

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

**CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DE CULTIVARES DE MANDIOCA
(*MANIHOT ESCULENTA* CRANTZ)**

RICARDO JOSUÉ MACIA

**CRUZ DAS ALMAS-BAHIA
JANEIRO-2011**

**CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DE CULTIVARES DE MANDIOCA (*MANIHOT
ESCULENTA* CRANTZ)**

RICARDO JOSUÉ MACIA

Engenheiro Agrônomo

Instituto Superior de Ciências Agropecuárias de La Habana (Cuba)

(1994)

Dissertação submetida ao Colegiado do curso do Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia e Embrapa Mandioca e fruticultura, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Recursos Genéticos Vegetais.

ORIENTADORA: PROF(a) Dr.(a) FERNANDA VIDIGAL DUARTE SOUZA

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECONCAVO DA BAHIA

EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA

MESTRADO EM RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS

CRUZ DAS ALMAS-BAHIA-2011

Ficha Catalográfica

M152 Macia, Ricardo Josué.

Conservação in vitro de cultivares de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) / Ricardo Josué Macia. _ . Cruz das Almas-BA, 2011.

67f.; il.

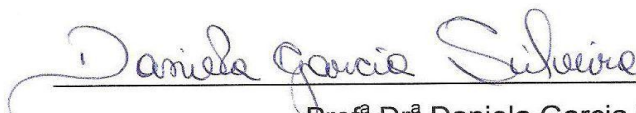
Orientadora: Fernanda Vidigal Duarte Souza.

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

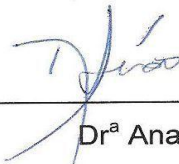
COMISSÃO EXAMINADORA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS
COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE
RICARDO JOSUÉ MACIA



D^{ra} Fernanda Vidigal Duarte Souza
Embrapa Mandioca e Fruticultura
(Orientadora)



Prof^a Dr^a Daniela Garcia Silveira
Universidade Estadual de Feira de Santana



Dr^a Ana da Silva Ledo
Embrapa Tabuleiros Costeiros

Dissertação homologada pelo Colegiado do Curso de Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais em.....
Conferindo o grau de Mestre em Recursos Genéticos Vegetais em

*Á minha mãe Celeste Alberto Cuna pelo
carinho, amizade e grande afeto*

OFEREÇO

*Á minha esposa Hortência Antonio M. Macia,
Meus filhos Dércio Gersón Ricardo Macia e
Hamilton Ricardo Macia.*

DEDICO

*Em caráter especial, meus agradecimentos ao
Dsc. António da Silva Souza, pelos ensinamentos transmitidos
e, sobre tudo pela amizade, confiança e constante incentivo.*

AGRADEÇO

À Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, pela oportunidade do exercício científico e apoio para a realização deste trabalho;

Ao programa de Pós-graduação em Recursos Genéticos Vegetais da UFRB-Embrapa;

À Dr^a Fernanda Vidigal Duarte Souza, agradeço pela orientação e exemplo de sabedoria de vida, a amizade, os conhecimentos transmitidos, a confiança e o incentivo, a inestimável contribuição em todas as etapas do trabalho, fundamentais para a realização deste trabalho. Sou grato pela forma como respeitou e compreendeu o meu modo de trabalhar e ao mesmo tempo soube participar e compartilhar de todas as etapas;

Ao Dr. Carlos Alberto da Silva Ledo pela colaboração na definição das análises estatísticas e atenção dispensada;

Aos professores do curso de Pós-graduação em Recursos Genéticos Vegetais UFRB-Embrapa, a competência na transmissão de conhecimentos, instruções e treinamento: Dra Maria Angélica Pereira de Carvalho Costa, Dr. Deuclides Ricardo de Souza, Dr. Jorge Luiz Loyola Dantas, Dr. Edson Perito Amorim, Dra Ana Cristina Vello Loyola Dantas, Dr. Carlos Alberto da Silva Ledo, Dra Fernanda Vidigal Duarte Souza;

Aos colegas e amigos do Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Mandioca e Fruticultura: Ádila, Sandra, Juraci, Elder, Taliane e Kelly; pelo apoio, generosidade, amizade e convivência;

A todos os funcionários da Embrapa Mandioca e Fruticultura, em especial aos funcionários do laboratório de Cultura de Tecidos, Honorato e Tânia, pela importante colaboração no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq pelo apoio financeiro;

A todos as pessoas que não cito, mas que direta ou indiretamente contribuíram para a transformação de um sonho em realidade, o meu muito....

OBRIGADO.

SUMÁRIO

Página

RESUMO
ABSTRACT

INTRODUÇÃO 01

Capítulo 1

EFEITO DA SACAROSE NA CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DE CULTIVARES DE
MANDIOCA (*MANIHOT ESCULENTA CRANTZ*) 17

Capítulo 2

REGULADORES OSMÓTICOS NA CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DE MANDIOCA
..... 42

CONSIDERAÇÕES FINAIS 63

CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DE CULTIVARES DE MANDIOCA

Autor: Ricardo Josué Macia

Orientadora: Dra. Fernanda Vidigal Duarte Souza

RESUMO: O estabelecimento de bancos *in vitro* é uma estratégia a ser considerada na conservação de germoplasma de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). O objetivo deste trabalho foi avaliar condições de crescimento mínimo a partir do uso de agentes osmóticos. O trabalho foi conduzido no laboratório de cultura de tecidos da Embrapa Mandioca e Fruticultura (CNPMPF). Foram realizados dois estudos que tiveram como fonte de explantes, meristemas apicais e laterais oriundos de acessos do BAG mandioca. No primeiro estudo foram utilizados 4 cultivares (BGM 0036, BGM 0043, BGM 0116, e BGM 0555) a fim de se avaliar o efeito das concentrações de sacarose (0, 10, 20, 40 e 80 g.L⁻¹) no crescimento das plantas. O meio de cultura básico foi o “8S” (Sais do MS + 1 mg.L⁻¹ de tiamina + 100 mg.L⁻¹ de inositol + 0,01 mg.L⁻¹ de ANA + 0,02 mg.L⁻¹ de BAP + 0,1 mg.L⁻¹ de GA₃). Os melhores resultados foram obtidos com as concentrações de 10 e 20 g.L⁻¹ de sacarose considerando todas as variáveis analisadas. A concentração de 40 g.L⁻¹ induziu maior crescimento na maioria dos acessos com exceção do BGM 0116. O BGM 0043 foi mais eficiente na retenção de folhas ao durar 12 meses de conservação. O segundo estudo constou de dois experimentos, em ambos os casos usou-se o BGM 1660, considerando o uso de duas concentrações de sacarose (0 e 20 g.L⁻¹) e três de manitol ou, sorbitol (0, 5 e 10 g.L⁻¹) isoladas e em combinações. A ausência de sacarose afetou o crescimento e desenvolvimento das plantas. O manitol mostrou um efeito redutor de crescimento mais acentuado que o sorbitol. A concentração de 10 g.L⁻¹ de ambos os açúcares inibiu o crescimento de forma crítica. O tratamento com 20 g.L⁻¹ de sacarose, sem manitol ou sorbitol promoveu o melhor resultado, nas condições estabelecidas o BGM 0043 teve melhores respostas na maioria das concentrações.

Palavras-chave: Recursos genéticos, *Manihot esculenta* Crantz, reguladores osmóticos.

IN VITRO CONSERVATION OF CASSAVA CULTIVARS

Author: Ricardo Josué Macia

Adviser: DSc.. Fernanda Vidigal Duarte Souza

ABSTRACT: The establishment of *in vitro* genebanks is one of the strategies to be considered in the germplasm conservation of cassava (*Manihot esculenta* crantz). The objective of this work was to evaluate slow growing conditions considering the use of osmotic regulators. The work was carried out at Embrapa Cassava and Fruit Crops and two studies were performed using lateral and apical meristems from different cultivars of the cassava genebank. In the first study four cultivars, Olho Roxo (BGM 0036), Riqueza (BGM 0043), Cigana Preta (BGM 0116) and Isabel de Souza (BGM 0555) were used in order to evaluate the effect of different concentrations of sucrose (0, 10, 20, 40 and 80 g.L⁻¹) on plants growth. The 8S was used as basal medium (MS salts + 1 mg.L⁻¹ of Thiamine + 100 mg.L⁻¹ of inositol + 0,01 of NAA + 0,02 mg.L⁻¹ of BAP + 0,1 mg.L⁻¹ of GA₃). The best results were obtained with 10 g.L⁻¹ and 20 g.L⁻¹ of sucrose considering all evaluated parameters. The use of 40 g.L⁻¹ of sucrose induced the highest growth in most cultivars with the exception of Cigana Preta (BGM 0116). On the other hand, the cultivar Riqueza (BGM 0043) was more efficient to retain green leaves and could be conserved for 12 months. The second study was constituted by two experiments considering the use of two concentrations of sucrose (0 e 20 g.L⁻¹) and three concentrations (0; 5 and 10 g.L⁻¹) of manithol or sorbitol alone or in combination with sucrose. In both experiments the absence of sucrose hindered plant development. On the other hand, manithol caused a stronger reduction effect in comparison with sorbitol. The concentration of 10 g.L⁻¹ from both sugars inhibited growing making evident that the hydric stress promoted was not tolerated by plants, therefore affecting their development. The best result was obtained with 20 g.L⁻¹ of sucrose without manithol and sorbitol allowing the plants conservation for 12 months.

