promissores para redução do crescimento *in vitro*, considerando a associação das variáveis altura, folhas vivas e senescentes. A presença de 10 mg L<sup>-1</sup> de AgNO<sub>3</sub> proporcionou maior número de folhas senescentes, apesar de nessa mesma concentração existir menor crescimento da planta em relação as demais concentrações e acessos.

**Palavras chave:** Cultura de Tecidos; Protocolo; Crescimento Mínimo.

## **IN VITRO CONSERVATION OF MANDIOCA GERMOPLASM (*Manihot esculenta* Crantz) IN DIFFERENT TEMPERATURES AND CONCENTRATIONS OF SILVER NITRATE**

### **ABSTRACT:**

The maintenance of minimum growth conditions associated with the use of osmotic agents that promote the reduction of plant growth, and the increase of the interval between the subcultures, are determining factors in the *in vitro* conservation of germplasm. For this technique to occur successfully, it is necessary to reduce the concentrations of the minerals, vitamins and energy source present in the culture medium and especially reduce the temperature of cultivation, besides eliminating the presence of ethylene by the addition of inhibitory components of this gas, such as silver nitrate. The objective of this work was to evaluate different temperatures and concentrations of silver nitrate in the *in vitro* conservation of manioc, aiming at greater efficiency in the maintenance process of the *in vitro* accessions. The work was composed by two experiments, conducted in the Laboratory of Tissue Culture of Embrapa Mandioca and Fruticultura. In both, the accesses used were: Cassava Large Jojoba (BGM1325), White Fécula (BGM1632), BRS Kiriris (BGM1728), S / N (121) (BGM2004) and BRS Prata (BGM2019). The explants were nodal segments of cassava plants *in vitro*. In the first experiment, the culture medium used was 8S and the plants were grown under temperatures of 18 ° C, 20 ° C and 22 ° C in air-conditioned rooms and at 22 ° C in the conservation room (control room) under photoperiod of 12 hours and light intensity of 20  $\mu$  mol.m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. In the second experiment, the plants were cultivated only under the temperature of 22 ° C (conservation room), with the same photoperiod and light intensity of the first experiment, cultured in the 8S culture medium plus 0 mg L<sup>-1</sup> (control), 5 mg L<sup>-1</sup> and 10 mg L<sup>-1</sup> of silver nitrate. The variables analyzed for both experiments were: shoot height, number of shoots, number of live leaves, number of senescent leaves, number of microcuttings, fresh weight of shoot (g), shoot dry weight (g), fresh weight of roots (g) and dry weight of roots (g). For the two experiments, the completely randomized design and the data submitted to the F test of the analysis of variance were used. The mean values of temperatures and silver nitrate concentrations were evaluated by Tukey test at 5% significance and for the mean of the accessions, the Scott-Knott test was used at 5% probability. With the aid of the statistical program R for both. It was concluded that, independently of the temperature under study, the accesses BGM1325 and BGM1632 presented lower shoot height and fewer senescent leaves. The control temperature in the conservation room and the temperature of 20 ° C and 22 ° C show promising results for *in vitro* growth reduction, considering the association of height, live and senescent leaves. The presence of 10 mg L<sup>-1</sup> of AgNO<sub>3</sub> provided a higher number of senescent leaves, although at the same concentration there was lower plant growth in relation to the other concentrations and accessions.

**KeyWords:** Fabric Culture; Protocol; Minimum Growth.



**SUMÁRIO**

	<b>Página</b>
1 INTRODUÇÃO.....	1
 <b>Capítulo I</b>	
DIFERENTES TEMPERATURAS NA CONSERVAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE GERMOPLASMA DE MANDIOCA ( <i>Manihot esculenta</i> Crantz).....	25
 <b>Capítulo II</b>	
CONCENTRAÇÕES DE NITRATO DE PRATA NA CONSERVAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE GERMOPLASMA DE MANDIOCA ( <i>Manihot esculenta</i> Crantz).....	52
 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	 75

## 1 INTRODUÇÃO

A *Manihot esculenta* Crantz pertence à classe das dicotiledôneas, ordem Euphorbiales, família Euphorbiaceae e gênero *Manihot*, do qual a maior diversidade do gênero encontra-se no Brasil, com cerca de 90 espécies (MARTINS et al., 2018). O Brasil é o terceiro maior produtor mundial de mandioca, com uma produção de 21,08 milhões de toneladas de raízes em 2016 (FAO, 2018).

Originária da América do Sul, a mandioca provavelmente foi domesticada e diversificada no Brasil (OLSEN, 2004). Seu cultivo ocorre principalmente por pequenos agricultores de diversas regiões tropicais e subtropicais do mundo, já que suas raízes constituem importante fonte de carboidratos (HOWELER et al., 2013).

Caracterizada por ser uma cultura de subsistência e de grande interesse para pequenos agricultores, conseqüentemente a mandioca torna-se uma cultura de segurança alimentar. Além disso, a mandioca é a base de matéria-prima para diversos produtos industriais, o que proporciona interesse constante na cultura e, portanto, aumenta-se a demanda e contribuição para a transformação agrícola e o crescimento econômico nos países emergentes (FAO, 2013).

O desenvolvimento de novas variedades é um grande avanço no melhoramento genético de mandioca, logo há um aumento no potencial de rendimento da cultura. Devido a qualidade e produtividade da raiz da mandioca, o sistema de produção das variedades da cultura torna-se fundamental na diversificação do mercado, em razão às características específicas do amido que proporcionam sua utilização em diferentes áreas (ZHANG et al., 2010).

A conservação dos recursos genéticos de mandioca é imprescindível para reduzir a erosão genética, além de oferecer grande diversidade genética para programas de melhoramento. Logo, a avaliação de novos germoplasmas com definição dos acessos mais favoráveis a serem utilizados por melhoristas de plantas é um grande começo nesses programas de melhoramento, já que a variabilidade genética de acessos de mandioca é suficiente para ser explorada (KIZITO et al., 2007; ESUMA et al., 2012; TURİYAGYENDA et al., 2012; KAWUKI et al., 2013).

O cultivo *in vitro* de germoplasma é de grande valor, pois a problemática de manutenção e conservação que existe nos cultivos sob condições de campo pode ser eliminada. O principal objetivo dos protocolos de conservação é atingir uma taxa máxima de sobrevivência, assim como a estabilidade genética com mínimos subcultivos (NAIDU e SREENATH, 1999).

Dado o interesse comercial nesta cultura, a técnica de conservação *in vitro* torna-se atraente, pois garante a manutenção da integridade genética e biológica de um grande número de indivíduos em espaço reduzido, condições adequadas de cultivo, além de promover altas taxas de multiplicação em condições assépticas, permitindo o intercâmbio seguro de germoplasma.

Para conservar o germoplasma *in vitro* a médio/longo prazo é preciso oferecer ao acesso condições que favoreçam seu crescimento mínimo. De tal modo, uma alternativa dessa abordagem é a redução da temperatura no ambiente de cultivo e adição de retardantes de crescimento no meio de cultura *in vitro*. A redução da temperatura atua nas ações químicas, enzimática e crescimento microbiano no meio. Além disso, as mudanças na temperatura influenciam na taxa e estágio de desenvolvimento do patógeno, sua virulência e suas relações fisiológicas (GARRET et al., 2006).

Já no que se refere a adição de retardantes de crescimento no meio de cultura *in vitro*, está diretamente relacionado com o acúmulo e influência de gases nos recipientes de cultivo. O etileno é um fitohormônio gasoso que afeta o desenvolvimento das plantas conservadas *in vitro*, consequentemente a produção desse gás influencia na resposta dos explantes, podendo agir positiva ou negativamente. Por isso, existem estudos relacionados com os inibidores desse gás sendo o nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ ) um dos seus inibidores (AL-BAHRANI, 2001; OZDEN-TOKATLI et al., 2005).

Assim, em razão da importância social e econômica da mandioca e estudos que visem todos esses aspectos mencionados anteriormente, a conservação *in vitro* de germoplasma dessa cultura é fundamental para que não ocorra erosão genética.

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar diferentes temperaturas e concentrações de nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ ) na conservação *in vitro* de germoplasma de mandioca, a fim de contribuir com a otimização de protocolos para a manutenção dos acessos.

## **2 REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1 Aspectos botânicos, reprodução e toxicidade da mandioca**

A mandioca pertence à classe das Dicotiledôneas, subclasse Archiclamydeae, ordem Euphorbiales, família Euphorbiaceae, tribo Manihoteae, ao gênero *Manihot* e a espécie *Manihot esculenta* (FUKUDA; IGLESIAS, 2006). A família

Euphorbiaceae, composta por cerca de 8.000 espécies, estão distribuídas em 317 gêneros. As plantas dessa família são latescentes e exibem flores diclinas e fruto capsular (COELHO, WAECHTER; MAYO, 2009). Está representada também por plantas herbáceas, arbustivas e arbóreas (JOLY, 2002), sendo que a maioria de suas espécies apresentam efeitos alucinógenos e são venenosas.

Conhecida por apresentar ampla adaptação às mais variadas condições de solo e clima, a mandioca é uma espécie diploide, monóica, alógama e perene. A propagação pode ser por sementes, o que possibilita a ocorrência de maior variabilidade, em condições naturais (REIFSCHNEIDER et al., 2014), tornando-se promissor aos programas de melhoramento genético. No entanto, frequentemente o processo de estaquia é o mais utilizado, através de segmentos do caule, chamados “manivas” ou “estacas” (SILVA et al., 2009; NARINA; ODENY, 2012). O benefício da estaquia além de redução do tempo de estabelecimento da planta em relação a propagação sexuada, essa técnica apresenta maior benefício a conservação das características agrônômicas e morfológicas e da planta mãe (FUKUDA; CARVALHO, 2006).

As folhas são lobulares (de três a nove lóbulos com coloração variada – verde escuro, claro até o roxo), caducifólias, simples, alternadas e com pecíolo longo (9 a 20 cm de comprimento) e inseridas no caule de forma espiralada (ROGERS; APPAN, 1976; EMBRATER 1979; CONCEIÇÃO, 1987; BERNARDES et al., 2009). Nos períodos de seca, as folhas sofrem redução da atividade fotossintética e abscisão como mecanismo de defesa, com a finalidade de impedir a transpiração excessiva nas condições de déficit hídrico (COELHO FILHO et al., 2009).

O caule apresenta diversos hábitos de ramificação: subarbusivo, ereto, dicotômico, tricotômico, tetracômico, com “nós” e gemas que permitem a propagação assexuada (NASSAR, 2000).

O sistema radicular da mandioca é superficial, pseudofasciculado e pivotante. As raízes possuem tamanhos e formas diferentes de acordo com as variedades e cultivos, além de apresentarem grande variação dentro e entre indivíduos de uma mesma cultivar (ROGERS; APPAN, 1976; CONCEIÇÃO, 1987).

O grande armazenamento de carboidrato encontra-se nas raízes da mandioca, conferindo-lhe amplo valor energético. Além disto, possui, em pequena quantidade, proteínas, minerais, vitaminas e fibras (ALMEIDA; FERREIRA FILHO, 2005). Há uma extensa variação entre os genótipos de acordo com a forma, coloração,

peso, comprimento, profundidade, teores de amido, de carboidrato, de fibras e de açúcares. Em plantas com reprodução sexuada a presença de raízes axiais tuberosas e raízes secundárias feculentas são frequentes. Nas plantas originárias de propagação vegetativa existe o modelo pseudo-fasciculado tuberoso, com raízes ricas em amido (CARVALHO, 2006).

A espécie *Manihot esculenta* Crantz tem o ácido cianídrico como principal responsável pela sua toxicidade. Os glicosídeos cianogênicos são outros compostos orgânicos cuja ação tóxica é iniciada no processo digestivo em sua primeira fase (hidrólise ácida) seguida para hidrólise enzimática, através da microflora intestinal (BALTAR, 2017).

A quantidade de glicosídeos cianogênicos que é encontrada nas variedades de mandioca popularmente conhecidas, devido a sua toxicidade, como bravas e mansas, está presente em todos os órgãos da planta, com exceção das sementes (CALATAYUD; MÚNERA, 2002).

## **2.2 A cultura da mandioca**

A mandioca é cultivada em diversos países, destacando-se por sua importância nutricional, servindo tanto de base alimentar para milhões de pessoas no mundo, como para a alimentação animal. Apresenta significativa importância socioeconômica, pois os agricultores familiares consomem o produto e comercializam o excedente da produção na forma de farinha e amido, incrementando a renda familiar. Entre os diversos países em que a mandioca é produzida mundialmente, destacam-se a Nigéria, com 57,13 milhões de toneladas, seguida da Tailândia, Brasil, Indonésia, Gana e República Democrática do Congo. A participação desses seis países representa mais de 58,66 % de toda a produção mundial de mandioca (FAO, 2018).

A área plantada com mandioca no País chegou a 1,4 milhão de hectares, com produção aproximada de 21,08 milhões de toneladas, em 2016 (IBGE, 2018). O Norte e o Nordeste são as principais regiões produtoras de mandioca no Brasil, sendo responsáveis por, respectivamente, 37,3 % e 24,4% da produção de raízes (IBGE, 2018).

De acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), o estado brasileiro que possui maior produção de raízes de mandioca é o Pará, com aproximadamente 4,46 milhões de toneladas em 2017, seguido por Paraná e Bahia, com 3,73 e 2,10 milhões de toneladas, respectivamente (IBGE, 2018). Esses três

estados juntos representam quase metade da produção nacional, o equivalente a 45,5%.

Como em diversas culturas, determinadas limitações ocorrem na produção de mandioca no Brasil, tais como: alta sensibilidade na competição com plantas espontâneas, ataque de pragas e doenças, alta deterioração fisiológica pós-colheita, baixa fertilidade dos solos, manivas de baixa qualidade e variedades pouco produtivas ou até mesmo mal adaptadas às regiões de cultivo (CARDOSO et al., 2013; VENTURINI et al., 2016). Apesar disso, a mandioca apresenta fundamental valor para o País, por se encontrar entre as culturas de maior importância para a agricultura de subsistência e segurança alimentar (KUNKEAW et al., 2011).

A parte da planta mais explorada são as raízes, que possuem alto teor de amido e podem ser utilizadas de várias formas, tanto na alimentação humana e animal como em forma processada, resultando produtos dos quais o amido é predominante. Porém, como as raízes possuem baixo teor e qualidade de proteínas, minerais e vitaminas, torna-se um fator limitante para uma maior exploração da cultura.

Segundo LATIF e MULLER (2015), na alimentação humana, as folhas são consumidas como vegetal ou acompanhamento de pratos principais. Especialmente na região Nordeste do Brasil, as folhas são desidratadas e usadas na forma de farinha e as hastes utilizadas como material propagativo em novos plantios. Um prato bastante típico nas regiões Norte e Nordeste é a maniçoba, que só pode ser consumida após o processo de destoxificação do composto cianogênico (HCN) presente nas folhas da mandioca. As raízes podem ser consumidas fritas, cozidas e utilizadas para preparação de biscoitos, bolos, pães, tortas etc. Na alimentação animal, serve de matéria prima na preparação de silagens e fenos, e quando desidratadas como farinhas ou raspas (CHICHERCHIO, 2013).

Os compostos cianogênicos (HCN) presentes nas raízes da mandioca são fatores que determinam sua forma de aproveitamento, que é variável de uma cultivar para outra. Logo, as raízes podem ser classificadas como mansas ou bravas, de acordo com a quantidade de HCN, sendo este, responsável pela toxicidade das raízes, tornando-se uma limitação para consumo humano (PENTEADO; FLORES, 2001). A maioria das variedades bravas são direcionadas para o processamento de amido e farinha e só podem ser consumidas depois de submetidas a processos de destoxificação.

A classificação quanto à toxicidade das variedades é de acordo com a concentração de glicosídeos cianogênicos. Variedades consideradas com baixa toxicidade contém  $\text{NCN} < 100 \text{ mg Kg}^{-1}$ , e são conhecidas nas comunidades agrícolas, modificando entre regiões e grupos étnicos, tais como “macaxeiras”, “aipins” ou “mandiocas doces ou mansas”. Já as variedades que apresentam altas concentrações de HCN ( $\text{NCN} > 100 \text{ mg Kg}^{-1}$ ), são conhecidas como “mandiocas bravas” (PERONI et al., 2007; MCKEY et al., 2010).

Com certeza, o amido é o componente de maior valor agregado na cultura da mandioca (VASCONCELOS et al., 2017), apresentando propriedades especiais, como viscosidade, clareza, gelatinização e sabor suave e tornando-se mais adequado para o uso na indústria alimentícia em comparação com o amido de cereais, que apresenta sabor característico de plantas desse grupo (SINGH et al., 2007). O amido é o único produto da mandioca com mercado internacional, competindo com o amido de trigo, milho e o da batata (VILPOUX, 2008).

## **2.4 Diversidade genética e melhoramento da mandioca**

Uma característica importante na cultura da mandioca é sua ampla diversidade genética, que gera uma grandeza de indivíduos capazes de se adaptar em diversas regiões de cultivo (NICK, 2010). Essa característica é decorrente da alta heterozigosidade da cultura, facilidade de polinização cruzada da espécie e da deiscência abrupta dos frutos, que acarreta, uma infinidade de novos genótipos (RIBEIRO, 2010). Existe uma larga variabilidade genética de mandioca no Brasil, onde encontra-se mantida em coleções de trabalho e bancos de germoplasma, que é representada em grande maioria por agricultores e variedades locais selecionadas (FUKUDA; COSTA SILVA; 2005).

O fato da mandioca se propagar sob condições naturais através de sementes, torna-se um fator fundamental e favorável para os programas de melhoramento genético, pois isso lhe confere a ocorrência de maior variabilidade (REIFSCHNEIDER et al., 2014).

No procedimento de melhoramento genético é fundamental existir a predição genotípica dos genótipos mais promissores, o qual é dependente da estimativa dos parâmetros genéticos, assim como as correlações entre as características em seleção (OLIVEIRA et al., 2015).

A ampla diversidade genética que existe na cultura da mandioca é atribuída pelo fato da mesma ser uma planta alógama e com extensa segregação na primeira geração filial (FUKUDA et al., 2002). Por essa razão, a mandioca é geradora de uma infinidade de indivíduos capazes de adaptação a diversas regiões ecogeográficas de cultivo.

O melhoramento genético da mandioca obteve avanços significativos, principalmente com o aumento do potencial de rendimento da cultura por meio do desenvolvimento de novas variedades. Ademais, além da produtividade e qualidade da raiz, a variedade da mandioca como componente do sistema de produção exerce um desempenho essencial na diversidade do mercado devido às características do amido que permitem sua utilização nas diversas áreas (ZHANG et al., 2010).

Baseado na reprodução, os germoplasmas de mandioca são empregados como uma fonte de variação genética para inclusão de genes com alto valor agronômico em novas variedades. O aumento da produtividade, teor e qualidade do amido e resistência à seca, doenças e pragas são características tradicionalmente importantes no sistema de produção de mandioca na busca de novos alelos, o que confere seu uso em programas de melhoramento (OLIVEIRA et al., 2016).

Para o aumento da base genética da mandioca, o papel dos programas de melhoramento é incorporar novos alelos a partir do uso de novos germoplasmas, podendo ser tanto de espécies locais como selvagens. Desta forma, o primeiro passo é a avaliação de novos germoplasmas de mandioca, determinando os acessos mais favoráveis a serem usados pelos melhoristas de plantas (OLIVEIRA et al., 2016).

Seja qual for o programa de melhoramento é extremamente importante a diversidade genética, pois o mesmo restringe-se na presença da variabilidade para a característica que se deseja melhorar. Partindo dessa idéia, é indispensável o pré-melhoramento para realizar a avaliação e caracterização dos recursos genéticos disponíveis, já que, é através da expressão fenotípica que se deduz a presença e grandeza da diversidade (NICK, 2010).

## **2.5 Métodos de conservação de germoplasma**

Como há uma grande preocupação com a prevenção da erosão genética, despertou-se o interesse pela conservação do recurso genético vegetal há mais de 30 anos, de forma a protegê-lo de perdas e assegurar seu uso quando necessário. Os



germoplasmas vegetais podem ser conservados na forma de órgãos vegetativos, no campo, na forma de sementes e pólen (SOUZA et al., 2009b).

Para reduzir a erosão genética e fornecer parte da diversidade genética é essencial a conservação dos recursos genéticos (FUKUDA et al., 2005).

Há duas estratégias de conservação de germoplasma: *in situ* e *ex situ*. *In situ* envolve a conservação de ecossistemas e componentes da diversidade biológica, onde o germoplasma é mantido no seu habitat natural, como parques e reservas florestais. Enquanto que a conservação *ex situ* envolve a preservação de recursos genéticos em condições diferentes aos de ocorrência natural com transferência para condições de armazenamento artificiais, sob forma de condições de campo, em laboratório, e/ou por pequenos a longos prazos (SCHERWINSKI-PEREIRA; COSTA, 2010).

### **2.5.1 Conservação *ex situ* de germoplasma**

A conservação *ex situ* constitui a base para os programas de melhoramento, não apenas com a busca de maior produtividade e alto desempenho, como também compõe uma questão de segurança alimentar e garantia do sucessivo uso das espécies vegetais essenciais para a alimentação humana. A prioridade do Brasil, historicamente, foi priorizar o modelo de conservação *ex situ*, a partir de câmaras frias, em coleções vivas no campo e em meio de cultura. Esse modelo de conservação captura o período evolutivo que a coleta foi realizada, no entanto as plantas assim conservadas não continuam a evoluir (SANTONIERI et al., 2016a).

Em vista disso, tal característica indica limitações desse tipo de conservação para disponibilizar respostas mais rápidas relacionadas, por exemplo, a mudanças ambientais. Segundo a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO), a diversidade genética deverá ser mantida não apenas nos bancos de germoplasma, mas também nos sistemas agrícolas locais, para haver a participação dos agricultores (SANTONIERI et al., 2016b).

As coleções *ex situ* são conhecidas como ativas e a depender do material utilizado a manutenção ocorre em condições diferentes, como: câmara climatizada com temperatura e umidade baixas; campo e casa de vegetação; criopreservação; e *in vitro*, contendo meio de cultura com baixa concentração salina (SOUZA et al., 2009b).

## 2.6 Conservação *in vitro* de mandioca

A conservação *in vitro* envolve a manutenção de amostras de germoplasma vegetal em que se empregam técnicas da cultura de tecidos em laboratório, em meio de cultura que induz o crescimento lento das plantas e sob condições controladas de temperatura, intensidade luminosa e fotoperíodo. Para evitar deterioração dos propágulos vegetais através de transferência periódicas para recipientes com novo meio de cultura é preciso que se garanta um conjunto de medidas operacionais e científicas (MATSUMOTO et al., 2010).

A redução na velocidade de crescimento *in vitro* é geralmente obtida pela modificação das condições ambientais (fatores físicos), composição do meio de cultivo (fatores químicos) e da combinação de ambos. Quanto às condições ambientais, pode-se mencionar a diminuição da intensidade luminosa e do fotoperíodo e a redução da temperatura. Com relação ao meio de cultura, devem-se considerar os seguintes aspectos: redução na concentração de elementos minerais, adição de compostos osmoticamente ativos, como sacarose, mudanças na concentração ou natureza de reguladores de crescimento e acréscimo de retardantes de crescimento (REED et al., 2013). Além disso, essa técnica *in vitro* visa reduzir o metabolismo celular, com a finalidade de aumentar o tempo entre os subcultivos (ENGELMANN, 2011).

A utilização desse modelo de conservação elimina limitações estacionais encontradas nos procedimentos convencionais e contaminação por patógenos e vírus, e ainda promove pequena quantidade de material de partida, mão de obra especializada e espaço físico (FIRA et al., 2014).

Nas culturas propagadas vegetativamente, que é o caso da mandioca, a forma mais comum utilizada é em condições de campo, mas também o germoplasma pode ser conservado *in vitro* ou até mesmo por meio de estocagem de sementes. A grande maioria das coleções no Brasil é mantida a campo, embora seja a forma menos eficiente em comparação com a *in vitro*, pois oferece riscos de perdas de acessos por desastres climáticos, ataque de pragas e doenças, além de ser mais onerosa. Já na conservação *in vitro*, o germoplasma é preservado de forma mais econômica e efetiva, pois é possível manter um grande número de indivíduos em um menor espaço físico (laboratório), além de minimizar o risco de perdas por fatores bióticos e abióticos (FUKUDA et al., 2005).

Para a cultura da mandioca, existem diferentes técnicas de cultura de tecidos que podem ser utilizadas, podendo se destacar as relacionadas ao melhoramento

genético, especialmente no que se refere a cultura de embriões, a obtenção de haploides, a indução de mutações e a transformação genética (SOUZA et al., 2006), além da conservação *in vitro* de germoplasma.

Para a conservação de germoplasma, é necessário o ajuste de protocolos específicos para determinadas espécies, até mesmo em nível de acesso. Além disso, existe ainda uma outra limitação, que é a possibilidade de variações genéticas durante o cultivo, que aumentam no decorrer do tempo de armazenamento, quando os acessos *in vitro* passarem por sucessivos subcultivos, as chamadas variações somaclonais (ENGELMANN, 1997). Para reduzir esse problema, é possível criar condições de cultivo que possibilitem maior intervalo entre os subcultivos e a transferência periódica dos acessos para casa de vegetação ou campo (MATSUMOTO et al., 2010).

Atualmente, o CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical, Colômbia) conserva a maior e mais diversificada coleção de mandioca do mundo. A maior parte dessa concentrada diversidade é originária da Colômbia, com outros 24% vindos do Brasil. Outros países da América do Sul contribuíram para essa coleção com 21%, América Central e Caribe com 7% e Ásia com 7%. Já os recursos genéticos de mandioca na África são conservados no IITA (International Institute of Tropical Agriculture), na Nigéria. O banco de genes do CIAT distribuiu mais de meio milhão de amostras de acessos oriundos de 141 países para solicitantes em mais de 160 países. Existem 6.643 acessos de mandioca mantidos no banco do CIAT, sendo que todos os materiais foram indexados e verificados para estarem livres do mosaico comum da mandioca, vírus do mosaico das nervuras e vírus de couro de sapo (CIAT, 2018). A Embrapa Mandioca e Fruticultura, em Cruz das Almas – Bahia, mantém 1.543 acessos de mandioca em campo e 540 em laboratório (*in vitro*), envolvendo também as espécies silvestres.

## **2.7 Temperatura na conservação *in vitro* de germoplasma**

A temperatura exerce grande influência para todos os seres vivos, tanto para atividades fisiológicas como no controle das taxas de reações metabólicas nas células (MOLLO, 2009). Para plantas que são cultivadas *in vitro*, a influência da temperatura permite o controle das variáveis que serão avaliadas, gerando, assim, um vasto conhecimento, de maneira a propiciar a formação de coleções sob crescimento lento,

e, conseqüentemente, reduzir a necessidade de constantes subcultivos (ISLAM et al., 2005).

Como já registrado anteriormente, diante de várias metodologias para promover o crescimento lento de plantas em coleções *in vitro*, as que mais se destacam são a redução da luz, do oxigênio, da concentração de nutrientes e da temperatura (FOGAÇA et al., 2006). Para WITHERS (1985), o primeiro fator que deverá ser testado para comprovar a influência no crescimento é a redução da temperatura, visto que ela diminui a ação de enzimas e o metabolismo geral no cultivo *in vitro* de plantas (LEMOS et al., 2002).

Diversas mudanças são ocasionadas no metabolismo das plantas por conta das baixas temperaturas, tais como: arquitetura da parede celular, alterações no ciclo celular, acúmulo de açúcares, fluidez da membrana, modificações dos pigmentos fotossintéticos e rearranjo do citoesqueleto (HALDIMANN 1999; TAIZ e ZEIGER, 2006; BENSON, 2008).

O ambiente em que a planta está submetida também exerce grande influência no seu crescimento, desenvolvimento e resposta morfogênica. As salas de crescimento, onde as plantas são mantidas, apresentam determinadas temperaturas de acordo com a finalidade do cultivo, seja a conservação *in vitro* de germoplasma ou a micropropagação, e podem ser reguladas com a utilização de condicionadores de ar. Fotoperíodo (ciclos de claro/escuro) e intensidade luminosa são outros fatores que devem ser controlados em sistemas de cultivo *in vitro* de plantas. É interessante mencionar também que além das salas de conservação, nas câmaras climatizadas, conhecidas como BOD, a temperatura e o fotoperíodo podem ser regulados para permitir o crescimento lento das plantas *in vitro*.

## **2.8 Nitrato de prata na conservação *in vitro* de mandioca**

Em geral, os meios de cultura básicos que se utilizam na conservação *in vitro* são os mesmos adotados na micropropagação de plantas. Porém, modificações são introduzidas na composição dos meios para promover a redução do crescimento das plantas e aumentar o intervalo entre os subcultivos. Essas modificações geralmente envolvem a redução na concentração de sais minerais, de vitaminas e na fonte de energia (carboidrato) que compõem o meio (MATSUMOTO et al., 2010).

O etileno é um fitohormônio gasoso que afeta diretamente o desenvolvimento das plantas conservadas *in vitro*, bem como sua embriogênese (BANDEIRA et al.,

2007). A produção e ação desse gás no cultivo *in vitro* afetam a resposta do explante, podendo agir de forma positiva ou negativa (DONINI et al., 2011). Algumas outras funções são atribuídas ao etileno, entre elas: ativação de respostas de plantas a estresses diversos e sinalização de outros fitormônios, como o ácido jasmônico, o ácido salicílico e o ácido abscísico, influenciando, desse modo, diretamente no processo morfogênico (ADIE et al., 2007; KWON et al., 2009).

Por conta da ação negativa do etileno, existem estudos relacionados com os inibidores desse gás, sendo o nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ ) uma substância que possui esta capacidade (AL-KHAYRI, 2001; OZDEN-TOKATLI et al., 2005). Segundo LUZ (1995) o nitrato de prata adicionado ao meio de cultura pode, adicionalmente, promover a embriogênese somática.

O intuito principal de eliminar a ação do etileno é o bloqueio da sua biossíntese ou ação deste regulador. As substâncias químicas utilizadas como o ácido aminoacético (AOA) e aminoetóxi-vinil-glicina (AVG) atuam bloqueando a conversão do S-Adenosilmetionina (Adomet) em ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) e operam como inibidores de enzimas. Os íons de prata, do nitrato de prata, competem com o íon cobalto que atuam bloqueando a conversão do ACC em etileno, sendo então um forte inibidor desse gás (TAIZ; ZAIGER, 2004). Segundo KUMAR e YADAV (2009), o nitrato de prata é um forte inibidor da ação desse fitohormônio, pelo fato de competir por sítios de ligação dos receptores do etileno localizados nas membranas.

O nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ ) acrescentado ao meio de cultura com baixas temperaturas vem sendo estudado por muitos pesquisadores. REZENDE et al (2017) estudou o efeito da substância na conservação *in vitro* de germoplasma de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), onde o objetivo foi avaliar a redução do crescimento das plantas *in vitro*, bem como sua tolerância em baixas temperaturas. ZHANG et al. (2001), avaliaram o efeito do nitrato de prata para melhorar a eficiência de regeneração do germoplasma de mandioca, onde obtiveram respostas significativas com redução na formação de calos e melhora na frequência da regeneração, em todas as cultivares testadas.

## REFERÊNCIAS

ADIE, B.; CHICO, J. M.; RUBIO-SOMOZA, I.; SOLANO, R. Modulation of plant defenses by ethylene. **Plant Growth Regulation**, v. 26, p. 160-177, 2007.

AL-KHAYRI, J. M.; AL-BAHRANY, A. M. Silver nitrate and 2- isopentyladenine promote somatic embryogenesis in date palm (*Phoenix dactylifera* L.). **Scientia Horticulturae**, v. 89, p. 291-298, 2001.

ALMEIDA, J. de; FERREIRA FILHO, J. R. Mandioca: uma boa alternativa para alimentação animal. **Bahia Agrícola**, v. 7, n. 1, p. 50-56, 2005.

ALMEIDA, J. de; FERREIRA FILHO, J. R. Mandioca: uma boa alternativa para alimentação animal. **Bahia Agrícola**, v. 7, n. 1, p. 50-56, 2005.

BALTAR, S. L. S. M. de A. Aspectos botânicos e clínicos das intoxicações por plantas das Famílias Araceae, Euphorbiaceae e Solanaceae no Estado de Pernambuco. *Revista Fitos*, Rio de Janeiro, v. 11, n. 2, p. 126-139, 2017.

BANDEIRA, J. M.; LIMA, C.S. M.; RUBIN, S.; RIBEIRO, M. V.; FALQUETO, A. R.; PETERS, J. A.; BRAGA, E. J. B. Diferentes tipos de vedação dos frascos e concentrações de sacarose na micropropagação de *Thymus vulgaris* L. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, supl. 2, p. 472-474, 2007.

BARRUETO, C. I. D.; PEDRO, L.; CARVALHO, L. L. C. B. Importance of Abscisic Acid (ABA) in the *In Vitro* Conservation of Cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Chilean J. Agric. Res.**, Chillán, v. 68, n. 3, p. 304-308, Set. 2008. Disponible en <[https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S071858392008000300011&lng=es&nrm=iso](https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S071858392008000300011&lng=es&nrm=iso)>. Acesso em 05 out. 2018.

BENSON, E. E. Cryopreservation of phytodiversity: a critical appraisal of theory & practice. *Critical Reviews in Plant Sciences* 27: 141-219, 2008.

BERNARDES, M.; PEIXOTO, C.V.; CÂMARA, G.M.S. Mandioca. Departamento de Produção Vegetal. ESALQ. Piracicaba. 2009.

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.

CARDOSO, A. D.; VIANA, A. E. S.; BARBOSA, R. P.; TEIXEIRA, P. R. G.; CARDOSO JÚNIOR, N.; FOGAÇA, J. J. N. L. Levantamento fitossociológico de plantas daninhas na cultura da mandioca em Vitória da Conquista, Bahia. **Bioscience Journal**, v. 29, p. 1130-1140, 2013.

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.

CEREDA, M. P.; VILPOUX, O. Metodologia para divulgação de tecnologia para agroindústrias rurais: exemplo do processamento de farinha de mandioca no Maranhão. *Revista Brasileira de Gestão e Desenvolvimento Regional*, 6:219-250, 2010.

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

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

CIAT. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Disponível em: <<https://ciat.cgiar.org/what-we-do/crop-conservation-and-use/cassava-diversity/>>. Acesso em 4 jun. 2018.

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.

COELHO, M. A. N.; WAECHTER, J. L.; MAYO, S. J. Revisão taxonômica das espécies de *Anthurium* (Araceae) seção *Urospadix* subseção *Flavescentiviridia*. *Rodriguésia*. 2009; 60(4): 799- 864. ISSN: 2175-7860.

CONCEIÇÃO, A. J. da. *A mandioca*. 3. ed., Nobel, São Paulo, p. 382, 1987.

DONINI, L. P.; FIGUEIREDO, G. S.; SCHUCH, M. W. Nitrato de prata e diferentes tipos de vedação na multiplicação *in vitro* de oliveira 'Arbequina'. **Cienc. Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 9, p. 1532-1535, set. 2011. Disponível em <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0103-84782011000900007&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782011000900007&lng=en&nrm=iso)>. Acesso em 06 out. 2018.

EMBRATER. Manual Técnico: Cultura da Mandioca. Brasília. 1979.

ENGELMANN, F. *In vitro* conservation methods. In: CALLOW, J. A.; FORD – LLOYD, B. V.; NEWBURY, H. J. (Ed.). **Biotechnology and plant genetic resources**. Oxford: CAB International, 1997. p. 119-161.

ENGELMANN, F. Uso de biotecnologias para a conservação da biodiversidade vegetal. *Biologia Celular In Vitro e Biologia do Desenvolvimento*, v.47, p.5-16, 2011. DOI: 10.1007 / s11627-010-9327-2.

ESUMA, W. Diversidade genética da mandioca provitamina A em Uganda. **Journal of Plant Studies**, v. 1, n. 1, p. 60-71, 2012.



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.

FAO - Food and Agriculture Organization. **Fao stat Database Gateway**. 2013. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx>>. Acesso em: 01 out. 2018.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nation. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>>. Acesso em 4 jul. 2018.

FIRA, A.; CLAPA, D.; SIMU, M. Estudos sobre a micropropagação de algumas cultivares de amoreira-preta. *Boletim UASVM Horticultura*, v.71, p.29-37, 2014.

FOGAÇA, L. A.; DORTZBACH, D.; ALVES, A. C.; PEDROTTI, E. L. Características morfofisiológicas de brotações de *Agapanthus umbellatus* var. minor multiplicadas em biorreator de imersão temporária. **Plant Cell Culture Micropropagation**, Lavras, v. 2, n. 2, p. 80-87, 2006.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION of the UNITED NATIONS. Rome, Italy. 2013. Disponível em: <[www.fao.org/ag/agp/agpc/gcds](http://www.fao.org/ag/agp/agpc/gcds)>. Acesso em: 03 de out. 2018.

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.; COSTA, I. R. S.; SILVA, S. de O. e. **Manejo e conservação de recursos genéticos de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) na Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical**. Cruz das Almas, BA: Embrapa - CNPMF, 2005. 4 p. (Embrapa – CNPMF. Circular técnica, 74).

FUKUDA, W. M. G.; COSTA, I. R. S.; SILVA, S. O. **Manejo e conservação de recursos genéticos de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) na Embrapa**

**Mandioca e Fruticultura Tropical.** Cruz das Almas: EMBRAPA-CNPMPF, 2005. 4 p. (Circular Técnica, 74).

FUKUDA, W. M. G.; IGLESIAS, C. Melhoria da mandioca. In: SOUZA, L. S. et al. (Ed). Aspectos socioeconômicos e agrônômicos da mandioca. Cruz das Almas: EMBRAPA Mandioca e Fruticultura Tropical, v. 13, p. 324-363, 2006.

FUKUDA, W. M. G.; IGLESIAS, C.; SILVA, S. de O. e. **Melhoria da mandioca.** Cruz das Almas, BA: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2006. 53 p. (Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical. Documentos, 104).