Key-words: genetic resources, *Manihot esculenta* Crantz, osmotic regulators.

INTRODUÇÃO

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) pertence à família Euforbiácea, gênero *Manihot* é originária do continente Americano e se constitui em um dos cultivos mais importantes para o Brasil e grande parte da África.

O gênero *Manihot* possui 98 espécies, sendo que a maior diversidade biológica pode ser observada na região central do Brasil, nos Estados de Goiás, Minas Gerais, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul. Muitas das espécies também ocorrem na região Nordeste e na região Amazônica.

De todas as espécies do gênero *Manihot*, a mandioca (*M. esculenta* Crantz) é a única cultivada e difundida no mundo, pela importância de suas raízes que se constituem em valiosa fonte de carboidratos, servindo de base para a alimentação de mais de 800 milhões de pessoas (FAO, 2009). Da mandioca aproveitam-se tanto as raízes tuberosas, para fabricação de farinha ou como parte da composição de diversos outros produtos e subprodutos, como a parte aérea para o consumo animal ou humano (MACIA et al., 2007). Dada sua importância sócio-econômica, a mandioca vem obtendo um crescimento médio anual de 2,6% desde 2006, passando de 97 milhões para 173 milhões de toneladas desde 2008. A produção brasileira compreende cerca de 30 milhões de toneladas desde 2006 (FAO, 2009).

O cultivo da mandioca está localizado principalmente em zonas tropicais, razão pela qual está ausente da relação de plantas cultivadas na maioria dos países industrializados (FAOSTAT, 2008). Segundo FAO (2009), nas últimas duas décadas, seu cultivo tem apresentado aumento de área plantada e de quantidade produzida em praticamente todos os países produtores, graças aos variados que tem assim como pela rusticidade. Somente nos últimos seis anos, a produção cresceu 23,6% e a área colhida 6,6%, com destaque para os países africanos, asiáticos e latino-americanos.

No Brasil a mandioca se faz presente no âmbito das pequenas unidades de produção familiar, variando de intensidade de acordo com as peculiaridades culturais locais. Destaca-se não só como cultura de subsistência, mas também como produto de valor comercial, haja vista a produção de farinhas e amidos industriais (SOUZA et al., 2008; SOUZA, 2002).

Entretanto, apesar de toda importância da cultura, vem sendo registrado um aumento da ameaça à diversidade genética da espécie e de seus parentes silvestres. Essa ameaça está associada à perda dos habitats pela expansão das atividades da agricultura e pecuária, à exploração predatória e à exigência de mais terras para moradia, indústria e estradas, fatores que contribuem fortemente para a erosão genética das espécies (TOWIL, 2000).

No caso da mandioca, o risco de erosão genética, tanto da espécie cultivada como das silvestres, pode ser atribuído principalmente à substituição das variedades primitivas pelas novas variedades ou híbridos e ao uso de áreas de diversidade genética para a exploração agrícola (ALVES et al., 2008).

A conservação de recursos genéticos vegetais é na atualidade um tema de importância mundial. A erosão genética de espécies de importância para a alimentação e agricultura se constitui em um desafio complexo que requer conhecimento básico sobre a distribuição e abundância de espécies, suas interações mutualistas, sua biologia reprodutiva e a estrutura genética de suas populações. (FAO, 2009).

Os primeiros estudos sobre a diversidade genética em plantas cultivadas foram realizados nas décadas de 1910 a 1930 sob a liderança do cientista russo Nicolai I. Vavilov que junto com seus colaboradores identificaram os centros de diversidade de um grande número de plantas cultivadas (FREIRE et al., 1999). Foi a partir de então que em 1920 começaram a surgir às estações regionais de introdução de plantas, os laboratórios oficiais, os centros de pesquisa com coleções internacionais e expedições de coleta formais, evidenciando a necessidade de preservar os recursos genéticos vegetais (FRANKEL, HAWKES, 1975; GOEDERT et al., 2002; HOYT, 1992).

Conservação de germoplasma

O germoplasma disponível para a alimentação e a agricultura torna-se cada vez mais ameaçado por uma erosão genética que aumenta em velocidade alarmante. A conservação desse germoplasma é considerada estratégica para o mundo, o que resultou no Tratado Internacional de Recursos Genéticos para a Alimentação e Agricultura, organizado pela FAO e que tem 146 países signatários, inclusive o Brasil. O tratado legisla sobre a forma como os países devem lidar com sua dependência, mas também com sua soberania sobre o recurso genético de seu interesse e é considerado, atualmente, como o instrumento legal e direcionador mais importante referente ao tema. A soberania dos países sobre o recurso genético existente passa, principalmente, por uma política de conservação adequada (TIRFAA, 2010).

As formas de conservação existentes podem ser *in situ* onde o recurso genético é mantido em sua condição natural como reservas, parques florestais, etc (SCARIOT; SEVILLA, 2007) e *ex situ* sob forma de coleções e bancos de germoplasma que podem ser realizadas a partir de diferentes estratégias e metodologias (WALTER et al., 2007).

A complexidade e as implicações políticas que envolvem a conservação *in situ* e, a total impossibilidade, no caso de algumas espécies, de serem conservadas desta forma, levou à busca constante por estratégias e métodos que possibilitem a conservação fora do ambiente natural, de forma segura e com custos razoáveis é conhecida como conservação *ex situ* (STAMP; HENSHAW, 1986; HOYT, 1992; FREIRE et al., 1999; BORÉM, 2001; BRITO, 2003; VALOIS et al., 2005; VIEIRA, 2006; VIEGA, 2008).

O estabelecimento de bancos de germoplasma é, portanto, uma necessidade premente e que vem sendo realizado nas últimas décadas praticamente em todos os países do mundo. Esses bancos se constituem em unidades de material genético de uso imediato ou com uso potencial no futuro, onde não ocorre o descarte de acessos, o que os diferencia das coleções de trabalho, que eliminam o que não interessa ao melhoramento genético (PEREIRA et al., 2007; VIEGA, 2008).

Os modelos para a conservação são muitos e dependem de uma série de fatores. Bancos de sementes ortodoxas, coleções de campo, *on farm*, *in vitro* ou

criobancos possuem características e peculiaridades próprias que devem ser avaliadas ao se decidir sobre a melhor forma de conservar o germoplasma de uma espécie.

No que se refere às espécies de propagação vegetativa, como a mandioca, na maioria das vezes esses bancos estão sob condições de campo, que se tornam frágeis, à medida que fatores bióticos (pragas), assim como, fatores abióticos (secas prolongadas, geadas e etc.), podem comprometer de forma significativa a integridade dos acessos conservados. Adicionalmente os custos são elevados e a necessidade de mão de obra é constante (SOUZA et al., 2009).

A conservação *ex situ* do germoplasma por meio de bancos e coleções *in vitro* é especialmente recomendada para espécies com sementes recalcitrantes e de propagação vegetativa. Também é adequada para aquelas, que apesar de se reproduzirem por sementes ortodoxas, são propagadas tradicionalmente por via vegetativa, possibilitando a manutenção de características desejáveis, mas passíveis de desaparecer com a segregação na propagação via semente, como a mandioca, batata e batata-doce (WALTER, et al., 2007; MATTOS et al., 2006), dentre outras.

Conservação *in vitro* de recursos genéticos vegetais

A conservação *in vitro* foi proposta como uma alternativa viável e auxiliar à conservação em campo (WITHERS; WILLIAMS, 1998). A manutenção de bancos de germoplasma em condições de campo tem como desvantagem a sua vulnerabilidade. As plantas são expostas ao ataque de patógenos, a intempéries climáticas, podendo ser perdidas por falhas de identificação ou erros humanos. Aliado a isso, a manutenção *in vivo* é onerosa, podendo ser paralisada em períodos de dificuldade econômica.

A possibilidade do uso da conservação *in vitro* é atraente tanto por motivos econômicos quanto práticos, sendo um componente adicional importante da preservação de recursos genéticos de plantas (WITHERS, 1993; WITHERS; ENGELS, 1990; AL-KHARYRI; AL-BAHIRANE 2002; OLORODE, 2004).

Por outro lado, o ajuste de protocolos para as espécies pode se apresentar muitas vezes específico até mesmo em nível de genótipo. A gestão de um banco *in vitro* pode ser extremamente complexa por conta desta especificidade, que

resulta em comportamentos diferentes durante o período de conservação, determinando momentos diferentes de repicagens/subcultivos, complicando sobremaneira a gestão. A possibilidade da ocorrência de variações genéticas durante o cultivo, as chamadas variações somaclonais, é outra limitação a ser considerada neste tipo de conservação (ENGEMANN, 1997). Em vista disso, vários estudos vêm sendo realizados a fim de minimizar os problemas e tornar mais eficiente esse importante tipo de conservação.

Ao contrário do crescimento e rápido desenvolvimento que se busca na micropropagação ou regeneração de plantas *in vitro*, as plantas conservadas devem se desenvolver de forma mais lenta, aumentando o tempo de conservação, porém reduzindo o número de subcultivos a ser realizado (PAIVA; GOMES, 1995).