FUKUDA, WMG; COSTA, IRS; SILVA, S. de O. e. Manejo e conservação de recursos genéticos de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) na Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2005. 4p. (Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical. Documento, 74).

FUKUDA, WMG; COSTA, IRS; SILVA, S. de O. e. Manejo e conservação de recursos genéticos de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) na Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2005. 4p. (Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical. Documento, 74).

HALDIMANN, P. 1999. How do changes in temperature during growth affect leaf pigment composition and photosynthesis in Zea mays genotypes differing in sensitivity to low temperature? *Journal of Experimental Botany* 50 (333): 543-550.

HEDHLY, A.; HORMAZA, J. I; HERRERO, M. Aquecimento global e reprodução sexual de plantas. *Tendências em ciência de plantas*, 14 (1): 30-36, 2008.

HOWELER, R.; LUTALADIO, N; THOMAS, G. Salve e cresça: mandioca. Um guia para a intensificação sustentável da produção. Roma: FAO, 2013. 129p.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Levantamento sistemático da produção Agrícola-LSPA.** Disponível em:

<ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao\_Agricola/Levantamento\_Sistematico\_da\_Producao\_Agricola[mensal]/Fasciculo/lspa\_201701.pdf. > Acesso em: 06 jul. 2018.

ISLAM, M. T., DEMBELE, D. P.; KELLER, E. R. J. Influence of the explant, temperature and different culture vessels on *in vitro* culture for germplasm maintenance of four mint accessions. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 81, p. 123-130, 2005.

JOLY, A. B. Botânica: Introdução à taxonomia vegetal. São Paulo: Companhia Editora Nacional. 2002. 808p. ISBN: 2147483647.

KARTHA, K. K.; ROCA, W. M. Role of plant biotechnology in crop improvement. In: ROCA, W. M.; THRO, A. M. (Ed.). INTERNATIONAL SCIENTIFIC MEETING OF THE CASSAVA BIOTECHNOLOGY NETWORK, 1., 1992, Cartagena. **Proceedings...** Cali: Ciat, 1993. p. 466-476. (CIAT. Working Document, 123).

KAWUKI, R. S. Diversidade genética de variedades locais de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) e cultivares da África Austral, Oriental e Central. **Recursos Genéticos Vegetais**, v. 11, n. 2, p. 170-181, 2013.

KIZITO, E. B. Diversidade genética e composição de variedades de mandioca em fazendas de pequena escala em Uganda: um estudo interdisciplinar usando marcadores genéticos e entrevistas com agricultores. **Genetica**, v. 130, n. 3, p. 301-318, 2007.

KUMAR, V.; YADAV, S. K. Plant-mediated synthesis of silver and gold nanoparticles and their applications. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 84, n. 2, p. 151-157, 2009.

KUNKEAW, S.; YOOCHA, T.; SRAPHET, S.; BOONCHANAWIWAT, A.; BOONSENG, O.; LIGHTFOOT, D. A.; TRIWITAYAKORN, K.; TANGPHATSORNRUANG, S. Construction of a genetic linkage map using simple sequence repeat markers from expressed sequence tags for cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Molecular Breeding**, v. 27, p. 67-75, 2011.

KWON, H-B.; HWAANG, E-W.; CHEONG, J-J. Transgenic expression. Of na ethylene responsive elemento binding protein of *Capsicum annuum* (CaEREBO-C4) in tobacco confers cold tolerance. **Journal of Korean Society for Applied Biological Chemistry**, v. 52, p. 405-411, 2009.

LATIF, S.; MULLER, J. Potential of cassava leaves in human nutrition: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 44, p. 147-158, 2015.

LEMONS, E. E. P.; FERREIRA, M. S.; ALENCAR, L. M. C.; RAMALHO, C. E.; ALBUQUERQUE, M. M. Conservação *in vitro* de germoplasma de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, n. 10, p. 1359-1364, 2002.

LUZ, J. M. Q. **Embriogênese somática *in vitro* em anteras de pimentão (*Capsicum annuum* L.)**. 1995. 115 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

MARTINS, L. L. M.; CARVALHO, P. C. L. de.; LEDO, C. A. da. S.; AMORIM, A. M. *Manihot alterniflora* and *M. elongata* spp. nov. (Euphorbiaceae) and the rediscovery of *M. quinquefolia* in Caatinga (semiarid) vegetation in Brazil. The Authors. **Nordic Journal of Botany**, v. 36, n. 3, p. 1-8, 2018.

MATSUMOTO, K.; CARDOSO, L. D.; SANTOS, I. R. I. **Manual de curadores de germoplasma – vegetal: conservação *in vitro***. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2010. 12 p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Documentos, 318).

MICKET, D. Chemical ecology in coupled human and natural systems: People, manioc, multitrophic interactions and global change. **Chemoecology**, v. 20, n. 2, p. 109-133, 2010.

MOLLO, L. Efeito da temperatura no crescimento, no conteúdo e na composição de carboidratos não-estruturais de plantas de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms (Bromeliaceae) cultivadas *in vitro*. Dissertação (Mestrado). Instituto de Botanica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, São Paulo, 2009.

N, F. Uso de biotecnologias para a conservação da biodiversidade vegetal. *Biologia Celular In Vitro e Biologia do Desenvolvimento*, v.47, p.5-16, 2011. DOI: 10.1007 / s11627-010-9327-2.

NAIDU, M. M.; SREENATH, H. L. *In vitro* culture of coffee zygotic embryos for germplasm preservation. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 55:227-230, 1999.

NARINA, S. S.; ODENY, D. Cassava. Cap. 13, p.303-313. In: KOLE, C.; JOSHI, C. P.; SHONNARD, D. R. *Handbook of bioenergy crop plants*. New York: CRC Press, 2012.

NASSAR, N. M. A. Cytogenetics and evolution of Cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Genetic and Molecular Biology, U.S.A*, v. 23, n. 4, p. 1003-1014, 2000.

NEPOMUCENO, C. F. **Crescimento *in vitro* e controle morfofisiológico em plântulas de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan var. *cebil* (Griseb.) Altschul.** 2006, 72 f. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana.

NICK, C. Divergência genética entre subamostras de mandioca. *Bragantia*, Campinas, v. 69, n. 2, p. 289-298, 2010. Available from <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S000687052010000200005&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S000687052010000200005&lng=en&nrm=iso)>. Acesso em 27 set. 2018.

OLIVEIRA, E. J. de.; Non-hierarchical clustering of *Manihot esculenta* Crantz germplasm baseado n quantitative traits. *Rev. Ciênc. Agron.*, Fortaleza, v. 47, n. 3, p. 548-55, set. 2016. Acesso em 04 de out. de 2018.

OLIVEIRA, EJ de.; AIDAR, S. de T.; MORGANTE, CV; CHAVES, AR de M.; CRUZ, JL; COELHO FILHO, MA Parâmetros genéticos para a tolerância à seca em mandioca. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.50, p.233-241, 2015. DOI: 10.1590 / S0100-204X2015000300007.

OLIVEIRA, EJ de; AIDAR, S. de T.; MORGANTE, CV; CHAVES, AR de M.; CRUZ, JL; COELHO FILHO, MA Parâmetros genéticos para a tolerância à seca em

mandioca. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.50, p.233-241, 2015. DOI: 10.1590 / S0100-204X2015000300007.

OLSEN, K. M. SNPs, SSRs and inferences on cassava's origin. **Plant Molecular Biology**, v. 56, n. 4, p. 517-526, 2004.

OZDEN-TOKATLI, Y.; OZUDOGRU, E. A.; AKCIN, A. *In vitro* response of pistachio nodal explants to silver nitrate. **Scientia Horticulturae**. v. 106, p.415-426, 2005.

PENTEADO, M. V. C.; FLORES, C. I. O. Folhas de mandioca como fonte de nutrientes. In: CEREDA, M. P. (coord): **Manejo, Uso e Tratamento de Subprodutos da Industrialização da Mandioca**. São Paulo: Fundação CARGILL, vol. IV, p. 49-65, 2001.

PERONI, N.; KAGEYAMA, P. Y.; BEGOSSI, A. Molecular differentiation, diversity, and folk classification of “sweet” and “bitter” cassava (*Manihot esculenta*) in Caiçara and Caboclo management systems (Brazil). **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 54, n. 6, p. 1333-1349, 10 mar. 2007.

REED, B. M.; GUPTA, S.; UCHENDU, E. *In vitro* genebanks for preserving tropical biodiversity. In: NORMAH, M. N.; CHIN, H. F.; REED, B. M. (Org.) **Conservation of tropical plant species**. New York: Springer, 2013, p. 2-28.

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.

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.

REZENDE, M. E. de; CARDOSO, L. D.; LUZ, T. C. de L. A.; MATSUMOTO, K. Influência do nitrato de prata em meios de cultura sob diferentes temperaturas de incubação na conservação *in vitro* de mandioca (*Manihot esculenta*). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS, 20.; CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS, 7., 2015,

Piracicaba. Resumos... [S.l.]:Sociedade Brasileira de Floricultura e Plantas Ornamentais, 2015.

REZENDE, M. E. de; CARDOSO, L. D.; MATSUMOTO, K.; FLORES, P. S. Uso do nitrato de prata na conservação *in vitro* de mandioca (*Manihot esculenta Crantz*). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS, 21.; CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS, 8., 2017, Bonito. Anais... [S.l.]: SBFPO: ABCTP, 2017.

RIBEIRO, M. de N. O. Diversidade genética e anatomia foliar em acessos de mandioca (*Manihot esculenta Crantz*). 2010. 77 p. Tese (Doutorado em Agronomia/Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

ROGERS, D. J.; APPAN, S. J. *Manihot*, *Manihotoides* (Euphorbiaceae). Flora Neotropica. New York: Hafner Press., p. 271, 1976.

SANTONIERI, L.; BUSTAMANTE, P. G. Conservação *ex situ* e *on farm* de recursos genéticos: desafios para promover sinergias e complementaridades. Bol. Mus. Para. Emílio Goeldi. Ciênc. hum., Belém, v. 11, n. 3, p. 677-690, Dec. 2016. Available from <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1981-81222016000300677&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1981-81222016000300677&lng=en&nrm=iso)>. Acesso em 05 out. 2018.

SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E.; COSTA, F. H. S. Conservação *in vitro* de recursos genéticos de plantas: estratégias, princípios e aplicações. In: BARRUETO CID, L.P. (Org.). Cultivo *in vitro* de plantas. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2010. p.177-234.

SEBBENN, A.M.; BOSHIER, D.; FREITAS, M.L.M.; ZANATTO, A.C.S.; SATO, A.S.; ETTORI, L.C.; MORAES, E. Results of an international, provenance trial of *Cordia alliodora* in São Paulo, Brazil at five and 23 years of age. *Silvae Genetica*, Frankfurt, v.56, n.3-4, p.110-117, 2007.

SILVA, K. V. P.; ALVES, A. A. C.; BENKO-ISEPPON, A. M.; CARVALHO, R. **Estudo do comportamento meiótico em acessos do gênero *Manihot***. XIII Congresso Brasileiro de Mandioca. Botucatu/SP. 2009.

SINGH, J.; KAUR, L.; MCCARTHY, O. J. Factors influencing the physicochemical, morphological, thermal and rheological properties of some chemically modified starches for food applications: a review. **Food Hydrocolloids**, v.21, p.1-22, 2007.

SOUZA, A. da S.; JUNGHANS, T. G.; JUNGHANS, D. T.; MENDES, R. A.; MONTARROYOS, A. V. V. Cultura de tecidos em mandioca: técnicas e aplicações. 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. 364-432.

SOUZA, A. da S.; JUNGHANS, T. G.; SOUZA, F. V. D.; SANTOS-SEREJO, J. A. dos; SILVA NETO, H. P. da; 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**. Cruz das Almas, BA: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2009a. p. 323-349.

SOUZA, A. da S., SOUZA, F. V. D.; SANTOS-SEREJO, J. A. dos; JUNGHANS, T. G.; PAZ, O. P. da; MONTARROYOS, A. V. V.; SANTOS, V. da. S; MORAIS, L. S. **Preservação de germoplasma vegetal, com ênfase na conservação *in vitro* de variedades de mandioca**. Cruz das Almas, BA: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2009b. 24 p. (Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical. Circular, 90).

TAIZ, L.; ZAIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3 eds. Porto Alegre: Artmed, 719 p.,2006.

TAIZ, L.; ZAIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 719 p., 2004.

TURYAGYENDA, L. F. Diversidade genética entre as variedades crioulas de mandioca preferidas pelo agricultor em Uganda. **African Crop Science Journal**, v. 20, n. 1, p. 15-30, 2012.



VASCONCELOS, L. M.; BRITO, A. C.; CARMO, C. D.; OLIVEIRA, P. H. G. A.; OLIVEIRA, E. J. Phenotypic diversity of starch granules in cassava germplasm. **Genetics and Molecular Research**, v. 16, p. 1-15, 2017.

VENTURINI, M. T.; ARAÚJO, T. S.; ABREU, E. F. M.; ANDRADE, E. C.; SANTOS, V. S.; SILVA, M. R.; OLIVEIRA, E. J. Crop losses in Brazilian cassava varieties induced by the cassava common mosaic virus. **Scientia Agricola**, v. 73, p. 520-524, 2016.

VIEIRA, L. de. JESUS. Conservação *in vitro* e criopreservação de espécies de Manihot. 2013. 103 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia). Universidade Estadual de Feira de Santana. Feira de Santana. 2013.

VILPOUX, F.O. Competitividade da mandioca no Brasil, como matéria-prima para amido. **Informações Econômicas**, v. 38, p. 27-38, 2008.

WITHERS, L. A. Cryopreservation and storage of germplasm. In: DIXON, R. A. (Ed.). **Plant cell culture: a practical approach**. Oxford: Irl Press, 1985. p. 169-191.

ZHANG, P. A expressão indutora de senescência da isopentenil transferase prolonga a vida das folhas, aumenta a resistência ao estresse hídrico e altera o metabolismo da citocinina na mandioca. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 52, n. 7, p. 653-669, 2010.

ZHANG, P.; PHANSIRI, S.; KAERLAS-PUONTI, J. A expressão indutora de senescência da isopentenil transferase prolonga a vida das folhas, aumenta a resistência ao estresse hídrico e altera o metabolismo da citocinina na mandioca. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 52, n. 7, p. 653-669, 2010.

ZHANG, P.; PHANSIRI, S.; PUONTI-KAERLAS, J. Improvement of cassava organogenesis by the of silver nitrate *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 67: 47-54, 2001.

**CAPÍTULO I**  
**DIFERENTES TEMPERATURAS NA CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DE**  
**GERMOPLASMA DE MANDIOCA (*Manihot esculenta* Crantz)**

## DIFERENTES TEMPERATURAS NA CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DE GERMOPLASMA DE MANDIOCA (*Manihot esculenta* Crantz)

### RESUMO:

O cultivo *in vitro* é a forma mais efetiva e econômica que pode ser utilizada para conservação do germoplasma, admitindo um grande número de indivíduos em um pequeno espaço físico. A partir desse cultivo, é possível desenvolver uma coleção de plantas sob crescimento lento utilizando baixas temperaturas, de modo a diminuir a necessidade de constantes subcultivos. Com isso, o objetivo deste trabalho foi avaliar o crescimento *in vitro* de acessos de mandioca em diferentes temperaturas, para auxiliar na otimização de protocolos na conservação *in vitro* de germoplasma. O experimento foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Mandioca e Fruticultura e foram testadas três temperaturas em câmaras climatizadas, 18 °C, 20 °C e 22 °C, e a temperatura de 22 °C em sala de conservação de germoplasma (testemunha). Foram utilizados cinco acessos: Mandioca João Grande (BGM1325), Fécula Branca (BGM1632), BRS Kiriris (BGM1728), S/N (121) (BGM2004) e BRS Prata (BGM2019). Realizou-se a avaliação após 90 dias de cultivo, mediante as seguintes variáveis: altura da parte aérea (cm), número de brotos, número de folhas vivas, número de folhas senescentes, número de microestacas, pesos fresco e seco da parte aérea (g) e pesos fresco e seco de raízes (g). O experimento foi instalado no delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 5 (acessos) x 4 (temperaturas), com vinte repetições. Os dados coletados foram submetidos ao teste F da análise de variância e avaliados pelos testes de Tukey e de Scott-Knott a 5% de probabilidade, com auxílio do programa estatístico R. A temperatura testemunha (22°C em sala de conservação) propiciou menores valores médios de altura da parte aérea da planta, com destaque para os acessos BGM1325, BGM1632 e BGM2019. Já para os acessos BGM1728 e BGM2004, o menor crescimento das plantas ocorreu na temperatura de 18 °C (câmara climatizada). Conclui-se que independente da temperatura em estudo os acessos BGM1325 e BGM1632 apresentaram menor altura da parte aérea. Os BGM1325, BGM1632 e BGM2004 se destacaram com melhores resultados considerando a associação de menor crescimento, menor número de folhas senescentes e maior número de folhas vivas. A temperatura testemunha e a de 20 °C e 22 °C demonstram resultados promissores para as três variáveis fundamentais em estudos de conservação *in vitro*.

**Palavra-chave:** Cultura de Tecidos; Crescimento Lento; Protocolo.

## DIFFERENT ENVIRONMENTS AND TEMPERATURES IN *IN VITRO* CONSERVATION OF MANDIOCA GERMOPLASMA (*Manihot esculenta* Crantz)

### ABSTRACT:

*In vitro* cultivation is the most effective and economical way of conserving germplasm, admitting a large number of individuals in a small physical space. From this cultivation, it is possible to develop a collection of slow growing plants using low temperatures, in order to reduce the need for subculture constants. Thus, the objective of this work was to evaluate the *in vitro* growth of cassava accesses at different temperatures, to help optimize protocols for the *in vitro* conservation of germplasm. The experiment was carried out in the Laboratory of Tissue Culture of Embrapa Mandioca and Fruticultura and three temperatures were tested in air-conditioned chambers, 18 ° C, 20 ° C and 22 ° C, and again the temperature of 22 ° C in the germplasm conservation room (witness). Five accessions were used: Manioc João Grande (BGM1325), Fécula Branca (BGM1632), BRS Kiriris (BGM1728), S / N (121) (BGM2004) and BRS Prata (BGM2019). After 90 days of cultivation, the following variables were evaluated: shoot height, number of shoots, number of live leaves, number of dead leaves, number of micro-shoots, fresh and dry weight of shoot (g) and fresh and dry weights of roots (g). The experiment was installed in a completely randomized design in factorial scheme 5 (accesses) x 4 (temperatures), with twenty replications. The collected data were submitted to the F test of the analysis of variance and Tukey's tests were applied at 5% significance and Scott-Knott's test at 5% probability using the statistical program R. The control temperature (conservation room) lower mean height values of the aerial part of the plant, with emphasis on accesses BGM1325, BGM1632 and BGM2019. As for the accessions BGM1728 and BGM2004, the lowest plant growth occurred at a temperature of 18 ° C (air-conditioned room). It was concluded that, independently of the temperature under study, accesses BGM1325 and BGM1632 presented lower shoot height. BGM1325, BGM1632 and BGM2004 stood out with better results considering the association of lower growth, lower number of senescent leaves and greater number of live leaves. The control temperature and 20 ° C and 22 ° C showed promising results for the three key variables in *in vitro* conservation studies.

**Keywords:** Fabric Culture; Slow Growth; Protocol.

## INTRODUÇÃO

A mandioca é consumida em diversas regiões tropicais do mundo. Sua raiz está entre os produtos mais colhidos nacionalmente, estando atrás apenas do arroz, milho, soja e trigo, em área colhida (hectares), na safra de 2017, correspondente a 1.407.345 hectares (IBGE, 2018). O consumo in natura e da farinha é bastante elevado nas regiões norte e nordeste do Brasil, conseqüentemente tornando-se base alimentar para milhares de pessoas dessas regiões (CEREDA; VILPOUX, 2010; DÓSEA et al., 2010; OLUWAMUKOMI et al., 2011).

Para o aumento da base genética da mandioca, o papel dos programas de melhoramento é incorporar novos alelos a partir do uso de novos germoplasmas, podendo ser tanto de espécies locais como selvagens. Desta forma, o primeiro passo é a avaliação de novos germoplasmas de mandioca, determinando os acessos mais favoráveis a serem usados pelos melhoristas de plantas (OLIVEIRA et al., 2016).

A conservação *ex situ* constitui a base para os programas de melhoramento, não apenas com a busca de maior produtividade e alto desempenho, como também compõe uma questão de segurança alimentar e garantia do sucessivo uso das espécies vegetais essenciais para a alimentação humana. As coleções *ex situ* são conhecidas como ativas e a depender do material utilizado a manutenção ocorre em condições diferentes, como: câmara climatizada com temperatura e umidade baixas; campo e casa de vegetação; criopreservação; e *in vitro*, contendo meio de cultura com baixa concentração salina (SOUZA et al., 2009).

A metodologia de conservação de coleções de plantas deve se adequar ao seu sistema de propagação e garantir a viabilidade do material após o tempo de armazenamento (VIEIRA, 2013). O modelo de conservação *in vitro*, com técnicas de cultura de tecidos, envolve a busca por estratégias de conservação para estabelecimento de duplicatas de segurança.

Diversos fatores contribuem para a redução do metabolismo de plantas conservadas *in vitro*, com destaque para o uso de reguladores osmóticos e outros compostos no meio de cultura. Em relação à incubação, a incidência de luz, fotoperíodo e temperatura, são grandes influenciadores no crescimento das plantas (REED et al., 2013).

A temperatura permite o controle das variáveis que serão avaliadas em plantas cultivadas *in vitro*, gerando, assim, um vasto conhecimento, de maneira a propiciar a formação de coleções sob crescimento lento, e, conseqüentemente, reduzir a

necessidade de constantes subcultivos (ISLAM et al., 2005). Diversas mudanças são ocasionadas no metabolismo das plantas por conta das baixas temperaturas, tais como: arquitetura da parede celular, alterações no ciclo celular, acúmulo de açúcares, fluidez da membrana, modificações dos pigmentos fotossintéticos e rearranjo do citoesqueleto (HALDIMANN 1999; TAIZ; ZEIGER, 2006; BENSON, 2008).

Porém, embora existam métodos de conservação *in vitro* para mandioca, esta é uma espécie cujas respostas morfofisiológicas *in vitro* variam entre os genótipos, implicando a necessidade de estudos para determinação de protocolos eficientes para um maior número de genótipos. Com isso, conseqüentemente aumenta-se a estabilidade genética e favorece-se a gestão (VIEIRA, 2013).

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o crescimento *in vitro* de acessos de mandioca em diferentes temperaturas, para auxiliar na otimização de protocolos de conservação *in vitro* de germoplasma.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Local e material vegetal

O experimento foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Mandioca e Fruticultura, na cidade de Cruz das Almas, Bahia. Foram utilizados cinco acessos de mandioca cujos códigos (BGMs), nomes vulgar, origem, parentais e locais de procedência no Brasil constam na Tabela 1.

**Tabela 1.** Relação acessos brasileiros de mandioca, com seus respectivos códigos (BGMs), nomes vulgares, origem, parentais e locais de procedência.

Acesso	Nome vulgar	Origem	Parentais	Coleta (lugar e data)
BGM1325	Mandioca João Grande	Coleta	-	Afogados da Ingazeira, PE, 1991
BGM1632	Fécula Branca	Coleta	-	São Mateus - PR, 1995
BGM1728	BRS Kiriris	Cruzamento	Parental feminino: BGM 0921; parental masculino: desconhecido	-
BGM2004	S/N (121)	Coleta	-	Urucará, AM, 2005
BGM2019	BRS Prata	Cruzamento	parental feminino: BGM 1044; parental	-

### Preparo do meio de cultura

O meio de cultura básico utilizado foi o “8S”, desenvolvido no Centro Internacional de Agricultura Tropical – CIAT, Cali, Colômbia (CIAT, 1984) e que se utiliza rotineiramente na cultura da mandioca, acrescido de 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose. O pH dos meios foi ajustado para 5,8 acrescentando, quando necessário, NaOH ou HCl 1N. O meio foi solidificado com Phytigel® (2,2 g L<sup>-1</sup>), dissolvido por aquecimento em forno de micro-ondas. 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 à autoclavagem por 20 minutos, a 120 °C.

### Instalação do experimento

Essa etapa foi realizada em câmara de fluxo laminar com o auxílio de pinça e bisturi (Figura 1), as plantas foram seccionadas em segmentos nodais de aproximadamente 1 cm, contendo uma gema. Cada explante foi posteriormente introduzido no tubo de ensaio contendo 10 mL do meio de cultura, fechado com filme de PVC e etiquetado com o código de identificação correspondente ao acesso e ao ambiente/temperatura. As culturas então foram armazenadas em sala de conservação a 22 °C (testemunha) (Figura 2) e câmaras climatizadas a 18 °C, 20 °C e 22 °C (Figura 3), sob condições ambientais que favorecem o crescimento lento das plantas: fotoperíodo de 12 horas com intensidade luminosa de 20  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  para ambos ambientes.



**Figura 1.** Processo de seccionamento de plantas micropropagadas para obtenção dos explantes de mandioca.



**Figura 2.** Acessos de mandioca submetidos à temperatura de 22 °C na sala de conservação *in vitro* de germoplasma da Embrapa Mandioca e Fruticultura.



**Figura 3.** Acessos de mandioca submetidos às temperaturas de 18 °C, 20 °C e 22 °C em câmaras climatizadas.

### Avaliação do experimento

Aos 90 dias, foram avaliadas as seguintes variáveis: a) altura da parte aérea (APA; cm); b) número de brotos (NB); c) número de folhas vivas (NFV); d) número de folhas senescentes (NFS); e) número de microestacas (NM); f) peso fresco da parte aérea (PFPA; g) peso seco da parte aérea (PSPA; g); h) peso fresco de raízes (PFR; g) e i) peso seco de raízes (PSR; g).

Para avaliar a altura da parte aérea da planta foi utilizada uma régua, medindo a planta a partir da base até a parte apical. Para as variáveis peso fresco e seco da parte aérea e de raízes a avaliação foi feita utilizando balança digital (Figura 4). Para as variáveis peso seco da parte aérea e de raízes utilizou-se estufa com circulação de ar forçada a 70 °C, onde as plantas permaneceram por 48 horas (Figura 5).





**Figura 4.** Balança digital utilizada para determinar os pesos fresco e seco da parte aérea e de raízes das plantas de mandioca submetidas às temperaturas de 22 °C na sala de conservação e 18 °C, 20 °C e 22 °C em câmaras climatizadas.



**Figura 5.** Estufas empregadas para secagem da parte aérea e de raízes das plantas de mandioca submetidas às temperaturas de 22 °C na sala de conservação e 18 °C, 20 °C e 22 °C em câmaras climatizadas.

### **Análise estatística**

O experimento foi instalado no delineamento experimental inteiramente casualizado em esquema fatorial 5 (acessos) x 4 (temperaturas), com 20 repetições, cada uma representada por uma planta cultivada em um tubo de ensaio.

Os dados coletados na avaliação foram submetidos ao teste F da análise de variância. Para as médias das temperaturas e dos acessos foram aplicadas, respectivamente, pelo teste de Tukey e pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. As análises foram realizadas com auxílio do programa estatístico R (R CORE TEAM, 2018).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em estudos de conservação *in vitro* buscam-se protocolos que estabeleçam a redução do metabolismo das plantas e subcultivos em maiores intervalos de tempo, porém, menor crescimento, menor valor de folhas senescentes e maior número de folhas vivas. Sendo assim, é fundamental a associação entre essas variáveis como forma de identificar o crescimento mínimo, não inviabilizando a multiplicação, recuperação e resgate subsequente das plantas.

Na Tabela 1, é apresentada a análise de variância, onde é possível observar que houve efeito altamente significativo ( $p < 0,01$ ) da interação Temperaturas x Acessos para número de brotos (NB), número de folhas vivas (NFV), número de folhas senescentes (NFS), altura da parte aérea (APA), peso fresco da parte aérea (PFPA), peso seco da parte aérea (PSPA) e peso seco de raízes (PSR), enquanto para as variáveis número de microestacas (NM) e peso fresco de raízes (PFR) houve efeito significativo a 5% de probabilidade. O peso seco de raízes, dentro do fator temperatura, foi a única variável que não apresentou efeito significativo ( $p > 0,05$ ).

Os coeficientes de variação (CV) obtidos oscilaram entre 16,56% e 49,53% para número de brotos e número de folhas vivas, respectivamente. Esses valores podem estar associados à instabilidade das plantas em experimentos *in vitro*, sendo considerados normais para trabalhos em cultura de tecidos vegetais. No entanto, cada variável é influenciada por diferentes fatores desconhecidos e não controlados, necessitando assim de faixas de classificação do CV específicas para inferir sobre a precisão experimental (WERNER et al., 2012). Isso demonstra que, apesar do controle nas condições de cultivo, a distribuição dos dados de resposta não costuma seguir o pressuposto da normalidade, gerando CV's bastante elevados (CARVALHO, 2013). Em estudo relacionado com micropropagação de *Manihot esculenta* Crantz foram encontrados CV's com variações entre 18,99% e 63,51% (VIDAL et al., 2013). Resultados similares aos coeficientes de variação foram encontrados também em estudo envolvendo a conservação *in vitro* de espécies silvestres de *Manihot*, onde os CV's variaram entre 10,54% e 36,96% (SILVEIRA, 2017). Se tratando da mandioca, é possível que a causa desses altos coeficientes de variação seja pela dificuldade em se homogeneizar a condição das microestacas utilizada na instalação do experimento, provavelmente devido a eventos fisiológicos que ocorrem nas fases de enraizamento e crescimento.

**Tabela 1.** Resumo da análise de variância para número de brotos (NB), número de folhas vivas (NFV), número de folhas senescentes (NFS), altura da parte aérea (APA; em cm), número de microestacas (NM), peso fresco da parte aérea (PFPA), peso seco da parte aérea (PFR), peso fresco de raízes (PFR) e peso seco de raízes, todas em g, dos acessos (BGM1325, BGM1632, BGM1728, BGM2004 e BGM2019), em função das temperaturas de 18 °C, 20 °C e 22 °C (câmara climatizada), e 22 °C (controle; sala de conservação) a que foram submetidos.

FV	GL	QM								
		NB	NFV	NFS	APA	NM	PFPA	PSPA	PFR	PSR
Temperatura	3	0,13666**	18,15957**	7,99024**	130,96046**	23,49469**	0,15136**	0,00152**	0,01035*	0,00003 <sup>ns</sup>
Acessos	4	0,13374**	37,39009**	3,04907**	227,08028**	47,51078**	0,19727**	0,00233**	0,05309**	0,00050**
Temperatura X Acessos	12	0,14284**	3,42732**	1,63285**	25,91432**	2,97134*	0,02395**	0,00016**	0,00608*	0,00006**
Erro	79	0,03335	1,18311	0,33806	4,03071	1,60372	0,00430	0,00006	0,00300	0,00002
CV (%)		16,56	49,53	47,28	38,91	39,71	41,25	39,55	46,52	41,31
Média Geral		1,10	2,20	1,23	5,16	3,19	0,16	0,02	0,12	0,01

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

As variáveis analisadas neste trabalho indicam o bom desenvolvimento das plantas e seu vigor, como número de brotos, número de folhas vivas, altura da parte aérea e número de microestacas, bem como o estágio fisiológico ou fase de senescência em que a planta se encontra, analisado pelo número de folhas senescentes. Essa última variável é fundamental para auxiliar na delimitação do tempo de cultivo e do momento exato para a transferência da planta para um meio de cultura, indicando a realização de um novo subcultivo.

Em estudos de conservação *in vitro* busca-se por protocolos que estabeleçam a redução do metabolismo das plantas, maior intervalo entre subcultivos, menor crescimento, menor número de folhas senescentes e maior número de folhas vivas. Sendo assim, é fundamental a associação entre essas variáveis como forma de identificar o crescimento mínimo, não inviabilizando a multiplicação, recuperação e resgate subsequente das plantas.

Na Tabela 2 é observado que o valor médio do número de brotos (NB) para os acessos BGM1325, BGM1632 e BGM1728 não apresentou diferença estatística entre as temperaturas avaliadas, de acordo com o teste de Tukey a 5% de probabilidade. Já para o acesso BGM2004, a temperatura testemunha foi a que propiciou o maior valor médio para NB, diferindo das demais temperaturas. Para o acesso BGM2019, o maior valor médio para essa variável ocorreu na temperatura de 18 °C (1,30), porém, diferiu estatisticamente apenas da temperatura de 20 °C (0,93).

Na temperatura testemunha, o melhor resultado foi apresentado pelo acesso BGM2004, com valor médio de 1,72 brotos, pertencendo a um grupo distinto dos demais, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Para as demais temperaturas testadas (18 °C, 20 °C e 22 °C), não houve diferença estatística, e, com isso, todos acessos ficaram alocados no mesmo grupo (Tabela 2).

Levando-se em consideração a melhor combinação entre acesso e temperatura, o maior valor médio (1,72) para número de brotos foi apresentado pelo acesso BGM2004 com a temperatura testemunha, diferindo estatisticamente dos demais acessos (Tabela 2). Apenas na associação do acesso BGM2019 com a temperatura de 20 °C a média de número de brotos ficou abaixo de 1, porém sem diferir estatisticamente dos demais acessos (Tabela 2).

Em estudo semelhante, de conservação *in vitro* do gênero *Manihot*, os genótipos utilizados apresentaram média para o número de brotos de 1,34 cm quando

mantidos na temperatura de 22 °C (sala de conservação), sob fotoperíodo de 12 horas (SILVEIRA, 2017).

**Tabela 2.** Valores médios para número de brotos (NB) obtidos em cinco acessos de mandioca, submetidos à temperaturas de 18 °C, 20 °C e 22 °C (câmaras climatizadas) e 22 °C em sala de conservação (testemunha). Cruz das Almas, 2018.

Acessos	Ambientes/Temperaturas (°C)			
	Testemunha (22)	18	20	22
BGM1325	1,00 bA	1,00 aA	1,00 aA	1,00 aA
BGM1632	1,05 bA	1,15 aA	1,03 aA	1,07 aA
BGM1728	1,10 bA	1,20 aA	1,00 aA	1,12 aA
BGM2004	1,72 aA	1,05 aB	1,15 aB	1,00 aB
BGM2019	1,07 bAB	1,30 aA	0,93 aB	1,10 aAB

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas pertencem ao mesmo grupo pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade e maiúsculas nas linhas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Para os acessos BGM1325 e BGM2019, as temperaturas avaliadas não apresentaram diferença estatística pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, para os valores médios do número de folhas vivas (Tabela 3). Para o acesso BGM2004, o maior valor médio para o NFV (5,70) foi observado na temperatura de 18°C, diferenciando-se estatisticamente dos demais, exceto o BGM1728.

Na conservação *in vitro* de mandioca, VIEIRA (2013) utilizou o mesmo meio de cultura (8S) e temperatura (sala de conservação a 22 °C) utilizado nesse trabalho, para avaliar o número de folhas vivas. Essa variável estava entre as que mais contribuíram para avaliar o comportamento das plantas. Dessa forma, a seleção das variáveis mais importantes nos estudos de conservação *in vitro* permite maior clareza nas conclusões dos resultados, assim como análises posteriores.

O maior número de folhas vivas encontrado no estudo de SILVEIRA (2017) foi de 8,47, em plantas de mandioca cultivadas *in vitro* submetidas à temperatura de 22 °C (sala de conservação) em meio “8S”, semelhante com a metodologia utilizada nesse trabalho.

Em um estudo envolvendo a influência de condições de incubação na conservação *in vitro* de germoplasma de citrus, a condição de conservação utilizada foi semelhante com o presente estudo. CARVALHO (2013) encontrou diferenças no número de folhas verdes em cada temperatura testada. O ambiente que apresentou resultados semelhantes com o presente trabalho foi em câmara climatizada com

temperatura de 17 °C, onde a média do número de folhas verdes encontrado foi de 4,61.

Na temperatura testemunha, o melhor resultado para NFV foi apresentado pelo acesso BGM2004, com valor médio de 5,05, pertencendo a um grupo estatisticamente distinto dos demais acessos pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Na temperatura de 18 °C, os acessos BGM2004 e BGM1728 apresentaram maiores valores médios, com 5,70 e 4,65, respectivamente, pertencendo a um grupo distinto dos demais acessos pelo teste estatístico.

Para as temperaturas de 20°C e 22°C, os acessos BGM1728, BGM2004 e BGM2019 apresentaram os maiores valores médios para a característica avaliada, pertencendo ao mesmo grupo e diferenciando, portanto, dos demais. Já na temperatura de 18 °C os acessos BGM1728 e BGM2004 pertencem estatisticamente ao mesmo grupo, diferindo dos outros três acessos (BGM1325, BGM1632 e BGM2019).

As melhores combinações foram observadas no acesso BGM2004 com a temperatura testemunha e 18 °C e no BGM1728 também na temperatura de 18 °C.

Considerando os fatores de forma isolada, os melhores resultados para número de folhas vivas foram obtidos na temperatura de 18 °C e no BGM2004.

**Tabela 3.** Valores médios para número de folhas vivas (NV) obtidos de cinco acessos de mandioca, BGM1325, BGM1632, BGM1728, BGM2004 e BGM2019, submetidos à temperaturas de 18 °C, 20 °C e 22 °C (câmaras climatizadas) e 22 °C em sala de conservação (testemunha).