Dessa forma a redução do metabolismo e o estabelecimento de condições de crescimento mínimo, mantendo a planta saudável e com capacidade de sobreviver, são os principais objetivos em trabalhos de conservação *in vitro* (SEABROOK, 1980; CALDAS, 1986; SOUZA; PAZ, 1990; SOUZA et al, 2009; KARTHA; ROCA, 1993; MAFLA et al., 1993; KADOTA, 2001).

Vários são os fatores que podem influenciar o crescimento *in vitro* das plantas, destacando-se a temperatura, intensidade luminosa, fotoperíodo e componentes variados dos meios de cultivo (SANTANA, 2008; ROCA et al, 1982). É importante ressaltar que uma estratégia conveniente para a preservação do germoplasma é aquela que combina os vários métodos existentes de forma a se complementarem.

Substancias osmorreguladoras

As substancias freqüentemente usadas como osmorreguladores na conservação *in vitro*, tem sido a sacarose, o manitol e o sorbitol (MUÑOS, 1991). O manitol e o sorbitol são açúcares alcoólicos utilizados para alterar as condições osmóticas, proteger as membranas das baixas temperaturas e reduzir a hiperdricidade evitando a vitrificação (KADOTA, 2001; FARIA et al, 2006). Atuam gerando um estresse hídrico pelo aumento da concentração osmótica, influenciando, desta forma no crescimento das plantas *in vitro*. Esse efeito se deve possivelmente, a redução da capacidade de absorção de água e de

nutrientes do meio de cultura pelas plantas (LEMOS et al., 2002; PEREIRA NETO; OTONI, 2003).

O manitol e o sorbitol são substâncias de difícil metabolização, sendo consideradas mais efetivas do que a sacarose em relação à redução de crescimento (ROCA et al., 1991; WITHERS; WILLIAMS, 1998) e vêm sendo avaliadas na conservação *in vitro* de várias espécies (GOLMIRZAIE; TOLEDO., 1998; UNNIKRISSAN; SHEELA, 2000; LEMOS et al., 2002; PEREIRA NETO; OTONI, 2003; FARIA et al., 2006; LEDO et al., 2007; SANTOS, 2010).

Para a mandioca, segundo ROCA et al, (1989), os métodos tradicionais de cultivo *in vitro*, permitem conservar o material em média entre 5 a 8 meses entre subcultivos, o que não é muito eficiente em caso de uma coleção grande. Vários trabalhos para a otimização destas condições vêm sendo realizados nos últimos anos, considerando a importância da mandioca no cenário internacional (MONTARROYOS, 1995; MAFLA et al., 2009; CGIAR, 2010).

O Brasil é o principal centro de diversidade do gênero *Manihot* e destacando-se a Embrapa Mandioca e Fruticultura (CNPMP) que possui um banco de germoplasma de mandioca no campo com cerca de 1900 acessos, uma fonte valiosa de variabilidade para programas de melhoramento, assim como, para intercâmbio com outras instituições ou com outros países. Estes acessos, entretanto, estão expostos as intempéries e a ação de agentes bióticos e abióticos, demandando, desta forma, o estabelecimento de uma duplicata de segurança. Assim, o estabelecimento de um banco *in vitro* constitui uma prioridade para a cultura da mandioca, considerando a importância que tem para o Brasil e do acordo com o Tratado Internacional sobre os Recursos Fitogenéticos para a Alimentação e a Agricultura.

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o uso de sacarose, manitol e sorbitol, como reguladores osmóticos em meios de cultura a fim de desenvolver protocolos eficientes para a conservação *in vitro*, sob condições de crescimento mínimo, de diferentes variedades de mandioca.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, A.; MENDES, R.; SILVA, A.; CARVALHO, P.C. COSTA, I. Current status of the Embrapa wild manihot collection. 1st Scientific Meeting of the Global Cassava Partnership, 21-25 July 2008, Ghent, Belgium. Abstrat. Cassava: Meeting Challenges of the Millenium. Ghent, Belgium: Institute of plant Biotechnology for Developing Countries (IPBO). p.81.

AI-KHARYRI, J.M.; AL-BAHIRANI, A.M. Callus and proline accumulation in response to sorbitol and sucrose induced osmotic stress in rice. **Biology Plantarium**. Dordrescht, v.45, p.609- 6111, 2002.

BOREM, A. Marcadores moleculares In: BORÉM, A. **Melhoramento de plantas**. 3^a Ed. Viçosa: UFV, 2001. p.372-390.

BRITO, M.A.A estratégia de conservação *in situ* (unidades de conservação) e a conservação de plantas medicinais. In: COELHO, M.F.B.; JUNIOR, P.C.; DOMBROSK, J.L.D. Diversos olhares em etnobiologia, etnoecologia e plantas medicinais: **Anais I Seminário Mato-grossense de Etnobiologia e Etnoecologia e II Seminário centro-oeste de plantas Mediciniais**. Cuiabá: Unicen, 2003. p.137-140.

CALDAS, L.S. Cultura de tecidos e biotecnologia. In: SIMPOSIO NACIONAL DE CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS, 1., 1986, Brasília. **Anais...** Brasília: EMBRAPA, 1986. 37-38p.

CGIAR.In:http://cropgenebank.sgrp.cgiar.org/index.php?option=con_tent&view=article&id547&Itemid=742&lang=english. 2010. Acessado em 10 de Novembro de 2010.

ENGELMANN, F. *In vitro* conservations methods. In: **Biotechnology and plant genetic resources: Conservation and uses**. CAB international, Wallingford. 1997. 120-130p.

FAOSTAT database. Disponível em: <http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx>. 2008. Acesso em 13 de setembro 2010.

FAO **Mandioca, panorama mundial.** Disponível em http://cepa.epagri.sc.gov.br/Informativos_agropecuarios/Mandioca/Mandioca_julho. 2009. Acessado em 20 de Maio de 2010.

FARIA, G.A.; COSTA. M.A.P. de CARVALHO.; JUNGHANS, T.G.; LEDO, C.A. da SILVA.; SOUZA, A. DA SILVA. Efeito da sacarose e sorbitol na conservação *in vitro* de passiflora giberti N.E. Brown. In: **Revista Brasileira Fruticultura**, Jaboticabal. São Paulo v.2. p.21-38. 2006.

FRANKEL, O.H.; HAWKES, J.G. **Crop genetic resources for today and tomorrow.** Cambridge University Press, 1975. 493p.

FREIRE, M.S.; MORALES, E.A.V.; BATISTA, M.F. Diversidade Genética. In: VIEIRA, N.R.A.; SANTOS, A.B.; SANTANA, E.P. (ed.). **A cultura de arroz no Brasil.** Santo Antonio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 1999. p 559-581.

GOEDERT, C.; SALOMÃO, A.N.; FAIAD, M.G. Germoplasma: o que é isso? **Revista Internacional de Sementes.** n.63. v.5. p.35-42. 2002.

GOLMIZAIRE, A.; TOLEDO, J. *In vitro* conservation of potato and sweetpotato germoplasm. **CIP Program Report**, Perú. P.351-356, 1998.

HOYT, E. **Conservação de parente Silvestres de plantas cultivadas.** Wilminton: Addison-Wesley Iberoamericana.IBPGR. IUCN. WWF, Embrapa-Cenargem, 1992. 52p.

KARTHA, K.K.; ROCA, W.M. Role of plant biotechnology in crop improvement. In: International scientific meeting of the cassava Biotechnology Network. 1992, Cartagena. **Proceedings...** Cali: Ciat, 1993. 466-476p.

KADOTA, M.; IMIZU, K.; HIRANO, T. Doublé-phase *in vitro* culture using sorbitol increase ahoot proliferation and hyperhydricity in Japanese pear. **Scientia Horticulturae**, v.89, p.207-210, 2001.

LEDO, A. da S.; CUNHA, A.O.; ARAGÃO, W.M.; TUPINAMBÁ, E.A. Efeito da sacarose e do manitol na conservação *in vitro* por crescimento lento de coqueiro anão. **Magistra**, Cruz das Almas, v.19, p.346-351, 2007.

LEMOS, E.E.P.; FERREIRA, M.S.; ALENCAR, L.M.C.; ALBUQUERQUE, M.M.; RAMALHO NETO, C.E. Conservação *in vitro* de germoplasma de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, Brasília, v.37, p.1359-1364, 2002.

MACIA, R.J.; ANDRADE, M.I.; RAGÚ, F.; NAICO, A.; SANDRAMO, J.; MUDEMA, J. Adaptabilidade e estabilidade do rendimento de clones de mandioca de polpa amarela e laranja em Moçambique, In: Trienal Simpósios of the linternational Society for Tropical Root Crops. In: African Branch (ISTRC-AB). **Proceedings...**Maputo, 2007, p.431.

MAFLA, G. RAO, J.C. ARANZALES, E. DEBOUK, D. **Handbook of procedures for um vitro germoplasm conservation of the genus *Manihot***. CIAT, Cali, Colombia. 56p. 2009.