Acessos	Ambientes/Temperaturas (°C)			
	Testemunha (22)	18	20	22
BGM1325	0,50 cA	0,85 cA	0,17 bA	0,10 bA
BGM1632	1,20 cB	3,20 bA	0,55 bB	0,37 bB
BGM1728	3,05 bAB	4,65 aA	1,60 aB	1,87 aB
BGM2004	5,05 aA	5,70 aA	2,30 aB	3,05 aB
BGM2019	2,08 cA	2,22 bA	2,57 aA	2,45 aA

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas pertencem ao mesmo grupo pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade e maiúsculas nas linhas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Na Tabela 4, encontram-se os valores médios para a variável número de folhas senescentes (NFS). Para os acessos BGM1325, BGM1632 e o BGM2019, a temperatura que apresentou maior valor para o NFS foi a de 18 °C, diferenciando, assim, das demais temperaturas avaliadas, pelo teste de Tukey a 5% de

probabilidade. Para o BGM2004, o maior valor médio para o NFS, foi observado na temperatura testemunha, que não diferiu das médias alcançadas nas temperaturas de 18 °C e 20 °C, mas foi estatisticamente superior à da temperatura de 22 °C. Já para o BGM1728 não houve diferença estatística para os valores médios obtidos em nenhuma das temperaturas avaliadas.

Na temperatura testemunha e aos 20 °C, as maiores médias para NFS ocorreram nos acessos BGM1728 e BGM2004, pertencentes ao mesmo grupo e distintas dos demais acessos pelo agrupamento de Scott-Knott. Já nas temperaturas de 18 °C e 22 °C, os acessos BGM1325, BGM1632, BGM1728 e BGM2004 mostraram as médias mais baixas para NFS, compondo o mesmo grupo (Tabela 4).

O resultado encontrado por SILVEIRA (2017) em relação ao número de folhas senescentes de plantas de mandioca *in vitro*, em temperatura de 22 °C (sala de conservação), foi de 0,81. Sendo que as menores médias estimadas, utilizando plantas submetidas no mesmo meio de cultura (8S) utilizado nesse trabalho, foi entre as variáveis altura de planta e número de folhas senescentes.

No estudo de CARVALHO (2013) envolvendo adequação de condições de crescimento mínimo para conservação *in vitro* de germoplasma de citros utilizando câmaras climatizadas com temperatura de 17 °C, o coeficiente de variação na interação de ambiente x genótipo para a variável número de folhas senescentes foi de 42,78%, semelhante com o presente trabalho (47,28%). Com isso, de acordo com os resultados obtidos e demais estudos envolvendo experimentos na área de cultura de tecidos, fica evidente que os coeficientes de variação são elevados e especificamente para essa variável. Houve semelhança nos valores encontrados, apesar de não se tratar da mesma cultura, porém, trata-se da influência de condições de incubação na conservação de germoplasma *in vitro*.

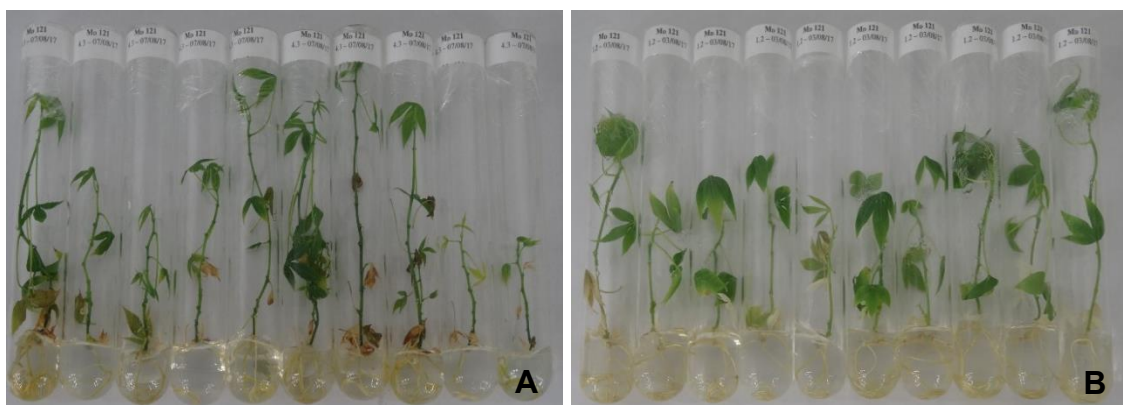
A variável número de folhas senescentes é um identificador para conservação *in vitro*, pois, o que acontece com a planta no campo, demonstra a expressão do processo de envelhecimento da mesma (CARVALHO, 2013). O maior problema é estabelecer o período apropriado que se deve realizar o subcultivo sem comprometer a regeneração futura das plantas (CANTO et al., 2004). Nesse contexto, esse é um dos maiores obstáculos para o estabelecimento de grandes coleções *in vitro*.

**Tabela 4.** Valores médios para número de folhas senescentes (NFS) obtidos de cinco acessos de mandioca, BGM1325, BGM1632, BGM1728, BGM2004 e BGM2019, submetidos à temperaturas de 18 °C, 20 °C e 22 °C (câmaras climatizadas) e 22 °C em sala de conservação (testemunha).

Acessos	Ambientes/Temperaturas (°C)			
	Testemunha (22)	18	20	22
BGM1325	0,30 bB	1,90 bA	0,50 bB	0,50 bB
BGM1632	0,27 bB	2,00 bA	0,40 bB	0,97 bB
BGM1728	1,72 aA	1,68 bA	1,30 aA	1,35 bA
BGM2004	1,57 aA	1,45 bAB	1,05 aAB	0,55 bB
BGM2019	0,93 bC	3,22 aA	0,57 bC	2,23 aB

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas pertencem ao mesmo grupo pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade e maiúsculas nas linhas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

As plantas observadas na Figura 1 armazenadas na sala de conservação a 22 °C, evidenciam que há resultados distintos de acessos de mandioca quando submetidos ao mesmo ambiente de cultivo. A Figura 1A refere-se ao BGM1728, que apresentou diferença significativa e facilmente observada em relação ao BGM1632. Esse acesso apresentou maior valor médio para o número de folhas senescentes, apresentando folhas amareladas e com aparência pouco sadia, relevando que o ambiente de cultivo reduz o metabolismo e compromete o desenvolvimento da planta, consequentemente acelerando a queda de folhas. Enquanto que a Figura 1B refere-se ao BGM1632 que apresentou menor valor médio para a variável número de folhas senescentes, com plantas mais saudias e maiores números de folhas verdes, demonstrando a importância da associação das variáveis número de folhas senescentes e número de folhas vivas.



**Figura 6.** Plantas de mandioca conservadas *in vitro* armazenadas na sala de conservação a 22 °C referente aos acessos BGM1728 (A) e BGM1632 (B).



A altura é outra variável de grande importância em estudos de conservação *in vitro* e indica um dos parâmetros na redução do metabolismo da planta. Na Tabela 5, os acessos BGM1325 e o BGM2019 foram superiores aos demais em todas as temperaturas avaliadas, não diferindo entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Para os acessos BGM2004 e BGM1728 os maiores valores referentes a APA foram observados na temperatura testemunha e de 18 °C, respectivamente, não diferindo entre si.

Os menores valores para a APA em todas as faixas de temperaturas testemunha, 18 °C, 20 °C e 22 °C ocorreu no BGM1325, com 1,60 cm, 2,82 cm, 1,74 cm e 1,67 cm, não diferindo entre si pelo teste de Tukey.

Na temperatura testemunha, o acesso BGM2004 apresentou o maior valor médio para essa característica, diferindo dos demais grupos, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Os menores valores observados na temperatura testemunha foram para os acessos BGM1325, BGM1632 e o BGM2019, respectivamente 1,60 cm, 1,64 cm e 2,68 cm, pertencendo a um grupo distinto dos demais acessos nessa mesma faixa de temperatura.

As melhores combinações, levando em consideração os menores valores médios para altura da parte aérea, foram observadas nos acessos BGM1325 e BGM1632 na temperatura testemunha, com valores médios de 1,60 cm e 1,64 cm, respectivamente (Tabela 5).

Foi encontrado o coeficiente de variação referente a variável altura similar a esse trabalho, em que VIEIRA (2013) no estudo envolvendo conservação *in vitro* de mandioca encontrou 41,97 %.

**Tabela 5.** Valores médios para altura da parte aérea (APA; em cm) obtidos de cinco acessos de mandioca, BGM1325, BGM1632, BGM1728, BGM2004 e BGM2019, submetidos às temperaturas de 18 °C, 20 °C e 22 °C (câmaras climatizadas) e 22 °C em sala de conservação (testemunha).

Acessos	Ambientes/Temperaturas (°C)			
	Testemunha (22)	18	20	22
BGM1325	1,60 cA	2,82 bA	1,74 bA	1,67 bA
BGM1632	1,64 cB	5,75 bA	2,38 bB	1,67 bB
BGM1728	5,44 bB	14,56 aA	4,53 aB	4,98 aB
BGM2004	11,32aB	15,50 aA	5,83 aC	7,08 aC
BGM2019	2,68 cA	4,06 bA	3,41 bA	3,84 bA

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas pertencem ao mesmo grupo pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade e maiúsculas nas linhas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

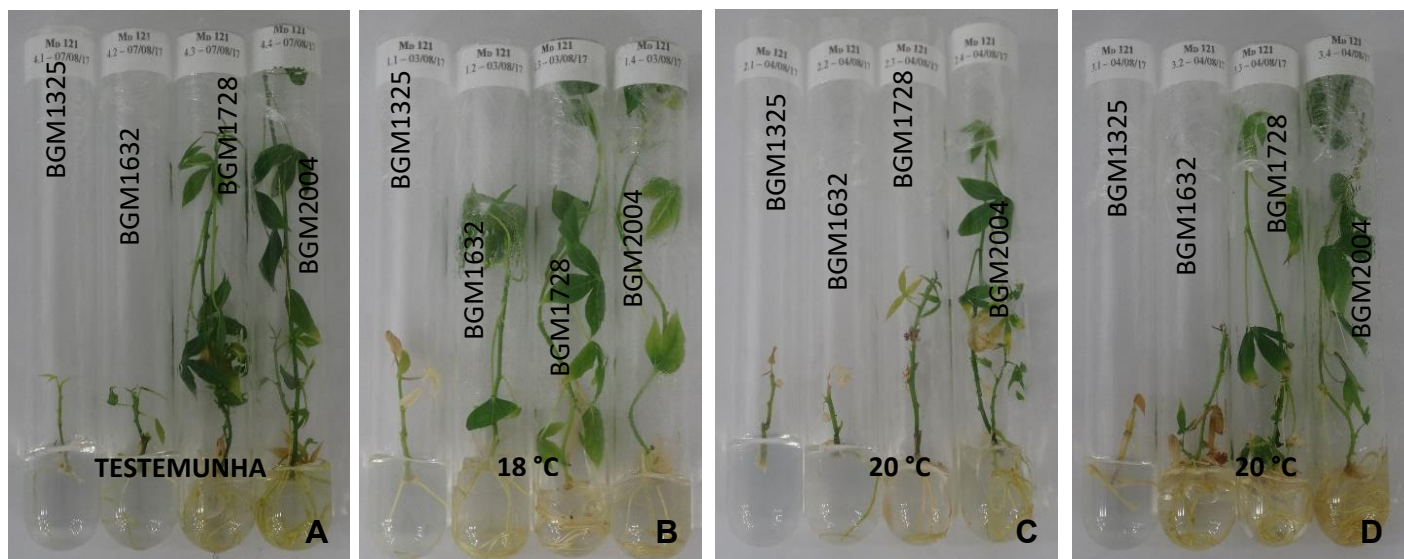
De acordo com a Figura 7 fica evidente a diferença de comportamento de crescimento entre os acessos avaliados, mostrando que o BGM1325 apresentou menores médias de altura em relação aos demais acessos, entretanto, o BGM2004 se destacou para maior crescimento da parte aérea. Esse resultado podeá ser considerado atraente para a gestão de bancos de germoplasma *in vitro*, uma vez que um dos grandes problemas encontrados é o comportamento desigual observado entre os genótipos conservados.

Para VIEIRA (2013), esse comportamento contante do germoplasma de mandioca *in vitro*, confirma o que se considera um dos problemas na conservação da cultura, que se baseia justamente na resposta específica de cada acesso em condições estabelecidas. A manutenção da viabilidade das plantas após o período de incubação é um dos fatores mais importantes na conservação *in vitro*, para resultar seu posterior resgate e concluir de forma objetiva o que se propõe.

Conforme esses resultados fica claro mais uma vez a forte relação de genótipo-dependência que existe no comportamento *in vitro* de variedades de mandioca e quanto pode ser restritivo e determinante para a escolha da temperatura adequada no ambiente de cultivo.

No entanto, uma observação importante é que apesar de ter ocorrido esse comportamento desigual no crescimento das plantas, deve-se levar em consideração que os valores elevados encontrados neste trabalho são similares a outros estudos envolvendo conservação *in vitro* de mandioca. SILVEIRA (2017) ao estudar cinco experimentos distintos envolvendo conservação *in vitro* de mandioca, encontrou valores estimados para essa variável, que oscilam de 10,70 cm até 25,64 cm de altura.

Independente da temperatura em estudo, os acessos BGM1325 e BGM1632 apresentaram menor altura da parte aérea.



**Figura 7.** Plantas de mandioca dos acessos BGM1325, BGM1632, BGM1728 e BGM2004 submetidas a temperatura testemunha (A), 18 °C (B), 20 °C (C) e 22 °C (D), respectivamente.

Na Tabela 6, os acessos BGM1325 e BGM2019 também não diferiram para os valores médios de número de microestacas (NM) em nenhuma das temperaturas avaliadas, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Já para o acesso BGM1632, o maior valor referente ao NM, foi observado à 18 °C, com valor médio de 3,97, diferindo dos resultados apresentados nas demais temperaturas. Para os acessos BGM1728 e BGM2004, as maiores médias para o NM foram verificadas na temperatura testemunha e aos 18 °C, não diferindo entre si. Porém, o BGM1728, na temperatura testemunha não diferiu dos resultados observados nas temperaturas de 20 °C e 22 °C.

A importância da variável avaliada em determinado estudo irá depender da espécie utilizada. O número de microestacas não é decisivo na conservação de germoplasma de citros, segundo CARVALHO (2013). Mas para o germoplasma de mandioca essa variável torna-se bastante relevante, uma vez que na mesma planta obtêm-se diversas microestacas e seu desenvolvimento irá depender do tratamento experimental. Existe uma complicação na quebra de dominância apical em mandioca *in vitro* e conseqüentemente a multiplicação torna-se dependente do número de microestacas (VIEIRA, 2013).

Na temperatura testemunha, o acesso BGM2004 apresentou o maior valor médio para essa característica, diferindo dos demais grupos, pelo teste de Scott-Knott. Já na temperatura de 18 °C os acessos BGM1728 e o BGM2004 pertenceram ao mesmo grupo e diferiram dos demais acessos. Nas temperaturas de 20 °C e 22 °C,

os acessos BGM1728, BGM2004 e BGM2019 apresentaram os melhores resultados, pertencendo ao mesmo grupo, diferindo dos demais (Tabela 6).

Os melhores resultados para essa variável foram observados no acesso BGM1728 cultivado sob a temperatura de 18 °C, com valor médio de 6,33 microestacas, e no acesso BGM2004 nas temperaturas testemunha e 18 °C, com valores médios de 6,28 e 6,85 microestacas, respectivamente (Tabela 6).

Os menores valores médios de NM foram obtidos no acesso BGM1325, para as temperaturas de 18 °C, 20 °C e 22 °C. E os maiores valores referente ao número de microestacas foram no acesso BGM2004, para todas as temperaturas testadas.

**Tabela 6.** Valores médios para número de microestacas (NM) obtidos de cinco acessos de mandioca, BGM1325, BGM1632, BGM1728, BGM2004 e BGM2019, submetidos à temperaturas de 18 °C, 20 °C e 22 °C (câmaras climatizadas) e 22 °C em sala de conservação (testemunha).

Acessos	Ambientes/Temperaturas (°C)			
	Testemunha (22)	18	20	22
BGM1325	1,47 cA	2,20 bA	1,08 bA	1,00 bA
BGM1632	1,43 cB	3,97 bA	1,33 bB	1,30 bB
BGM1728	4,27 bAB	6,33 aA	2,60 aB	3,42 aB
BGM2004	6,28 aA	6,85 aA	4,10 aB	3,80 aB
BGM2019	2,48 cA	3,43 bA	2,97 aA	3,05 aA

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas pertencem ao mesmo grupo pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade e maiúsculas nas linhas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Na Tabela 7, os acessos BGM1325 e BGM2019 novamente não diferiram para os valores médios de peso fresco da parte aérea (PFPA), em nenhuma das temperaturas avaliadas. Já para os acessos BGM1632, BGM1728 e BGM2004 os maiores valores referentes ao PFPA, foram observados à 18 °C, diferindo significadamente das médias alcançadas nas outras temperaturas.

Na temperatura testemunha e aos 20 °C, o acesso BGM2004 apresentou os maiores valores médios para essa variável, diferindo dos demais acessos. Na temperatura de 18 °C, os acessos BGM1728 e BGM2004 pertencem ao mesmo grupo, diferindo, portanto dos demais. Já aos 22 °C, os acessos BGM1728, BGM2004 e BGM2019 apresentaram os maiores valores para PFPA, pertencendo ao mesmo grupo e diferindo das demais acessos (Tabela 7).

Os melhores resultados foram observados nos acessos BGM1728 e BGM2004 com a temperatura de 18 °C, com valores médios de 0,48 g e 0,44 g, respectivamente (Tabela 7).

**Tabela 7.** Valores médios para peso fresco da parte aérea (PFPA) (g) obtidos de cinco acessos de mandioca, BGM1325, BGM1632, BGM1728, BGM2004 e BGM2019, submetidos à temperaturas de 18 °C, 20 °C e 22 °C (câmaras climatizadas) e 22 °C em sala de conservação (testemunha).

Acessos	Ambientes/Temperaturas (°C)			
	Testemunha (22)	18	20	22
BGM1325	0,04 cA	0,06 cA	0,03 bA	0,05 bA
BGM1632	0,04 cB	0,21 bA	0,07 bB	0,07 bB
BGM1728	0,16 bB	0,48 aA	0,11 bB	0,19 aB
BGM2004	0,32 aB	0,44 aA	0,20 aC	0,20 aC
BGM2019	0,07 cA	0,18 bA	0,08 bA	0,16 aA

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas pertencem ao mesmo grupo pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade e maiúsculas nas linhas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Na Tabela 8, apenas o acesso BGM1325 não diferiu para os valores médios de peso seco da parte aérea (PSPA), em nenhuma das temperaturas avaliadas. Já para os acessos BGM1728 e BGM2004 os maiores valores referentes ao PSPA foram observados na temperatura de 18 °C, não diferindo entre si, mas diferenciando-se estatisticamente dos resultados observados nas demais temperaturas. O BGM2004 apresentou a maior média na temperatura de 18 °C, diferindo dos resultados das temperaturas de 20 °C e 22 °C.

Na testemunha, o acesso BGM2004 apresentou o maior valor médio para o PSPA, diferindo dos demais grupos, pelo teste de Scott-Knott. Já nas temperaturas de 18 °C e 20 °C, os acessos BGM1728 e o BGM2004 formaram um grupo. Na temperatura de 22 °C, os acessos BGM1728, BGM2004 e o BGM2019 apresentaram os melhores resultados, pertencendo ao mesmo grupo (Tabela 8).