MAFLA, G.; ROCA, W.; REYES, R.; ROA, J.C.; MUÑOZ, L.; BAÇA, A.E.; IEANAGA, M. *In vitro* management of cassava germoplasma CIAT. In: International scientific meeting of the cassava Biotechnology network, Cartagena. **Proceedings...** Cali: Ciat, 1993. 168-173 p.

MATTOS, P.L.P. de; SOUZA, A. da S.; FERREIRA FILHO, J.R. Micropropagação. In: **Aspetos socioeconômicos e agrônômicos da mandioca**. Cruz das Almas, Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2006. Cap.16, p. 455-491.

MONTARROYOS, A.V. **Conservação *in vitro* de variedades de mandioca com uso do ácido acetilsalicílico**. 1995. 98f. Dissertação (Mestrado em agronomia

área de concentração em fitotecnia). Faculdade de Agronomia, Universidade da Bahia. Cruz das Almas, 1995.

MUÑOZ MONTAÑO, L.; **Efecto del ácido acetilsalicílico en conservación *in vitro* de quince variedades de yuca (*Manihot esculenta* Crantz)**, 1991, 107f, (Dissertação), Universidad de Santiago de Cali, Colombia, 1991.

OLORODE, O. Conservation of plant genetic resources. **African Journal, Traditional Complementary and Alternative medicines**, Ile-ife, v.1, p.4-14, 2004.

PAIVA, H.N.; GOMES, J.M. **Propagação vegetativa de espécies florestais**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 1995. 40p.

PEREIRA NETO, V.B.P.; OTONI, W.C. Carbon sources and their osmotic potential in plant tissue culture: does it matter? **Science Horticulture**. Netherlands, v.97, p.193-198, 2003.

PERREIRA, A.M.S.; SILVA, D.B.N.; VIEIRA, R.F. Recursos genéticos de plantas medicinais do Cerrado. In: PERREIRA, A.M. (Org.) **Recursos genéticos e conservação de plantas medicinais do cerrado**. Ribeirão Preto: Legis Summa Ltda, 2007. p.37-73.

ROCA, W. M.; RODRIGUEZ, J. ; BELTRAN, J.; ROJA, J.; MAFLA, G. Tissue culture for the conservation and international Exchange of germoplasm. In: FUJIWARA, A., **Plant tissue culture** 1982. Tóquio: maruzen, 1982. p.771-772.

ROCA, W.M., ARIAS, D.I. CHAVES, R. Métodos de conservación *in vitro* de germoplasma. In: **cultura de tejidos em la agricultura, fundamentos y aplicaciones**. CIAT, Cali, Colombia. 1991. P.123 – 155.

ROCA, W.M.; CHAVES, R.; MARIN, M. L.; ARIAS, D.I.; MAFLA, G.; REYES, R. ***In vitro* methods of germoplasm conservation**. Genome, v 31, n2, p.813-817. 1989.

SANTANA, J.R.F. de. **Controle da morfogênese *in vitro* em algumas espécies de anonáceas.** 2003. 237f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

SANTOS, M. da C. Conservação *in vitro* de mangabeira nativa da região nordeste: disponível em: http://www.ufs.br/bicen//tde_busca/arquivo.php?codArquivo=386. Acessado em 10 de dez. 2010.

SCARIOT, A.O. SEVILLA, A.C. **Conservação *in situ* de Recursos Genéticos Vegetais.** In: NASS, L.L. (ed.). Recursos Genéticos Vegetais. Capítulo 14. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Brasília, p.474-509. 2007.

SEABROOK, J. E. A. Laboratory cultura. In: STABA, E.J. (Ed.). **Plant tissue as a source of biochemicals.** Boca Raton: 1980. 8-20p.

SOUZA, A. da S.; JUNGHANS, T.G.; FUKUDA, W.M.G. Técnicas e aplicações da cultura de tecidos em mandioca. In: CEREDA, M.P. (Coord.). **Agricultura: tuberosas amiláceas Latino Americanas.** 1ed. São Paulo: Fundação Cargill, 2002. p.118-178 (Série Culturas Tuberosas Amiláceas Latino Americanas, v.2).

SOUZA, A. da S.; PAZ, O.P. da. **Aspectos da cultura de tecidos em mandioca.** Cruz das Almas, BA: EMBRAPA-CNPMP (Apostila do VII Curso Intensivo Nacional de Mandioca), Cruz das Almas, 1990. 10-15p.

SOUZA, A. da S.; SOUZA, F.V.D.; SANTOS-SEREJO, J.A. dos; JUNGHANS, T.G.; SILVA NETO, H.P. da. Micropropagação da mandioca mediante ápices caulinares e segmentos nodais. **Circular Técnica 88.** Embrapa. Cruz das Almas, 11p. 2008.

SOUZA, A. da S.; JUNGHANS, T.G.; SOUZA, F.V.D.; SEREJO, J.A.S; NETO, H.P.; MENESES, M.C.; SILVEIRA, D.G.; SANTOS, V. da Silva. Micropropagação da mandioca. In: **Aspectos Práticos da Micropropagação de Plantas.** 1ª Ed 2009. Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, Cruz das Almas-BA, p 324-331.

STAMP, J.A.; HENSHAW, G.G. Adventitious regeneration in cassava. **Plant tissue and its agricultural applications**. London: 1986. 445-448p.

TIRFAA, 2010, Disponível em (<http://tirfaa.cenargen.embrapa.org>). Acesso em 29 de Novembro de 2010.

TOWILL, L.E. Germoplasm preservation. In: Trigiano, R.N.; Gray, D.J. (Eds.) **Plant tissue culture concepts and laboratory exercise**. 2nd. Edition. CRC Press, Boca Raton, 2000. p337-353.

UNNIKRISHNAN, M.; SHEELA, M.N. Studies on media, explants and incubation conditions for *in vitro* conservation of cassava germoplasm. In: CARVALHO, L.J.C. B.; THRO, A.M.; VILARINHOS, A.D. Cassava biotechnology. IV International Scientific Meeting – CBN, 1998, Brasília. Embrapa Recursos genéticos e Biotecnologia. **Proceedings...** CENARGEN, 2000. p.425 – 430.

VALOIS, A.C.C.; NASS, L. L.; GOES, M. Conservação *ex situ* de recursos genéticos vegetais. In: NASS, L.L.; VALOIS, A.C.C.; MELO, I.S. de; VALADERES-INGLIS, M. A. (Ed.). **Recursos genéticos e melhoramento de plantas**. Rondonópolis: Fundação MT, 2005. p.29-45.

VIEIRA, M.L.C. Conservação de germoplasma *in vitro*. **Biotecnologia Ciencia e Desenvolvimento**. Brasilia, v.3, p.19. 2006.

VIEGA, R.F. de A. **Bancos de Germoplasma**. 2008. Disponível em: <http://www.biota.org.br/pdf/v72cap04.pdf>. Acessado em 20 de Out. 2010.

WITHERS, L.A. New Technologies for the conservation for plant genetic resources. In: INTERNATIONAL CROP SCIENCE CONGRESS, 1992, Ames, Iowa. **Proceedings...** Madison: CSSA, 1993.

WITHER, L.A.; ENGELS, J.M.M. The best tube genebank: a safe alternative to field conservation. **IBPGR Newsletter for Asia and the pacific**, v.3, p.1-2, 1990.

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: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007. p.27- 42.

WITHERS, L.A.; WILLIAMS, J.T. Conservação *in vitro* de recursos genéticos de plantas. In: TORRES, C.A.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa, CNPH, 1998. v.1. 298-320p.

CAPÍTULO 1

**EFEITO DA SACAROSE SOBRE A CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DE
CULTIVARES MANDIOCA (*MANIHOT ESCULENTA* CRANTZ)**

EFEITO DA SACAROSE NA CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DE CULTIVARES DE MANDIOCA

Autor: Ricardo Josué Macia

Orientadora: Dra. Fernanda Vidigal Duarte Souza

RESUMO: O estabelecimento de condições de crescimento mínimo é fundamental para o manejo de grandes bancos *in vitro*. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de diferentes concentrações de sacarose na redução do crescimento *in vitro* de plantas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). O trabalho foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da Embrapa Mandioca e Fruticultura (CNPMPF), com 4 cultivares de mandioca (BGM 0036, BGM 0043, BGM 0116, BGM e 0555). Meristemas foram inoculados em meio MS, suplementados com 1,0 mg.L⁻¹ de tiamina, 100 mg.L de inositol, 0,02 mg.L⁻¹ de ANA, 0,04 mg.L⁻¹ de BAP, 0,05 mg.L⁻¹ de GA₃, 20 g.L⁻¹ de sacarose e 2,4 g.L⁻¹ de Phytigel[®] e pH ajustado em 5,8. em sala de crescimento sob temperatura de 27 ± 1 °C, fotoperíodo de 16 horas de densidade de fluxo de fótons de 22 μEm⁻²s⁻¹ por 30 dias. Foram realizados 3 subcultivos para a obtenção de plantas a serem usadas no experimento de conservação, que foi estabelecido a partir do meio de cultura “8S”. Para a realização do estudo, o meio foi suplementado com concentrações de 0, 10, 20, 40 e 80 g.L⁻¹ de sacarose. As plantas foram incubadas em temperatura de 21± 1°C, intensidade de fluxo de fótons de 22 μmol.m⁻²s⁻¹ e fotoperíodo de 12 horas. Os melhores resultados foram obtidos com as concentrações de 10 e 20 g.L⁻¹ de sacarose considerando todos os acessos avaliados. A concentração de 40 g.L⁻¹ induziu maior crescimento na maioria dos acessos com exceção do BGM 0116. Por outro lado, a cultivar (Riqueza) BGM 0043 foi mais eficiente na retenção de folhas ao serem conservados *in vitro* no período de 12 meses.

Palavras-chave: Banco *in vitro*, regulador osmótico, *Manihot esculenta* Crantz

EFFECT OF SUCROSE ON *IN VITRO* CONSERVATION OF CASSAVA CULTIVARS

Author: Ricardo Josué Macia

Adviser: Dra. Fernanda Vidigal Duarte Souza

ABSTRACT: The establishment of slow growing conditions is fundamental to the management of an *in vitro* bank. This work aimed to evaluate the effect of different concentrations of sucrose in the reduction of *in vitro* growth of cassava plants (*Manihot esculenta* Crantz). The work was carried out in the Tissue Culture LAB of Embrapa Cassava and Fruit Crops with 4 cultivars from the cassava genebank, Olho Roxo (BGM 0036), Riqueza (BGM 0043), Cigana Preta (BGM 0116) and Isabel de Souza (BGM 0555). Shoot tips were inoculated on MS medium, supplemented with 1.0 mg.L⁻¹ of thiamine, 100 mg.L⁻¹ of inositol, 0.02 mg.L⁻¹ of NAA, 0.04 mg.L⁻¹ of BA, 0.05 mg.L⁻¹ of GA₃, 20 g.L⁻¹ of sucrose and 2.4 g.L⁻¹ of Phytigel[®] with pH adjusted to 5.8. The shoot tips were incubated in a growth chamber at 27 ± 1 °C, photoperiod of 16 hours and light intensity of 22 μEm⁻²s⁻¹ for 30 days. Three subcultures were done in order to produce the plants to be used in the conservation assay established with 8S medium culture supplemented with 0 g.L⁻¹, 10 g.L⁻¹, 20 g.L⁻¹, 40 g.L⁻¹, 80 g.L⁻¹ of sucrose. The incubation conditions of this experiment was temperature of 22 °C, light intensity of 2.0 x 10⁷ μmoles.m⁻²s⁻¹ and a photoperiod of 12 h. The best results were obtained with 10 and 20 g.L⁻¹ of sucrose considering all evaluated cultivars. The concentrations of 40 g.L⁻¹ promoted more growth in most treatments with the exception of Cigana Preta (BGM 0116). On the other hand, the cultivar Riqueza (BGM 0043) was more efficient to retain leaves during the 12 months conservation period.

Key-Words: In vitro bank, osmotic regulator, germplasm

INTRODUÇÃO

A conservação de recursos genéticos vegetais, frente ao atual cenário de destruição ambiental e erosão genética de muitas espécies, é hoje uma demanda global. Desta forma, é imperativo priorizar o desenvolvimento e otimização de diferentes estratégias de conservação, especialmente para as espécies nativas, espécies em vias de extinção e espécies de importância econômica (CARVALHO; VIDAL, 2003).

As espécies de reprodução sexuada podem ser conservadas via sementes, em bancos próprios e sem riscos, ao contrário das espécies de propagação vegetativa, normalmente conservadas em jardins botânicos ou em coleções de campo (SHIBLI et al, 2006). A maioria destas espécies são mantidas a partir da propagação de bulbos, rizomas, etc, demandando atividades laboriosas e de alto custo, além das constantes ameaças que advém de fatores bióticos e abióticos.

Nesta direção, a biotecnologia, mais precisamente a cultura de tecidos, pode se constituir em uma ferramenta valiosa para a conservação de germoplasma, tanto de espécies de propagação vegetativa quanto de espécies com alto grau de heterosiguidade, como a mandioca.

A conservação *in vitro* se dá por meio da manutenção de plantas obtidas a partir da micropropagação, e em condições controladas e passíveis de serem monitoradas. Ainda que para algumas espécies as condições padrões estabelecidas para a multiplicação podem ser aplicadas para a conservação, a manutenção de um elevado número de acessos pode se tornar bastante laboriosa (ELGELMANN, 1996).

A busca por condições de crescimento mínimo, onde a planta se desenvolve, porém de forma muito lenta, aumentando o tempo de conservação *in vitro* e reduzindo o número de subcultivos, vem sendo objeto de estudos nos últimos 30 anos para várias espécies de importância econômica e outras ameaçadas de extinção (WITHER; WILLIAMS 1991).

Vale ressaltar, no entanto, que essa estratégia de conservação deve ser considerada como método complementar à preservação do germoplasma no campo. Essa técnica possui uma série de vantagens, entre as quais se pode citar a manutenção de grandes coleções em um espaço físico reduzido e sem os riscos de perdas por fatores bióticos e abióticos que acometem as coleções de campo (VIEIRA, 2006).

A conservação *in vitro* consiste na manutenção de plantas micropropagadas em condições de crescimento mínimo por meio da intervenção em diferentes fatores do cultivo como, redução da temperatura de incubação, radiação fotossintética ativa, fotoperíodo, ou da adição de reguladores osmóticos e hormonais ao meio de cultura, dentre outros (CANTO et al., 2004; FORTES; PEREIRA, 2001).

De acordo com FRÁGUAS et al. (2004) os bancos *in vitro* são também facilitadores para o intercâmbio de germoplasma, assim como podem se constituir em matrizeiros de plantas saudias e livres de vírus, a depender do procedimento de introdução destas plantas no laboratório. O sucesso de um protocolo de produção de plantas saudáveis vai depender de vários fatores como: estado fisiológico da planta matriz, tipo de explante, esterilização dos meios de cultura, condições de incubação, meio de cultura entre outras (FARIA et al., 2004). No caso específico da mandioca a introdução do meristema com 0,2 a 0,3 mm garante a regeneração de uma planta sadia e com elevada probabilidade de estar livre de vírus (ROCA, 1982; MAFLA et al., 1993 e SOUZA et al., 2006).

Nos últimos anos, uma série de estudos têm indicado que a cultura de tecidos pode ser utilizada na conservação de mandioca *in vitro*, visando solucionar os problemas que ocorrem no campo, assim como facilitar o intercâmbio de germoplasma entre instituições de interesse, como IITA, CIAT, EMBRAPA, etc (ROCA et al., 1989; MAFLA et al., 1993; EPPERSON et al., 1996; 1997; MAFLA et al., 2009).

A manutenção de plantas e mandioca *in vitro* à taxas contínuas de crescimento é relativamente fácil, entretanto, dispendioso, porque exige repicagens constantes, demandando tempo e mão de obra para sua realização. Estabelecer condições de crescimento mínimo *in vitro* para mandioca é, portanto, de extrema relevância a fim de otimizar o manejo da coleção e diminuir os riscos. existem várias modificações que podem ser feitas para alcançar esse

comportamento, Segundo VIEGA (2009), dentre as alterações que podem ser realizadas no meio de cultura pode-se destacar as reduções nas concentrações dos macro e micronutrientes, o uso de reguladores de crescimento que possam retardar senescência, modificações nas concentrações açúcares, dentre outras. Essas modificações, entretanto, não devem afetar a sua viabilidade, tornando factível sua posterior recuperação (TOWILL, 2000).

A sacarose é um dos componentes mais importantes no meio de cultura e serve como fonte de esqueleto de carbono e energia. Sua concentração também é um fator determinante no crescimento e é dependente do tipo de explante. Estudos comprovaram que 75 a 85% do aumento da biomassa se deve à incorporação de carbono pela adição de sacarose (CALDAS et al., 1990). Alterações na concentração de sacarose, portanto, podem alterar de forma significativa o metabolismo das plantas.

Na mandioca o balanço nitrogênio/carbono é alto e o crescimento de hastes e raízes é favorecido, mas o crescimento dos cultivos diminui proporcionalmente com o conteúdo de nitrogênio total do meio (ROCA et al., 1991).

Em vista disso, o desenvolvimento de protocolos para a conservação *in vitro* de diferentes cultivares de mandioca, com plantas viáveis por longos períodos de tempo, promoverá economia de tempo, espaço, material, e mão-de-obra, além de possibilitar um manejo adequado do banco de germoplasma, garantindo uma conservação eficiente desta importante espécie.

Portanto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito de diferentes concentrações de sacarose no crescimento *in vitro* de plantas de mandioca, tendo como perspectiva a redução do metabolismo das plantas para uma conservação à médio prazo.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da Embrapa Mandioca e Fruticultura, localizada no município de Cruz das Almas – BA.

Material vegetal

Para a realização deste trabalho foram selecionadas quatro cultivares de mandioca de diferentes regiões do Brasil, com base na adaptação e tradição de seus cultivos nessas áreas. Acessos destes materiais estão conservados em condições de campo no Banco Ativo de Mandioca da Embrapa (BGM). Na Tabela 1 estão relacionadas as cultivares, com seus respectivos códigos (BGMs) e seus locais de procedência.

TABELA 1. Relação de cultivares de mandioca, locais de procedência e regiões de cultivo.