As combinações dos tratamentos que propiciaram as maiores médias para PSPA aconteceram com os BGMs 1728 e 2004 cultivados na temperatura de 18 °C, com valor médio de 0,05 g em ambos os acessos (Tabela 8).

**Tabela 8.** Valores médios para peso seco da parte aérea (PSPA) (g) obtidos de cinco acessos de mandioca, BGM1325, BGM1632, BGM1728, BGM2004 e BGM2019, submetidos à temperaturas de 18 °C, 20 °C e 22 °C (câmaras climatizadas) e 22 °C em sala de conservação (testemunha).

Acessos	Ambientes/Temperaturas (°C)			
	Testemunha (22)	18	20	22
BGM1325	0,01 cA	0,01 cA	0,00 bA	0,01 bA
BGM1632	0,01 cB	0,03 bA	0,01 bB	0,01 bB
BGM1728	0,02 bB	0,05 aA	0,02 aB	0,03 aB
BGM2004	0,04 aAB	0,05 aA	0,02 aC	0,03 aBC
BGM2019	0,01 cB	0,03 bA	0,01 bB	0,02 aAB

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas pertencem ao mesmo grupo pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade e maiúsculas nas linhas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Na Tabela 9, verifica-se que os acessos BGM1325, BGM2004 e BGM2019 não diferiram entre si para os valores médios de peso fresco da raiz (PFR), em nenhuma das temperaturas avaliadas. Já para os acessos BGM1632, o maior valor referente ao PFR, foi observado na temperatura de 18 °C (0,15 g) e diferiu dos resultados obtidos nas temperaturas testemunha e 20 °C, pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade. O BGM1728 apresentou os maiores valores para PFR nas temperaturas de 18 °C e 22 °C, com valores médios de 0,18 g e 0,19 g, respectivamente, diferindo da média alcançada na testemunha (0,09 g).

Na temperatura testemunha, o acesso BGM2004, apresentou a média mais alta para o PFR (0,19 g), formando um grupo pelo teste de Scott-Knott. Já na temperatura de 18 °C, os acessos BGM1632, BGM1728, BGM2004 e BGM2019 apresentaram resultados semelhantes para PFR, pertencendo ao mesmo grupo. Nas temperaturas de 20 °C e 22 °C, os acessos BGM1728, BGM2004 e o BGM2019, pertencem ao mesmo grupo, apresentando valores médios semelhantes para PFR.

De modo geral, os BGMs 1728 e 2004 se sobressaíram em relação aos demais acessos em cada um dos quatro tratamentos relacionados com fator temperatura.

**Tabela 9.** Valores médios para peso fresco de raiz (PFR) (g) obtidos de cinco acessos de mandioca, BGM1325, BGM1632, BGM1728, BGM2004 e BGM2019, submetidos à temperaturas de 18 °C, 20 °C e 22 °C (câmaras climatizadas) e 22 °C em sala de conservação (testemunha).

Acessos	Ambientes/Temperaturas (°C)			
	Testemunha (22)	18	20	22
BGM1325	0,02 bA	0,02 bA	0,02 bA	0,05 bA
BGM1632	0,03 bB	0,15 aA	0,03 bB	0,09 bAB
BGM1728	0,09 bB	0,18 aA	0,15 aAB	0,19 aA
BGM2004	0,19 aA	0,19 aA	0,12 aA	0,17 aA
BGM2019	0,10 bA	0,16 aA	0,11 aA	0,13 aA

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas pertencem ao mesmo grupo pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade e maiúsculas nas linhas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Na Tabela 10 encontram-se os dados referentes ao peso seco de raiz (PSR). Observa-se que os acessos BGM1325, BGM2004 e BGM2019 não diferiram entre si para os valores médios de PSR em nenhuma das temperaturas avaliadas. Para o acesso BGM1632, o maior valor referente ao PSR foi observado na temperatura de 18 °C que não diferiu das médias alcançadas aos 20 °C e 22 °C, mas foi estatisticamente superior à testemunha. O BGM1728 apresentou os melhores resultados para PSR nas temperaturas de 20 °C e 22 °C, diferindo da temperatura testemunha. Porém, o resultado obtido para essa característica na faixa de 18 °C não diferiu do resultado observado na testemunha.

Na temperatura testemunha, os acessos BGM1728, BGM2004 e BGM2019 apresentaram os maiores valores médios para essa característica, pertencendo ao mesmo grupo, pelo teste de Scott-Knott. Já na temperatura de 18 °C, os acessos BGM1632, BGM1728, BGM2004 e BGM2019 apresentaram resultados semelhantes para PSR, compondo o mesmo grupo. Nas temperaturas de 20 °C e 22 °C, o acesso BGM1728, apresentou valores médios superiores para PSR, diferindo dos demais grupos (Tabela 10).

As médias mais elevadas foram observadas no acesso BGM1728 à 20 °C e 22 °C, respectivamente 0,021 g e 0,020 g, seguido do BGM2004 na testemunha (0,018 g) e do BGM2019 na temperatura de 18 °C (0,017 g) (Tabela 10).

**Tabela 10.** Valores médios para peso seco de raíz (PSR) (g) obtidos de cinco acessos de mandioca, BGM1325, BGM1632, BGM1728, BGM2004 e BGM2019, submetidos à temperaturas de 18 °C, 20 °C e 22 °C (câmaras climatizadas) e 22 °C em sala de conservação (testemunha).

Acessos	Ambientes/Temperaturas (°C)			
	Testemunha (22)	18	20	22
BGM1325	0,002 bA	0,003 bA	0,001 cA	0,005 cA
BGM1632	0,004 bB	0,013 aA	0,006 cAB	0,009 cAB
BGM1728	0,010 aB	0,015 aAB	0,021 aA	0,020 aA
BGM2004	0,018 aA	0,015 aA	0,013 bA	0,014 bA
BGM2019	0,012 aA	0,017 aA	0,013 bA	0,012 bA

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas pertencem ao mesmo grupo pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade e maiúsculas nas linhas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.



## CONCLUSÕES

A temperatura de cultivo influencia no crescimento mínimo de plantas de mandioca conservadas *in vitro*.

Os acessos BGM1325 e BGM1632 apresentaram menor altura da parte aérea e menor número de folhas senescentes, independente da temperatura, enquanto que o BGM2004 apresentou maior número de folhas verdes

A temperatura testemunha (sala de conservação) e a temperatura de 20 °C e 22 °C em câmara climatizada demonstram resultados promissores para redução do crescimento *in vitro* de plantas de mandioca, considerando os acessos avaliados.

## REFERÊNCIAS

CANTO, A. M. Conservação *in vitro* de germoplasma de abacaxi tratado com paclobutrazol. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v. 39, n. 7. 2004.

CARVALHO, M. de J. da S. de. 2013. 84 f. **Adequação da condição de crescimento mínimo para a conservação *in vitro* de germoplasma de citros.** Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, Bahia.

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 Recursos Genéticos Vegetais). Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. Cruz das Almas. 2013.

CASTILLO, A. M.; EGANA, B.; SANZ, J. M.; CISTUE, L. Somatic embryogenesis and plant regeneration from barley cultivars grown in Spain. Plant Cell Rep. 17: 902–906, 1998.

CEREDA, M. P.; VILPOUX, O. Metodologia para divulgação de tecnologia para agroindústrias rurais: exemplo do processamento de farinha de mandioca no Maranhão. Revista Brasileira de Gestão e Desenvolvimento Regional, 6:219-250, 2010.

CIAT. **El cultivo de meristemas para la conservacion de germoplasma de yucca *in vitro*.** Cali, 1984. 44 p.

DÓSEA, R. R.; MARCELLINI, P. S.; SANTOS, A. A.; RAMOS, A. L. D.; LIMA, A. S. Qualidade microbiológica na obtenção de farinha e fécula de mandioca em unidades tradicionais e modelo. Ciência Rural, 40:441-446, 2010.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Levantamento sistemático da produção Agrícola-LSPA.** Disponível em:

<[ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao\\_Agricola/Levantamento\\_Sistematico\\_da\\_Producao\\_Agricola\[mensal\]/Fasciculo/lspa\\_201701.pdf](ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Levantamento_Sistematico_da_Producao_Agricola[mensal]/Fasciculo/lspa_201701.pdf)>. Acesso em: 06 jul. 2018.

OLUWAMUKOMI, M. O.; OLUWALANA, I. B.; AKINBOWALE, O. F. Physicochemical and sensory properties of wheat-cassava composite biscuit enriched with soy flour. *African Journal of Food Science*, 5:50-56, 2011.

R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2018. Disponível em: <<http://www.R-project.org/>>. Acesso em 01 jul. 2018.

REED, B. M.; GUPTA, S.; UCHENDU, E. E. *In vitro* genebanks for preserving tropical biodiversity. NORMAH, M.N.; CHIN, H.F.; REED, B.M. (Org.). *Conservation of tropical plant species*. Springer. New York. P. 77106. 2013.

REZENDE, M. E. de; CARDOSO, L. D.; MATSUMOTO, K.; FLORES, P. S. Uso do nitrato de prata na conservação *in vitro* de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS, 21.; CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS, 8., 2017, Bonito. Anais... [S.l.]: SBFPO: ABCTP, 2017.

REZENDE, M. E. de; CARDOSO, L. D.; MATSUMOTO, K.; FLORES, P. S. Uso do nitrato de prata na conservação *in vitro* de batata (*Solanum tuberosum* L.). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS, 21.; CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS, 8., 2017, Bonito. Anais... [S.l.]: SBFPO: ABCTP, 2017.

SCARIOT, A. O.; SEVILLA, A. C. Conservação *in situ* de recursos genéticos vegetais. In: NASS, L. L. (Ed.). **Recursos genéticos vegetais**. Brasília: DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007. p. 474-509.

SILVEIRA, D. M. de. S. 2017. 70 f. Multiplicação e conservação *in vitro* de espécies silvestres de *Manihot*. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) – Universidade Federal do Recôncavo Baiano, Cruz das Almas, Bahia, 2017. f.70.

VIDAL, A. M.; SOUZA, A. da. S.; MENEZES, M. C.; SILVEIRA, D. M. de. S.; SILVA NETO, H. P. da. S.; 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.

VIEIRA, L. de. JESUS. Conservação *in vitro* e criopreservação de espécies de *Manihot*. 2013. 103 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia). Universidade Estadual de Feira de Santana. Feira de Santana. 2013.

WALTER, B. M.T.; CAVALVANTI, T. B.; BIANCHETTI, L. B.; VALLS, J. F. M. Coleta de germoplasma: relevância e conceitos básicos. In: WALTER, B.M.T.; CAVALCANTI, T. B. (Ed.). **Fundamentos para a coleta de germoplasma vegetal**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007. p. 27- 42.

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 e Micropropagation**. 2012. v. 8, n. 1-2, p. 27-36.

ZHANG, P.; PHANSIRI, S.; PUONTI-KAERLAS, J. Improvement of cassava organogenesis by the of silver nitrate *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 67: 47-54, 2001.

**CAPÍTULO II**  
**CONCENTRAÇÕES DE NITRATO DE PRATA NA CONSERVAÇÃO *IN***  
***VITRO* DE GERMOPLASMA DE MANDIOCA (*Manihot esculenta***  
**Crantz)**

## CONCENTRAÇÕES DE NITRATO DE PRATA NA CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DE GERMOPLASMA DE MANDIOCA (*Manihot esculenta* Crantz)

### RESUMO:

Há uma grande diversificação no comportamento das culturas conservadas *in vitro*, principalmente no que se refere à qualidade do microambiente dentro dos fracos e as trocas gasosas com o ambiente externo. Em estudos que abordam o cultivo *in vitro* de plantas, o mais explorado atualmente é a influência e composição de gases nos recipientes de cultivo. O etileno é um gás que atua como fitohormônio, exerce influência no processo deteriorativo da planta e retardo do seu crescimento. O nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ ) é um inibidor do etileno, que associado a temperaturas baixas influencia no enraizamento e multiplicação *in vitro*, e vem sendo estudado para reduzir o crescimento na conservação *in vitro* de germoplasmas vegetais. O objetivo deste trabalho foi avaliar concentrações de nitrato de prata ( $0 \text{ mg L}^{-1}$  (controle);  $5 \text{ mg L}^{-1}$  e  $10 \text{ mg L}^{-1}$ ) na redução do crescimento e da senescência de acessos de mandioca *in vitro*. Foram utilizados cinco acessos: Mandioca João Grande (BGM1325), Fécula Branca (BGM1632), BRS Kiriris (BGM1728), S/N (121) (BGM2004) e BRS Prata (BGM2019). Segmentos nodais dos acessos, provenientes da coleção *in vitro* da Embrapa Mandioca e Fruticultura foram cultivados quinze dias na sala de crescimento sob  $26 \text{ }^\circ\text{C}$ , para enraizamento. Após esse período, as plantas foram transferidas para sala de conservação e submetidas a temperatura de  $22 \text{ }^\circ\text{C}$ , para reduzir a taxa de crescimento. Realizou-se a avaliação após 90 dias de cultivo, mediante as seguintes variáveis: altura da parte aérea (cm), número de brotos, número de folhas vivas, número de folhas senescentes, número de microestacas, peso fresco da parte aérea (g), peso seco da parte aérea (g), peso fresco de raízes (g) e peso seco de raízes (g). O experimento foi instalado no delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 5 (acessos) x 3 (concentrações de  $\text{AgNO}_3$ ), com vinte repetições. Os dados coletados foram submetidos ao teste F da análise de variância e aplicados os testes de Tukey a 5% de significância e de Scott-Knott a 5% de probabilidade, com auxílio do programa estatístico R. Conclui-se que o BGM1325 se destacou obtendo maior número de folhas vivas. A ausência de nitrato de prata possibilitou a ausência de folhas senescentes para os acessos BGM1632 e BGM2004. A presença de  $10 \text{ mg L}^{-1}$  de nitrato de prata proporcionou maior número de folhas senescentes, apesar de nessa mesma concentração existir menor crescimento da planta em relação as demais concentrações e acessos.

**Palavras-chave:** Crescimento Mínimo; Inibidor; Protocolo.

## CONCENTRATIONS OF SILVER NITRATE IN THE *IN VITRO* CONSERVATION OF MANDIOCA GERMOPLASMA (*Manihot esculenta* Crantz)

### ABSTRACT:

There is a great diversification in the behavior of the cultures conserved *in vitro*, mainly regarding the quality of the microenvironment within the weak ones and the gas exchanges with the external environment. In studies that address the *in vitro* cultivation of plants, the most explored currently is the influence and composition of gases in the culture vessels. Ethylene is a gas that acts as a phytohormone, exerts influence in the deteriorating process of the plant and delayed its growth. Silver nitrate ( $\text{AgNO}_3$ ) is an inhibitor of ethylene, which associates with low temperatures influences rooting and multiplication *in vitro*, and has been studied to reduce growth in the *in vitro* conservation of plant germplasms. The objective of this study was to evaluate the concentrations of silver nitrate (0 mg L<sup>-1</sup> (control), 5 mg L<sup>-1</sup> and 10 mg L<sup>-1</sup>) in reducing the growth and senescence of cassava *in vitro*. Five accessions were used: Manioc João Grande (BGM1325), Fécula Branca (BGM1632), BRS Kiriris (BGM1728), S / N (121) (BGM2004) and BRS Prata (BGM2019). Nodal segments of the accessions from the *in vitro* collection of Embrapa Mandioca and Fruticultura were cultivated for 15 days in the growing room at 26 ° C for rooting. After this period, the plants were transferred to the conservation room and submitted to a temperature of 22 ° C to reduce the growth rate. After 90 days of cultivation, the following variables were evaluated: shoot height, number of shoots, number of live leaves, number of dead leaves, number of micro-shoots, fresh weight of shoot (g), dry shoot weight (g), fresh root weight (g) and root dry weight (g). The experiment was installed in a completely randomized design, in factorial scheme 5 (accessions) x 3 (concentrations of  $\text{AgNO}_3$ ), with twenty repetitions. The collected data were submitted to the F test of the analysis of variance and Tukey's tests were applied at 5% significance and Scott-Knott's test at 5% probability, using the statistical program R. It was concluded that BGM1325 excelled at obtaining greater number of live leaves. The absence of silver nitrate allowed the absence of senescent leaves for the accessions BGM1632 and BGM2004. The presence of 10 mg L<sup>-1</sup> of silver nitrate provided a higher number of senescent leaves, although at the same concentration there was lower plant growth in relation to the other concentrations and accessions.

**Keywords:** Minimal Growth; Inhibitor; Protocol.

## INTRODUÇÃO

Muitas espécies de importância econômica, especialmente as propagadas vegetativamente, são conservadas *in vitro* (CANTO et al., 2004; SOUZA et al., 2009a; SANTA-ROSA, 2010). Esta técnica, além de apresentar a vantagem de reduzir os riscos existentes nas coleções de campo, possibilita o armazenamento em pequeno espaço físico para manutenção de grande número de plantas.

Os acessos conservados *in vitro* necessitam de condições que retardem o crescimento das plantas, uma vez que uma das desvantagens desta técnica é a necessidade constante de subcultivos, tornando-a laboriosa e sujeita ao surgimento de variações somaclonais.

A estratégia utilizada para o crescimento lento da planta consiste em diminuir seu metabolismo sem interferir na sua viabilidade, pela redução da intensidade luminosa e da temperatura, indução de estresse osmótico, adição de retardantes de crescimento e/ou diminuição da concentração de componentes orgânicos e salinos do meio de cultura (WITHERS; WILLIAMS, 1998).

O ambiente interno em que a planta fica submetida proporciona, geralmente, o acúmulo de etileno, o qual, mesmo em reduzidas concentrações, desencadeia inúmeros procesos, como por exemplo a abscisão foliar (NEPOMUCENO, 2006). Este gás é produzido pelos vegetais, agindo como regulador de crescimento e produzindo efeitos importantes e de grande aplicação comercial. Porém, para o cultivo *in vitro*, o acúmulo do etileno nos recipientes de cultivo afeta diretamente a resposta do explante, sendo positiva ou negativa (PASQUAL et al., 2002).

A produção e acúmulo de etileno em recipientes fechados, baixas taxas de CO<sub>2</sub> e inibição de enzimas do ciclo de Calvin pela sacarose do meio de cultura, constituem fatores que interferem diretamente nas taxas fotossintéticas de plantas cultivadas *in vitro* e, por conseguinte, nos índices de multiplicação e na sobrevivência durante o processo de aclimatização (TANAKA et al., 2005; ARAGÓN et al., 2010).

Por conta dos efeitos negativos do etileno nas culturas *in vitro*, existem estudos avaliando inibidores de etileno (PASQUAL et al., 2002), como o nitrato de prata (ALKHAYRI; AL-BAHRANY, 2001; OZDEN-TOKATLI et al., 2005). Segundo GIRIDHAR et al. (2001), a utilização do AgNO<sub>3</sub> apresenta resultado satisfatório em estudos relacionados a multiplicação e enraizamento *in vitro* de *Vanilla planifolia* Andrews, uma orquídea.



Estudos realizados no CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical), Cali, Colômbia, já avaliaram o uso de nitrato de prata para manutenção de grande número de acessos de mandioca, em 1995 (CIAT, 2018). Porém, devido à especificidade das respostas e a grande dependência de mandioca, no que se refere ao acesso (acesso-dependência) novos ensaios precisam ser conduzidos.