Cultivares	Procedência	Região de cultivo
BGM 0036	EAUFB	Castro Alves BA
BGM 0043	IPEACO	Sete Lagoas MG
BGM 0116	EAUFB	Castro Alves BA
BGM 0555	*	*

* Não catalogado

Introdução de material

Manivas provenientes de plantas adultas foram plantadas em vasos de polietileno contendo uma mistura do substrato Plantmax[®] + fibra de coco (2:1). Após 21 dias de plantio, coletou-se a região apical dos brotos emergidos das manivas medindo 2,0 cm de comprimento, colocando-os em recipiente contendo água destilada. O processo de desinfestação foi realizado em câmara de fluxo, laminar onde brotos foram desinfetados em álcool a 50% por três minutos e hipoclorito de sódio a 0,25% por três minutos, seguido da tripla lavagem em água

destilada e autoclavada. Após esse processo, realizou-se a retirada dos meristemas com o auxílio de microscópio estereoscópio, bisturi e pinça. (Anexo 1).

Os meristemas foram inoculados em meio de cultura 4E, contendo os sais do MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com 1 mg.L^{-1} de tiamina, 100 mg.L^{-1} de inositol, $0,01 \text{ mg.L}^{-1}$ de ANA (ácido naftalenoacético), $0,04 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP (benzilaminopurina), $0,05 \text{ mg.L}^{-1}$ de GA_3 , (ácido giberélico), 20 mg.L^{-1} de sacarose, gelificado com $2,4 \text{ mg.L}^{-1}$ de Phytigel[®] e pH ajustado em 5,8. A incubação foi realizada em câmara de crescimento sob temperatura de $27 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 16 horas e densidade de fluxo de fótons de $30 \text{ } \mu\text{mol.m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ por 30 dias (Estabelecimento).

Multiplicação *in vitro* de plantas

A etapa de multiplicação foi realizada em três subcultivos, utilizando-se como explante, microestacas de aproximadamente 1,2 cm, com uma gema apical e/ou uma gema lateral. O primeiro subcultivo foi realizado após 60 dias do estabelecimento e os outros em intervalos de 60 dias.

O meio de cultivo pra a multiplicação foi o 17N composto por 1/3 dos macro e micronutrientes do MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com $0,35 \text{ mg.L}^{-1}$ de tiamina + 35 mg.L^{-1} de inositol + $0,01 \text{ mg.L}^{-1}$ de ANA + $0,01 \text{ mg.L}^{-1}$ de GA_3 + 20 mg.L^{-1} de sacarose, gelificada com $2,4 \text{ mg.L}^{-1}$ de Phytigel[®]. pH ajustado em 5,8; incubado em sala de crescimento sob temperatura de $27 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 16 horas de densidade de fluxo de fótons de $22 \text{ } \mu\text{mol.m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

Conservação *in vitro*

Ápices caulinares das plantas obtidas na etapa anterior foram inoculados no meio de cultura em tubos de ensaio de 25 mm x 150 mm, tapados com plásticos PVC e incubados em sala de conservação, onde permaneceram sob condições de temperatura de $21 \pm 1^\circ\text{C}$, intensidade de fluxo de fótons de $22 \text{ } \mu\text{mol.m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 12 horas. O meio básico utilizado foi o “8S” desenvolvido no Centro Internacional de Agricultura Tropical – CIAT, Cali, Colômbia, (CIAT, 1984) e constituído por sais minerais e vitaminas do “MS”

(MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com 0,01 mg.L⁻¹ de ANA + 0,02 mg.L⁻¹ de BAP + 0,1 mg.L⁻¹ AG₃, pH ajustado em 5,8. O meio foi acrescido 10, 20, 40 e 80 g.L⁻¹ de sacarose e um tratamento controle sem sacarose.

Avaliações

As avaliações foram realizadas 12 meses após a introdução dos ápices nas condições de conservação, considerando-se as seguintes variáveis: número de folhas verde, altura da planta (cm); número de folhas senescentes e número de microestacas por planta.

Análises estatísticas

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial (4 x 5), sendo 4 cultivares e 5 concentrações de sacarose, com 30 repetições, sendo cada repetição constituída por 1 ápice caulinar por tubo de ensaio. Todas as variáveis foram submetidas a análise de variância (ANOVA) e para homogeneizar a variância, fez-se a transformação de dados usando a fórmula $\sqrt{y + 0.5}$.

Os resultados obtidos em cada teste foram analisados com auxílio do aplicativo SAS, Statistical Analysis System (SAS Institute IN, 2000). Fontes de variação qualitativos foram avaliados com base em comparações múltiplas e quantitativas, pela regressão polinomial. A comparação entre as médias dos tratamentos foi feita pelo teste de Tukey (P < 0,05).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O resumo da análise de variância está apresentado na Tabela 2, onde se pode observar que tanto as cultivares, quanto as concentrações de sacarose, como fatores isolados, influenciaram de forma significativa todas as variáveis analisadas.

Por outro lado, vale destacar a interação significativa entre cultivares x sacarose para a altura das plantas e número de folhas verdes, ainda que para número de folhas senescentes e número de microestacas esta interação não tenha influenciado nos resultados obtidos.

Tabela 2. Resumo da análise de variância para as variáveis número de folhas verdes (NFV), altura de planta (cm) (AP), número de folhas senescentes (NFS) e número de microestacas (NM) de cultivares de mandioca das concentrações de sacarose.

FV	GL	Quadrados médios			
		NFV	AP	NFS	NM
Cultivares	3	76,264*	281,182*	12,461*	79,385*
Sacarose	4	116,038*	907,037*	36,527*	57,509*
Acessos x sacarose	12	17,045*	94,303*	2,601 ^{ns}	4,847 ^{ns}
Resíduo	367	0,2103	0,9013	0,1946	0,1812
CV %		18,89	30,60	28,10	14,32

* = Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F, ns= não significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.

As variáveis selecionadas que foram avaliadas neste trabalho são indicadoras do bom desenvolvimento das plantas e seu vigor, como altura de planta, número de folhas verdes e microestacas, assim como o estágio fisiológico ou ponto de senescência em que a planta se encontra, avaliado pelo número de folhas senescentes. Esse último parâmetro pode ser um forte auxiliar na delimitação do tempo de cultivo e do momento exato para a transferência da planta para um meio, implicando na realização de um subcultivo.

Para a conservação *in vitro* é necessário a redução do crescimento da planta, a fim de evitar excessivos subcultivos, porém preservando a capacidade da planta de ser recuperada, multiplicada e resgatada posteriormente. Por isso, a importância de avaliar as variáveis em conjunto na decisão do melhor tratamento para a conservação.

Na Figura 1 está o resultado da análise de regressão para a variável número médio de folhas verdes por acesso em razão das diferentes concentrações de sacarose no meio de cultura “8S”. Um comportamento tendendo para o quadrático foi observado para a maioria das cultivares, onde há aumento do número de folhas verdes até a concentração de 20 g.L⁻¹ de sacarose, iniciando uma queda com a concentração de 40 g.L⁻¹ e tornando-se altamente deletéria quando se adiciona ao meio 80 g.L⁻¹ desta fonte de carbono.

A ausência de sacarose promoveu o mais baixo número de folhas verdes, confirmando a importância da fonte de carbono para o desenvolvimento e manutenção das plantas *in vitro*. Por outro lado, as melhores respostas na retenção de folhas verdes foram variáveis e dependentes de cada acesso. A concentração de 20 g.L⁻¹ de sacarose promoveu melhores resultados para nas cultivares BGM 0036 e BGM 0043, ainda que este último tenha respondido igualmente bem em meio com 40 g.L⁻¹.

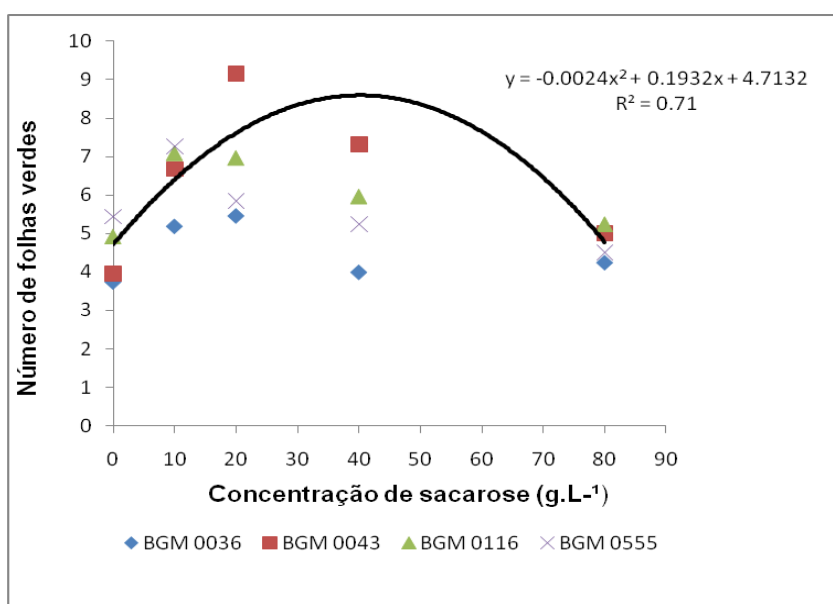


Figura 1. Número médio de folhas verdes por cultivar de mandioca em função de diferentes concentrações de sacarose no meio de cultura “8S”.

Em relação ao comportamento dos acessos, dentro de cada concentração de sacarose pode ser observado na Tabela 3. Das cultivares avaliadas o BGM 0043 foi o que apresentou as melhores médias em termos de folhas verdes independente da concentração testada, assim como o BGM 0036 apresentou as menores médias, mostrando aptidão morfogenética diferenciada. Já a cultivar BGM 0116 e BGM 0555 apresentaram mais folhas verdes em meio com 10 g.L⁻¹ de sacarose. Esses resultados mostram a diferença nas respostas no que concerne à concentração ideal que possa ser indicada para cada a conservação de cada acesso estudado.

Essa especificidade de resposta e a dependência em relação ao genótipo ficam bem evidentes e podem ser considerados um complicador no manejo de uma grande coleção, uma vez que determinará crescimentos diferenciados e portanto, momentos de subcultivos diferenciados.

A retenção de folhas verdes é uma variável de extrema importância na conservação *in vitro*, visto que é indicadora de bom desenvolvimento da planta nas condições estabelecidas e uma garantia de sobrevivência em caso de aclimatização do material, já que significa área fotossintetizante na condição *ex vitro*, após o período de endurecimento.

Tabela 3. Médias de número de folhas verde em função dos cultivares de mandioca em cada concentração de sacarose.

Cultivar	Sacarose (g.l ⁻¹)				
	0	10	20	40	80
BGM 0036	3,75 b	5,19 b	5,46 b	4,00 c	4,25 a
BGM 0043	3,96 ab	6,67 ab	9,16 a	7,32 a	5,00 a
BGM 0116	4,92 ab	7,08 a	6,96 b	5,96 ab	5,24 a
BGM 0555	5,44 a	7,27 a	5,85 b	5,25 bc	4,5 a
CV (%)	18,89				
Média	5,66				

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

O efeito das concentrações de sacarose sobre a variável altura de plantas seguiu um comportamento quadrático para a maioria das cultivares (BGM 0036; BGM 0043; BGM 0116), como pode ser observado na (Figura 2).

A altura de plantas, quando se pretende conservação *in vitro* de plantas de mandioca é uma variável importante para indicar a proximidade do subcultivo, já que chega um momento em que a planta atinge o topo do tubo. Em algumas variedades a partir deste ponto há um aumento do número de folhas senescentes, indicando um estágio fisiológico mais avançado e a necessidade da troca para meio fresco.

Os melhores resultados para esta variável foram obtidos com as concentrações de 10 g.L⁻¹ e 20 g.L⁻¹ considerando todos os acessos avaliados, já que a concentração de 40 g.L⁻¹ induziu maior crescimento na maioria dos acessos com exceção do BGM 0116, o que é um resultado indesejável quando se pretende fazer conservação *in vitro* (Figura 2). Esta variável, ainda que na concentração de 80 g.L⁻¹ tenha apresentado resultados semelhantes aos que foram registrados com 10 g.L⁻¹ e 20 g.L⁻¹, não é um tratamento interessante pelos resultados obtidos em relação às folhas verdes, enfatizando uma vez mais a importância de se considerar todas as variáveis na avaliação dos resultados.

Discussão semelhante pode ser feita em relação ao tratamento sem sacarose, que apesar de proporcionar os menores valores médios de altura das plantas em todas as cultivares, não deve, igualmente, ser considerado como um tratamento interessante em função, também, do baixo número de folhas verdes, o que certamente compromete o resgate posterior destes acessos.

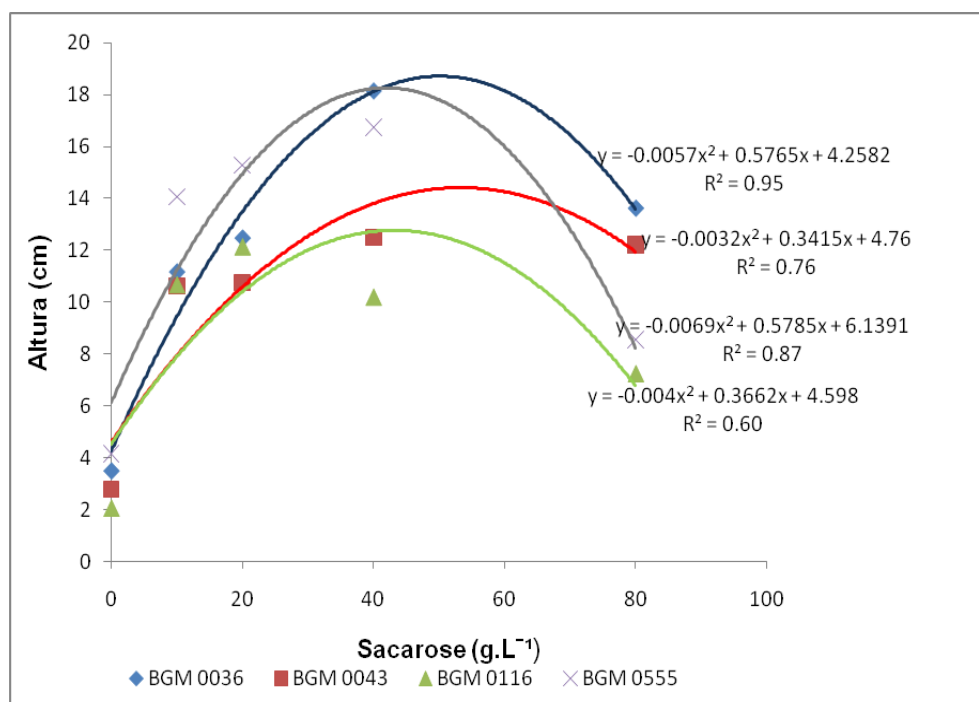


Figura 2. Altura média das plantas em razão de diferentes concentrações de sacarose no meio “8S”.

No que refere ao comportamento das cultivares em cada nível de sacarose, pode se observar que a ausência de sacarose e o tratamento acrescido a 10 g.L^{-1} não causaram diferenças significativas em todas as cultivares, entretanto, os níveis de $20, 40, 80 \text{ g.L}^{-1}$ causaram efeitos significativos em todas as cultivares, melhores resultados foram observados na cultivar BGM 0043 que proporcionou crescimento lento sem comprometer a viabilidade das plantas (Tabela 4).

Tabela 4. Valores médios de altura de plantas (cm) das cultivares de mandioca após 12 meses de conservação *in vitro*.

Cultivar	Sacarose (g.l^{-1})				
	0	10	20	40	80
BGM 0036	3,51 a	11,17 a	12,47 ab	18,13 a	13,62 a
BGM 0043	2,78 a	10,63 a	10,76 b	11,84 b	12,22 ab
BGM 0116	2,06 a	10,68 a	12,14 ab	10,20 b	8.63 b
BGM 0555	4,16 a	14,06 a	15,28 a	16,75 a	
CV (%)	30,60				
Média	10,47				

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

Em relação a variável número de folhas senescentes, a interação entre os fatores não foi significativa, entretanto verificou-se efeito significativo dos fatores quando analisados de forma isolados.

A análise de regressão (Figura 3) pode-se observar um efeito linear das concentrações de sacarose, dentro dos limites estipulados neste trabalho, ou seja, quanto maior a concentração utilizada, mais rapidamente a planta entrou em senescência, provavelmente porque teve seu metabolismo mais acelerado, induzindo maior crescimento, o que foi observado, efetivamente, na altura das plantas. Os melhores resultados foram observados nas concentrações de 10 e 20 g.L⁻¹ de sacarose considerando a combinação dos efeito de outras variáveis.

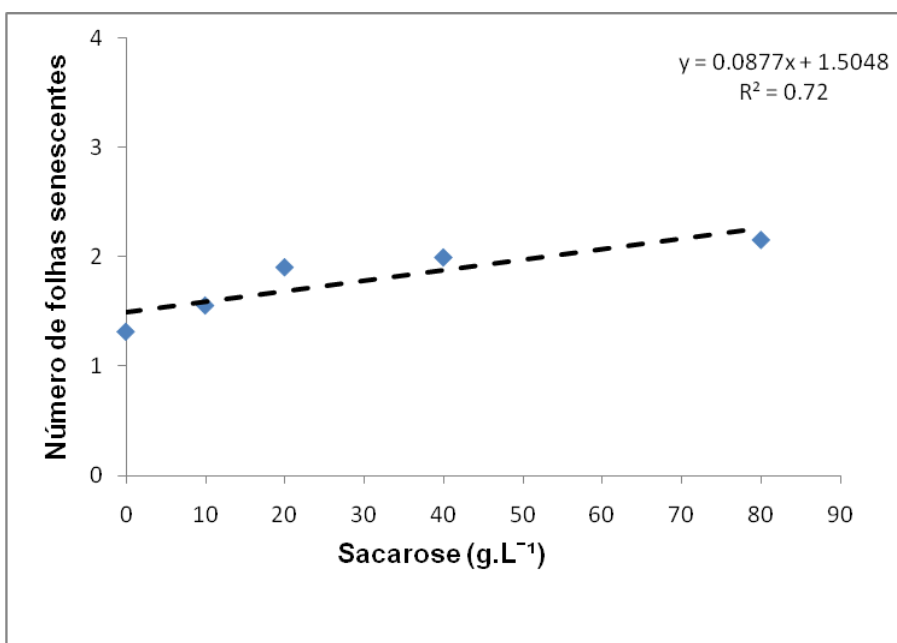


Figura 3. Efeito dos níveis de sacarose sobre o número de folhas senescentes de plantas de mandioca em 12 meses de conservação *in vitro*.