Resultados conseguidos por Montarroyos (1995), utilizando o ácido acetilsalicílico, e por MAFLA et al. (2000), usando o nitrato de prata, mostram que ambos, quando adicionados no meio de cultura, agem potencialmente como inibidores da ação do etileno, bem como seus efeitos atuam significativamente no crescimento *in vitro* de plantas de mandioca. Foi observado nos dois estudos que as cultivares utilizadas apresentaram diferentes respostas a adição destes inibidores no meio de cultura, confirmando a especificidade citada anteriormente e a necessidade de realização de mais estudos.

Em mandioca, existem poucos estudos relacionados a influência do nitrato de prata na conservação *in vitro* de germoplasma. Devido a carência dessas informações, este trabalho foi realizado com o objetivo de testar diferentes concentrações de nitrato de prata na redução do crescimento e da senescência de acessos de mandioca *in vitro*.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Local e material vegetal

O experimento foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Mandioca e Fruticultura, em Cruz das Almas, Bahia. Foram utilizados cinco acessos de mandioca que se encontram conservados em condições *in vitro*. Na Tabela 1 estão relacionados os acessos estudados, com seu respectivo código (BGM), nome vulgar, origem, parentais e local de procedência no Brasil.

**Tabela 1.** Relação de acessos brasileiros de mandioca, com seus respectivos códigos (BGMs), nomes vulgares, origem, parentais e locais de procedência.

Acesso	Nome vulgar	Origem	Parentais	Coleta (lugar e data)
BGM1325	Mandioca João Grande	Coleta	-	Afogados da Ingazeira, PE, 1991

BGM1632	Fécula Branca	Coleta	-	São Mateus - PR, 1995
BGM1728	BRS Kiriris	Cruzamento	Parental feminino: BGM 0921; parental masculino: desconhecido	-
BGM2004	S/N (121)	Coleta	-	Urucará, AM, 2005
BGM2019	BRS Prata	Cruzamento	parental feminino: BGM 1044; parental masculino: desconhecido	-

### Preparo do meio de cultura

O meio de cultura básico utilizado foi o 8S (CIAT, 1984), acrescido de 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e das concentrações de nitrato de prata (0 mg L<sup>-1</sup> (controle); 5 mg L<sup>-1</sup> e 10 mg L<sup>-1</sup>). O pH dos meios foi ajustado para 5,8 acrescentando, quando necessário NaOH ou HCl 1N, e solidificados com Phytigel® (2,6 g L<sup>-1</sup>), que foi dissolvido por aquecimento em forno de micro-ondas. 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 do experimento

Essa etapa foi realizada em câmara de fluxo laminar com o auxílio de pinça e bisturi (Figura 1), as plantas foram seccionadas em segmentos nodais de aproximadamente 1 cm, contendo uma gema. Cada explante foi posteriormente introduzido no tubo de ensaio contendo 10 mL do meio de cultura, fechado com filme de PVC e etiquetado com o código de identificação correspondente ao acesso e as concentrações de nitrato de prata (0 mg L<sup>-1</sup> (controle); 5 mg L<sup>-1</sup> e 10 mg L<sup>-1</sup>). Após o período de quinze dias na sala de crescimento sob 26 °C, para enraizamento, as plantas foram transferidas para a sala de conservação a 22 °C (Figura 2), sob condições ambientais que favorecem o crescimento lento das plantas: fotoperíodo de 12 horas com intensidade luminosa de 20 μmol.m<sup>-2</sup>. s<sup>-1</sup>.



**Figura 1.** Processo de seccionamento de plantas micropropagadas para obtenção dos explantes.



**Figura 2.** Acessos de mandioca submetidos à temperatura de 22 °C na sala de conservação.

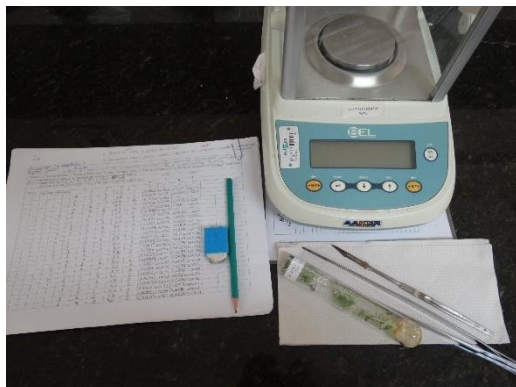
### **Avaliação do experimento**

Após 90 dias de incubação na sala de conservação a 22 °C, as plantas foram avaliadas a partir das seguintes variáveis: a) altura da parte aérea (APA; cm); b) número de brotos (NB); c) número de folhas vivas (NFV); d) número de folhas senescentes (NFS); e) número de microestacas (NM); f) peso fresco da parte aérea (PFPA; g); g) peso seco da parte aérea (PSPA; g); h) peso fresco de raízes (PFR; g) e i) peso seco de raízes (PSR; g).

Para avaliar a altura da parte aérea da planta foi utilizada uma régua, medindo a planta a partir da base até a parte apical.

Para as variáveis peso fresco e seco da parte aérea e de raízes a avaliação foi feita utilizando balança digital (Figura 3). Para as variáveis peso seco da parte aérea

e de raízes utilizou-se estufa com circulação de ar forçada a 70 °C, onde as plantas permaneceram por 48 horas (Figura 4).



**Figura 3.** Balança digital utilizada para pesar os pesos fresco e seco da parte aérea e de raízes das plantas de mandioca cultivadas em meios com nitrato de prata.



**Figura 4.** Estufa empregada para secagem da parte aérea e de raízes das plantas de mandioca cultivadas em meios com nitrato de prata.

### **Análise estatística**

O experimento foi instalado no delineamento experimental inteiramente casualizado, em esquema fatorial 3 (concentrações de nitrato de prata) x 5 (acessos), com vinte repetições, cada uma representada por uma planta cultivada em um tubo de ensaio.

Os dados coletados na avaliação foram submetidos ao teste F da análise de variância. Para as médias das concentrações de nitrato de prata e dos acessos foram aplicados, respectivamente, o teste de Tukey a 5% de significância e o teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. As análises foram realizadas com auxílio do programa estatístico R (R CORE TEAM, 2018).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram testadas diferentes concentrações de nitrato de prata, como inibidor de etileno e, conseqüentemente, retardante do crescimento, fundamentando-se que a redução do metabolismo é essencial para conservação *in vitro* de germoplasma. Nesse entendimento, as duas variáveis avaliadas altura da parte aérea da planta e número de folhas senescentes, devem apresentar médias inferiores juntamente com valores superiores das demais variáveis, de modo que seja a forma de identificar que o crescimento mínimo não inviabilizaria a recuperação posterior das plantas, assim como sua multiplicação.

Observa-se na Tabela 1 o efeito altamente significativo ( $p < 0,01$ ) das doses de nitrato de prata para as variáveis analisadas NFM, APA, PFPA e PFR. Nepomuceno (2006), encontrou efeito altamente significativo nas concentrações de inibidores de etileno, incluindo o nitrato de prata, para a variável número de brotos em angico, uma leguminosa arbórea de ocorrência no semiárido do Nordeste. Obteve-se também efeito significativo ( $p < 0,05$ ) para a interação  $\text{AgNO}_3 \times$  Acessos para as variáveis, NFS, APA, NM e PFPA. Os coeficientes de variação (CV) obtidos nesse estudo oscilaram entre 19,26%, para número de brotos, e 91,12%, para o peso seco da parte aérea, valores que podem estar relacionados à instabilidade de plantas estabelecidas *in vitro*, sendo normal ocorrer essa variação para estudos em cultura de tecidos vegetais (WERNER et al., 2012). De forma semelhante, os CV's encontrados por Miranda et al. (2016) na multiplicação *in vitro* de *Eremanthus incanus* (Less.) Less. variaram entre 12,25% e 99,53%. Os CV's encontrados no estudo de Nepomuceno (2006) foram de 19,87%, para número de brotos, e 34,60% para comprimento da parte aérea.

**Tabela 1.** Resumo da análise de variância para número de brotos (NB), número de folhas vivas (NFV), número de folhas senescentes (NFS), altura da parte aérea (APA; em cm), número de microestacas (NM), peso fresco da parte aérea (PFPA; em g), peso seco da parte aérea (PSPA), peso fresco de raízes (PFR; em g) e peso seco de raízes (PSR; em g) dos acessos (BGM1325, BGM1632, BGM1728, BGM2004 e BGM2019) em função de três doses de nitrato de prata - AgNO<sub>3</sub> (0 mg L<sup>-1</sup>; 5 mg L<sup>-1</sup> e 10 mg L<sup>-1</sup>).

FV	GL	QM								
		NB	NFV	NFS	APA	NM	PFPA	PSPA	PFR	PSR
Nitrato de prata	2	0,0697 <sup>ns</sup>	0,2563 <sup>ns</sup>	2,4648 <sup>**</sup>	38,8232 <sup>**</sup>	0,4124 <sup>ns</sup>	0,0186 <sup>**</sup>	0,0001 <sup>ns</sup>	0,0035 <sup>**</sup>	0,0001 <sup>*</sup>
Acessos	4	0,2633 <sup>**</sup>	28,7010 <sup>**</sup>	6,5752 <sup>**</sup>	483,8296 <sup>**</sup>	60,4742 <sup>**</sup>	0,2208 <sup>**</sup>	0,0032 <sup>**</sup>	0,0359 <sup>**</sup>	0,0004 <sup>**</sup>
Nitrato de prata x Acessos	8	0,034 <sup>ns</sup>	1,9819 <sup>ns</sup>	0,9312 <sup>**</sup>	11,4702 <sup>**</sup>	1,7288 <sup>**</sup>	0,0057 <sup>*</sup>	0,0000 <sup>ns</sup>	0,0011 <sup>ns</sup>	0,0000 <sup>ns</sup>
Erro	54	0,0516	1,0439	0,2406	2,1979	0,4118	0,0022	0,0001	0,0004	0,0000
CV (%)		19,26	31,30	67,38	34,08	23,95	47,79	91,12	57,69	88,01
Média Geral		1,18	3,26	0,73	4,35	2,68	0,10	0,01	0,04	0,00

\*\* e \* significativo a 1 e 5%, respectivamente, pelo teste de F. <sup>ns</sup> não significativo.

Na Tabela 2 são apresentados os valores médios do número de brotos nos cinco acessos estudados. Observa-se que, independente das doses de nitrato de prata, os acessos foram divididos em dois grupos, com o BGM1325 pertencendo ao grupo que apresentou o maior valor médio para o número de brotos, 1,40, diferindo do grupo dos demais acessos pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Já no trabalho de Nepomuceno (2006) envolvendo concentrações de inibidores de etileno (nitrato de prata e cloreto de cobalto), a dose de 2,39 mg L<sup>-1</sup> de nitrato de prata propiciou maior número de brotações em angico, com 2,08 brotações por explante. Para a dose de 4,78 mg L<sup>-1</sup> de nitrato de prata encontrou-se 1,56 brotações por explante.

Os inibidores da ação e da biossíntese do etileno promovem o desenvolvimento das brotações e aumentam o número de brotos por explante (REIS et al., 2003). No cultivo *in vitro* de *Cucumis sativus* L. foi observado que as concentrações de 4,78 mg L<sup>-1</sup> a 23,88 mg L<sup>-1</sup> de nitrato de prata estimularam a indução de brotações (MOHIUDDIM et al., 1997).

Em estudo de melhoramento da organogênese da brotação de mandioca *in vitro*, a presença do nitrato de prata no meio de regeneração revelou efeito mais eficiente do que daqueles cultivados em meio sem o AgNO<sub>3</sub> (ZHANG, et al., 2001). Em alguns casos, o nitrato de prata inibiu ou reduziu o enraizamento de brotações regeneradas (CASTILLO et al., 1998; MADSEN et al., 1998), porém na cultura da mandioca não houve efeito adverso no enraizamento.

**Tabela 2.** Valores médios para número de brotos (NB), obtidos em cinco acessos de mandioca (BGM1325, BGM1632, BGM2004, BGM2019 e BGM1728) cultivados *in vitro* sob concentrações de nitrato de prata.

Acessos	Médias
BGM1325	1,40 a
BGM1632	1,18 b
BGM2004	1,16 b
BGM2019	1,08 b
BGM1728	1,07 b

Médias seguidas de mesma letra minúscula pertencem aos mesmos grupos pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Observa-se na Tabela 3 que para a variável número de folhas vivas, independente das doses de nitrato de prata avaliadas, os acessos foram separados em dois grupos, com novamente o BGM1325 compondo o grupo que apresentou a maior média, 5,71, diferindo do grupo formado pelos demais acessos.

**Tabela 3.** Valores médios para número de folhas vivas (NFV), obtidos em cinco acessos de mandioca (BGM1325, BGM1632, BGM2019, BGM1728 e BGM2004) cultivados *in vitro* sob concentrações de nitrato de prata.

<b>Acessos</b>	<b>Médias</b>
BGM1325	5,71 a
BGM1632	2,74 b
BGM2019	2,58 b
BGM1728	2,52 b
BGM2004	2,49 b

Médias seguidas de mesma letra minúscula pertencem aos mesmos grupos pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Na Tabela 4 são apresentados os resultados para a variável número de folhas senescentes (NFS). Observa-se que os acessos BGM1728, BGM2004 e BGM2019 não diferiram entre si para essa característica, em nenhuma das doses de  $\text{AgNO}_3$  testadas. Já as variedades BGM1325 e BGM1632 apresentaram maior NFM quando submetidos a dose de  $10 \text{ mg L}^{-1}$  de nitrato de prata, diferindo das demais doses, pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Para todas as concentrações de nitrato de prata testadas, o acesso BGM1325 apresentou o maior número de folhas senescentes, diferindo dos demais grupos pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade.

A interação que proporcionou o maior número de folhas senescentes foi entre o acesso BGM1325 e a dose de  $10 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{AgNO}_3$ , com média de 2,82. Por outro lado, quando os BGMs 1632 e 2004 foram cultivados em meio sem nitrato de prata não houve ocorrência de folhas senescentes.

Os compostos que atuam inibindo o crescimento vegetal induzem o aumento de citocininas, e, conseqüentemente, os níveis de etileno são diminuídos, ocasionando o retardo na senescência (RADEMACHER, 2000). Um estudo realizado por Koyama et al. (2013) evidenciou que há relação entre senescência foliar em resposta ao etileno, onde houve uma super expressão de genes envolvidos o processo de produção desse gás.



**Tabela 4.** Valores médios para número de folhas senescentes (NFS), obtidos em cinco acessos (BGM1325, BGM1632, BGM1728, BGM2004 e BGM2019), submetidos a três doses de nitrato de prata (0 mg L<sup>-1</sup>; 5 mg L<sup>-1</sup> e 10 mg L<sup>-1</sup>).

Acessos	Doses de AgNO <sub>3</sub> (mg L <sup>-1</sup> )		
	0	5	10
BGM1325	1,30 aB	1,51 aB	2,82 aA
BGM1632	0,00 bB	0,40 bB	1,35 bA
BGM1728	0,12 bA	0,38 bA	0,70 cA
BGM2004	0,00 bA	0,37 bA	0,27 cA
BGM2019	0,31 bA	0,45 bA	0,20 cA

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas pertencem ao mesmo grupo pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade e maiúsculas nas linhas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Observa-se na Tabela 5 que todos os acessos não diferiram entre si para a variável altura da parte aérea, com exceção da dose 0, em que o acesso BGM2019 foi estatisticamente inferior aos demais.

A variável altura da parte aérea é decisiva no processo de conservação *in vitro*, logo os resultados encontrados foram desfavoráveis na presença de nitrato de prata, já que a interação que proporcionou a maior altura da parte aérea foi entre o acesso BGM1632 e a dose de 10 mg L<sup>-1</sup>, com 1,99 cm, não diferindo estatisticamente dos demais acessos (Figura 5 C).

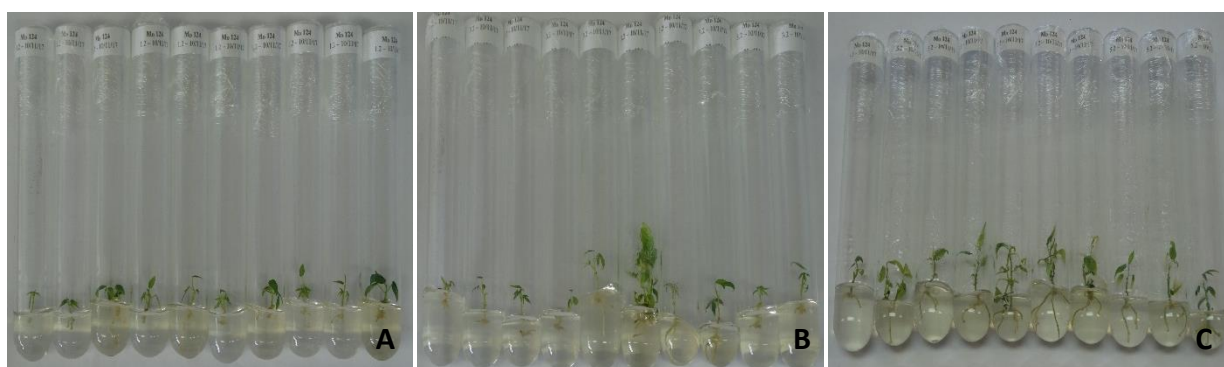
Em estudo semelhante, SILVEIRA (2017) encontrou em um de seus cinco experimentos envolvendo a conservação *in vitro* de *Manihot* diversos valores relacionados com altura de planta (entre 1,00 e 1,64 cm), já que foram testadas diversas interações de compostos no meio de cultura, com efeito expressivo para as menores alturas.

Rezende (2017) com o uso do nitrato de prata na conservação *in vitro* de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), observou que as plantas cultivadas em meio MS com 10 mg L<sup>-1</sup> de AgNO<sub>3</sub> e mantidas a 20 °C apresentaram redução no crescimento. No entanto, essa redução prejudicou na retomada do crescimento. Em outro experimento, o mesmo autor Rezende (2017) utilizou o nitrato de prata na conservação *in vitro* de batata onde obteve também a redução do crescimento das plantas, no entanto, o composto não foi favorável para impedir a senescência das plantas, evitando haver o aumento do intervalo entre os subcultivos e prolongar a sobrevivência futura.

**Tabela 5.** Valores médios para altura da parte aérea (APA), obtidos em cinco acessos (BGM1325, BGM1632, BGM1728, BGM2004 e BGM2019) submetidos a três doses de nitrato de prata (0 mg L<sup>-1</sup>; 5 mg L<sup>-1</sup> e 10 mg L<sup>-1</sup>).

Acessos	Doses de AgNO <sub>3</sub> (mg L <sup>-1</sup> )		
	0	5	10
BGM1325	1,68 aA	1,50 aA	1,40 aA
BGM1632	1,39 aA	1,58 aA	1,99 aA
BGM1728	1,47 aA	1,58 aA	1,34 aA
BGM2004	1,67 aA	1,74 aA	1,62 aA
BGM2019	1,54 bA	1,57 aA	1,25 aA

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas pertencem ao mesmo grupo pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade e maiúsculas nas linhas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.



**Figura 5.** Plantas de mandioca referente ao acesso BGM1632 com ausência de nitrato de prata (A), 5 mg L<sup>-1</sup> de nitrato de prata (B) e 10 mg L<sup>-1</sup> de nitrato de prata (C).

Os resultados para a variável número de microestacas mostraram que os acessos BGM1728, BGM2004 e BGM2019 não diferiram tanto entre, quanto dentre as concentrações de AgNO<sub>3</sub> avaliadas (Tabela 6). Já o BGM1325 apresentou o maior NM nas doses controle e 10 mg L<sup>-1</sup>, diferindo do resultado obtido nas concentrações de 5 mg L<sup>-1</sup>, pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. No acesso BGM1632 o maior valor médio foi observado na dose de 10 mg L<sup>-1</sup> (2,45), que diferiu do resultado alcançado na testemunha (1,00).

Para todas as concentrações de nitrato de prata, o acesso BGM1325 apresentou o maior número de microestacas entre os demais de acordo com o teste Scott-Knott a 5% de probabilidade.

A interação que proporcionou o maior número de microestacas foi entre o acesso BGM1325 no tratamento controle (6,75) e na presença de 10 mg L<sup>-1</sup> de nitrato de prata (6,70), não diferindo estatisticamente entre si. Enquanto que a menor média conseguida para essa variável ocorreu com BGM1632 cultivado também na ausência

do nitrato de prata, sendo similar estatisticamente aos demais acessos submetidos a dose de 5 mg L<sup>-1</sup> e 10 mg L<sup>-1</sup> de nitrato de prata, exceto o acesso BGM1325.

**Tabela 6.** Valores médios para o número de microestacas (NM) obtidos em cinco acessos (BGM1325, BGM1632, BGM1728, BGM2004 e BGM2019) submetidos a três doses de nitrato de prata (0 mg L<sup>-1</sup>; 5 mg L<sup>-1</sup> e 10 mg L<sup>-1</sup>).

Acessos	Doses de AgNO <sub>3</sub> (mg L <sup>-1</sup> )		
	0	5	10
BGM1325	6,75 aA	5,23 aB	6,70 aA
BGM1632	1,00 bB	1,90 bAB	2,45 bA
BGM1728	1,10 bA	1,78 bA	1,65 bA
BGM2004	1,88 bA	1,85 bA	1,60 bA
BGM2019	1,28 bA	2,00 bA	1,65 bA

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas pertencem ao mesmo grupo pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade e maiúsculas nas linhas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Na Tabela 7 comprova-se que, para a variável peso fresco da parte aérea, os acessos BGM1632, BGM1728, BGM2004 e BGM2019 não diferiram entre si, em nenhuma das doses testadas. Já o acesso BGM1325 apresentou o maior valor médio para o PFPA na dose controle (0 mg L<sup>-1</sup>) com 0,41 g, diferindo das demais concentrações de nitrato de prata, pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Para todas as doses testadas, o acesso BGM1325 apresentou o maior peso fresco da parte aérea (PFPA), compondo um grupo diferenciado pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade.

A combinação entre os tratamentos que proporcionou o maior peso fresco da parte aérea (PFPA) foi entre o acesso BGM1325 e a testemunha (0,41 g). Este resultado difere do encontrado por VARGAS (2009), onde, ao avaliar o cultivo *in vitro* e a criopreservação de mamoneira, verificou aumento do peso fresco, com a adição de 20 mg L<sup>-1</sup> de nitrato de prata no meio de cultura.

Mesmo que o presente trabalho não utilize a técnica da criopreservação e a cultura da mamoneira, o estudo citado acima utiliza a mesma variável (peso fresco) associada a utilização do nitrato de prata para redução do crescimento, sendo assim relevante a comparação de ambos resultados.

**Tabela 7.** Valores médios para peso fresco da parte aérea (PFPA; g) obtidos em cinco acessos (BGM1325, BGM1632, BGM1728, BGM2004 e BGM2019) submetidos a três doses de nitrato de prata (0 mg L<sup>-1</sup>; 5 mg L<sup>-1</sup> e 10 mg L<sup>-1</sup>).

Acessos	Doses de AgNO <sub>3</sub> (mg L <sup>-1</sup> )		
	0	5	10
BGM1325	0,41 aA	0,23 aC	0,30 aB
BGM1632	0,04 bA	0,05 bA	0,05 bA
BGM1728	0,03 bA	0,04 bA	0,02 bA
BGM2004	0,06 bA	0,05 bA	0,03 bA
BGM2019	0,04 bA	0,03 bA	0,02 bA

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas pertencem ao mesmo grupo pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade e maiúsculas nas linhas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Apesar de existirem muitos trabalhos relacionados com o nitrato de prata na cultura de tecidos vegetais, em muitas espécies de plantas e tipos de tecidos vegetais o nitrato de prata demonstra efeito negativo ou até mesmo inibitório (PUONTI-KAERLAS, 1991; PALMER, 1992; JUN et al., 1997; TEO et al., 1997; KUMAR et al., 1998). Em mandioca, foi demonstrado que a maturação e regeneração de embriões somáticos secundários de determinada cultivar poderia ser melhorada com o uso de nitrato de prata (ZHU et al., 1998).

Na Tabela 8 são apresentados os valores médios do peso seco da parte aérea. Observa-se que, independente das doses testadas, os acessos foram divididos em dois grupos, sendo que o BGM1325 formou o grupo que apresentou o maior valor médio para o PSPA, diferindo do outro grupo composto pelos demais acessos pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

**Tabela 8.** Valores médios para peso seco da parte aérea (PSPA; g) obtidos em cinco acessos de mandioca (BGM1325, BGM1632, BGM2004, BGM1728 e BGM2019) cultivados *in vitro* sob concentrações de nitrato de prata.

Acessos	Médias
BGM1325	0,038 a
BGM1632	0,006 b
BGM2004	0,005 b
BGM1728	0,004 b
BGM2019	0,004 b

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas pertencem ao mesmo grupo pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Na Tabela 9 constam resultados para o peso fresco de raízes, observando-se que os acessos BGM1632, BGM1728, BGM2004 e BGM2019 não diferiram entre si

para essa variável, em nenhuma das doses de  $\text{AgNO}_3$ . Já o BGM1325 apresentou o maior valor médio para o peso fresco de raízes (PFR) na ausência de nitrato de prata, com 0,162 g, diferindo, portanto, das demais doses, pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

O BGM1325 apresentou estatisticamente o maior peso fresco de raízes em todas as concentrações de  $\text{AgNO}_3$  e formou um grupo distinto das outras variedades, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. A combinação que propiciou a maior média (0,162 g) para o PFR foi com o BGM1325 cultivado sem a presença do nitrato de prata, diferenciando estatisticamente dos demais acessos

**Tabela 9.** Valores médios para peso fresco de raízes (PFR; g) obtidos em cinco acessos (BGM1325, BGM1632, BGM1728, BGM2004 e BGM2019) submetidos a três doses de nitrato de prata (0  $\text{mg L}^{-1}$ ; 5  $\text{mg L}^{-1}$  e 10  $\text{mg L}^{-1}$ ).

Acessos	Doses de $\text{AgNO}_3$ ( $\text{mg L}^{-1}$ )		
	0	5	10
BGM1325	0,162 aA	0,107 aB	0,096 aB
BGM1632	0,008 bA	0,016 bA	0,009 bA
BGM1728	0,006 bA	0,032 bA	0,005 bA
BGM2004	0,015 bA	0,014 bA	0,006 bA
BGM2019	0,010 bA	0,010 bA	0,004 bA

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas pertencem ao mesmo grupo pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade e maiúsculas nas linhas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Na Tabela 10 observa-se que, independentemente dos acessos estudados, a concentração de nitrato de prata que propiciou o maior valor médio para o peso seco de raízes (PSR) foi a referente ao tratamento controle (0  $\text{mg L}^{-1}$ ), que diferiu apenas do resultado obtido na máxima de  $\text{AgNO}_3$ , 10  $\text{mg L}^{-1}$ , pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

**Tabela 10.** Valores médios para peso seco de raízes (PSR; g) obtidos em cinco acessos de mandioca (BGM1325, BGM1632, BGM2004, BGM1728 e BGM2019) submetidos a três doses de nitrato de prata (0  $\text{mg L}^{-1}$ ; 5  $\text{mg L}^{-1}$  e 10  $\text{mg L}^{-1}$ ).

Doses de $\text{AgNO}_3$ ( $\text{mg L}^{-1}$ )	Médias
0	0,006 a
5	0,004 ab
10	0,003 b

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Na Tabela 11 estão os valores médios do peso seco de raízes avaliados nos seis acessos estudados. Observa-se que, independentemente das doses de nitrato de prata testadas, os acessos foram separados em dois grupos, com o BGM1325 compondo o grupo que apresentou o maior valor médio para o PSR e diferindo dos demais acessos pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

**Tabela 11.** Valores médios para peso seco de raízes (PSR) obtidos em cinco acessos de mandioca (BGM1325, BGM1632, BGM1728, BGM2004 e BGM2019) cultivados *in vitro* sob concentrações de nitrato de prata.

<b>Acessos</b>	<b>Média</b>
BGM1325	0,013 a
BGM1728	0,002 b
BGM2004	0,002 b
BGM1632	0,002 b
BGM2019	0,001 b

Médias seguidas de mesma letra minúscula pertencem aos mesmos grupos pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Ainda assim, o presente trabalho contribui para experimentos posteriores baseados em novas metodologias de conservação *in vitro* de mandioca, uma vez que, a dependência genotípica entre os acessos demanda protocolos eficientes.

## CONCLUSÕES

Considerando-se os acessos de mandioca e as doses avaliadas, o nitrato de prata não favorece a redução do crescimento em plantas de mandioca conservadas *in vitro*.

O nitrato de prata exerce influência pouco expressiva apenas nas variáveis: número de folhas senescentes, número de microestacas, peso fresco da parte aérea, peso fresco e peso seco de raízes de acessos de mandioca *in vitro*.

## REFERÊNCIAS

AL-KHAYRI, J. M.; AL-BAHRANY, A. M. Silver nitrate and 2- isopentyladenine promote somatic embryogenesis in date palm (*Phoenix dactylifera* L.). **Scientia Horticulturae**, v. 89, p. 291-298, 2001.

ARAGÓN, C.; CARVALHO, L.; GONZÁLEZ, J.; ESCALONA, M.; AMÂNCIO, M. *Ex vitro* acclimatization of plantain plantlets micropropagated in temporary immersion bioreactor. **Biologia Plantarum**, v. 54, n. 2, p. 237-24, 2010.

CANTO, A. M. M. E.; SOUZA, F. V. D.; COSTA, M. A. P. C.; SOUZA, A. da S.; LEDO, C. A. da S.; CABRAL, J. R. S. Conservação *in vitro* de germoplasma de abacaxi tratado com paclobutrazol. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 39, p. 717-720, 2004.

CASTILLO, A. M.; EGANA. B.; SANZ, J. M.; CISTUE, L. Somatic embryogenesis and plant regeneration from barley cultivars grown in Spain. *Plant Cell Rep.* 17: 902–906, 1998.

CIAT. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Disponível em:<<https://ciat.cgiar.org/what-we-do/crop-conservation-and-use/cassava-diversity/>>. Acesso em 4 jun. 2018.

CIAT. **El cultivo de meristemas para la conservacion de germoplasma de yucca *in vitro***. Cali, 1984. 44 p.

GIACOMELLI, E. J.; TEÓFILO, S. J. Seleção preliminar de alguns cultivares de abacaxizeiro resistentes à fusariose. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 7., Florianópolis, 1984. **Anais...** Florianópolis: Sociedade Brasileira de Fruticultura: Empresa Catarinense de Pesquisa Agropecuária, 1984. v. 1, p. 145-161.

GIRIDHAR, P.; REDDY, B.; RAVISHANKAR, G. A. Silver nitrate influences *in vitro* shoot multiplication and root formation in *Vanilla planifolia* Andr. **Current Science**, v. 81, n. 9, p. 1166-1170, 2001.

JUN, J. H, YAE, B. W.; HWANG, J. H.; SHIN, Y. U. Plant regeneration from leaf tissue of *Malus domestica* cv. 'Fuji' *in vitro*. RDA J. Hort. Sci. 39: 102–105,1997.

KOYAMA, T; NII, H.; MITSUDA, N.; OHTA, M.; KITAJIMA, S.; OHME-TAKAGI, M; SATO, F. A regulatory cascade involving class II ETHYLENE RESPONSE FACTOR transcriptional repressors operates in the progression of leaf senescence. **Plant Physiology**, v. 162, n.2, p. 991-1005, 2013.

KUMAR, S.; SARKAR, A. K.; KUNHIKANNAN, C. Regeneration of plants from leaflet explants of tissue culture raised safed siris (*Albizia procera*). **Plant Cell Tiss. Org. Cult.** 54: 137–143, 1998.

MADSEN, M. H.; NAUERBY, B.; FREDERIKSEN, C. G.; WYNDAELE, R (1998) Regeneration of pea (*Pisum sativum* L.) by the thin cell layer nodal system: Influence of explant culture media on rooting and plantlet formation. *Acta Agric. Scand. Sect. B Soil Plant Sci* 48:58–64.

MAFLA, G.; ROA, J. C.; GUEVARA, C. L. Advances on the *in vitro* growth control of cassava, using silver nitrate. In: CARVALHO, L. J. C. B.; THRO, A. M.; VILARINHOS, A. D. (Ed). INTERNACIONAL SCIENTIFIC MEETING CASSAVA BIOTECHNOLOGY, 4., 2000, Salvador. **Proceedings...** Brasília, DF: Embrapa-Cenargen, 2000. p. 439-446.

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.



MOHIUDDIM, A. K. M.; CHOWDHURY, M. K. U.; ABDULLAN, Z. C.; NAPIS, S. Influence of silver nitrate (ethylene inhibitor) on cucumber *in vitro* shoot regeneration. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. v. 51, p. 75-78, 1997.

MONTARROYOS, A. V. V. **Conservação *in vitro* de variedades de mandioca com uso de ácido acetilsalicílico**. 1995. 98. f. Dissertação (Mestrado em Agronomia. Escola de Agronomia, Universidade da Bahia, Cruz das Almas.

NEPOMUCENO, C. F. **Crescimento *in vitro* e controle morfofisiológico em plântulas de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan var. *cebil* (Griseb.) Altschul**. 2006, 72 f. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana.

OZDEN-TOKATLI, Y.; OZUDOGRU, E. A.; AKCIN, A. *In vitro* response of pistachio nodal explants to silver nitrate. **Scientia Horticulturae**, v. 106, p. 415-426, 2005.

PALMER, C. E. Enhanced shoot regeneration from *Brassica campestris* by silver nitrate. *Plant Cell. Rep.* 11: 541–545, 1992.

PASQUAL, M.; MACIEL, A. L. de R.; CAMPOS, K. P. de; SANTOS, E. C.; CAMPOS, R. J. C. de. Indução de calos em anteras de café (*Coffea arabica* L.) cultivadas *in vitro*. **Ciência Agrotecnológica**, v. 26, n. 1, p. 71-76, 2002.

PUONTI-KAERLAS, J. Cassava biotechnology. In: Tombs MP (ed) *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*. Vol. 15 (pp 329–364), Intercept Ltd, Andover, Hants, UK, 1998.

R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2018. Disponível em: <<http://www.R-project.org/>>. Acesso em 01 jul. 2018.

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.

REIS, L. B.; PAIVA NETO, V. B.; TOLEDO-PICOLI, E. A.; COSTA, M. G. C.; REGO, M. M.; CARVALHO, C. R.; FINGER, F. L.; OTONI, W. C. Axillary bud development of passionfruit as affected by ethylene precursor and inhibitors. ***In Vitro Cell Development Biology – Plant***, v. 39, p. 618-622, 2003.

REZENDE, M. E. de; CARDOSO, L. D.; MATSUMOTO, K.; FLORES, P. S. Uso do nitrato de prata na conservação *in vitro* de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS, 21.; CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS, 8., 2017, Bonito. Anais... [S.I.]: SBFPO: ABCTP, 2017.

REZENDE, M. E. de; CARDOSO, L. D.; MATSUMOTO, K.; FLORES, P. S. Uso do nitrato de prata na conservação *in vitro* de batata (*Solanum tuberosum* L.). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS, 21.; CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS, 8., 2017, Bonito. Anais... [S.I.]: SBFPO: ABCTP, 2017.

SANTA-ROSA, S. **Propagação e conservação *in vitro* de bromélias do gênero *Aechmea* de valor ornamental**. 2010. 86 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana.

SOUZA, A. da S.; SOUZA, F. V. D.; SANTOS-SEREJO, J. A. dos; JUNGHANS, T. G.; PAZ, O. P. da; MONTARROYOS, A. V. V.; SANTOS, V. da S.; MORAIS, L. S. **Preservação de germoplasma vegetal, com ênfase na conservação *in vitro* de variedades de mandioca**. Cruz das Almas, BA: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2009. 24 p. (Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical. Circular Técnica, 90).

SOUZA, J. A.; DONINI, L. P.; SILVA, L. C. da.; CORRÊA, M. G. S.; SCHUCH, M. W. Enraizamento *in vitro* do porta-enxerto de macieira M-9 em função da vedação, sacarose e material de suporte do meio de cultura. ***Scientia Agraria***, v.8, n.2, p.161-164, 2007.

TANAKA, Y.; TAMAOLI, M.; NAKAJIMA, N.; KONDO, N.; HASEZAWA, S. Ethylene inhibits abscisic acid-induced stomatal closure in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v. 140, n. 1, p. 2337-2343, 2005.

TEO, W.; LAKSHMANAN, P.; KUMAR, P.; GOH, C. J.; SWARUP, S. Direct shoot formation and plant regeneration from cotyledon explants of rapid-cycling *Brassica rapa*. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 33: 288– 292, 1997.

VARGAS, D. P. **Anatomia floral, cultivo *in vitro* e criopreservação de mamoneira**. 2009, 189 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

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 e Micropropagation**, v. 8, n. 1-2, p. 27-36, 2012.

WITHERS, L. A.; WILLIAMS J. T. Conservação *in vitro* de recursos genéticos de plantas. (Eds.). In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: Embrapa-SPI: Embrapa, CNPH, 1998. v.1, p. 298-305.

ZHANG, P.; PHANSIRI, S.; PUONTI-KAERLAS, J. Improvement of cassava organogenesis by the of silver nitrate *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 67: 47-54, 2001.

ZHU, J.; HUANG, Y.W.; LIANG, C. Y. Improvement of plant regeneration from cyclic secondary somatic embryos in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *J. Trop. Subtrop. Bot.* 6(2): 144–151, 1998.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho é relevante para estudos de conservação *in vitro* de germoplasma de mandioca, pois os resultados obtidos permitirão que novos estudos sejam realizados envolvendo os fatores temperatura/ambiente e nitrato de prata. Isso possibilitará a adequação de fatores mais satisfatórios para a conservação *in vitro* de germoplasma de mandioca sob condições de crescimento mínimo.