As respostas diferenciada das cultivares pode ser vista na (Figura 4A e 4B). Foram observados três comportamentos diferentes no que refere a senescência, indicando que estes acessos demandarão diferentes momentos de repicagem. A cultivar BGM 0555 foi o que apresentou maior estado de senescência no período avaliado, seguido do BGM 0116 e BGM 0036. Por outro lado, o BGM 0043 foi mais eficiente com a menor média de número de folhas senescentes ao ser conservado *in vitro* nestas condições e pelo período estipulado para as

avaliações, que foi de 12 meses. Em relação ao meio sem adição de sacarose, valem aqui, as mesmas considerações feitas para as variáveis folhas verdes e altura de plantas.

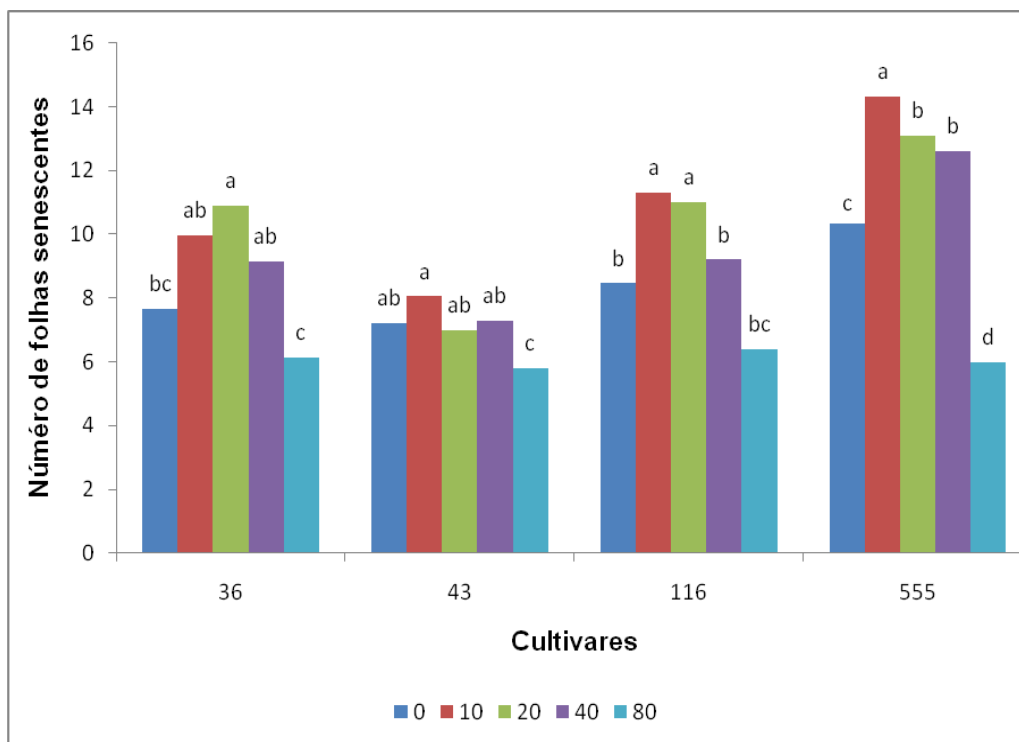


Figura 4A. Número de folhas senescentes das plantas em função dos BGM e das concentrações de sacarose.

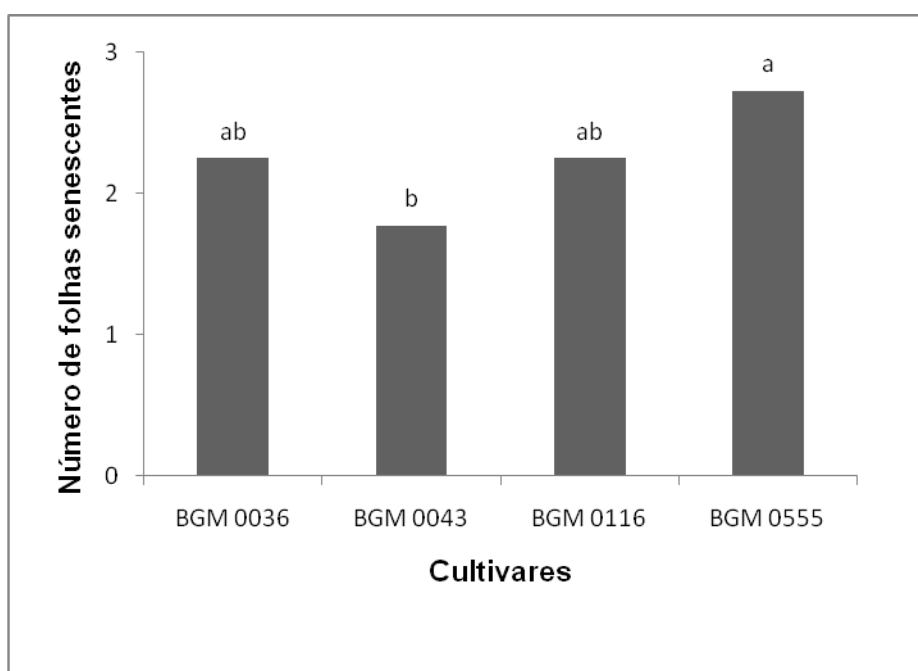


Figura 4A. Número de folhas senescentes das plantas em função dos BGM.

Quanto ao número de microestacas, todos os acessos formaram um número que permite sua regeneração sem maiores problemas como pode ser observado na Figura 5, ainda que diferenças significativas tenham sido observadas entre eles. Essas diferenças deixam claro que, também o potencial propagativo é dependente de cada cultivar, não obstante, as cultivares BGM 0555 e 0116 tiveram maiores médias de número de microestacas, enquanto a BGM 0036 apresentou os valores mais baixos, indicando que provavelmente pode comprometer futuros subcultivos.

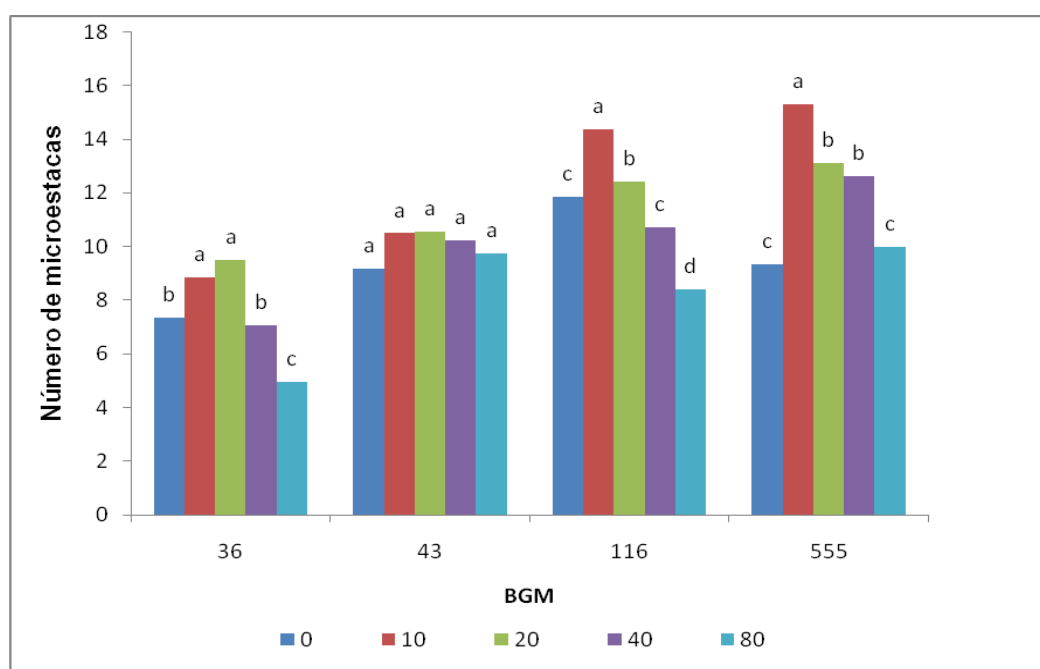


Figura 5. Número médio de microestacas em função das diferentes BGM.

A análise de regressão Figura 6, mostra o efeito dos nível de sacarose na variável número de microestacas. Pode-se observar um comportamento quadrático, acompanhando de certa forma, o comportamento observado para a altura de plantas, já que estas duas variáveis podem apresentar uma boa correlação. A concentração de 20 e 40 g.L⁻¹ promoveram maior número de microestacas por planta, enquanto que o tratamento sem adição de sacarose e o tratamento acrescido a 80 g.L⁻¹ produziram as menores médias de microestacas por planta.

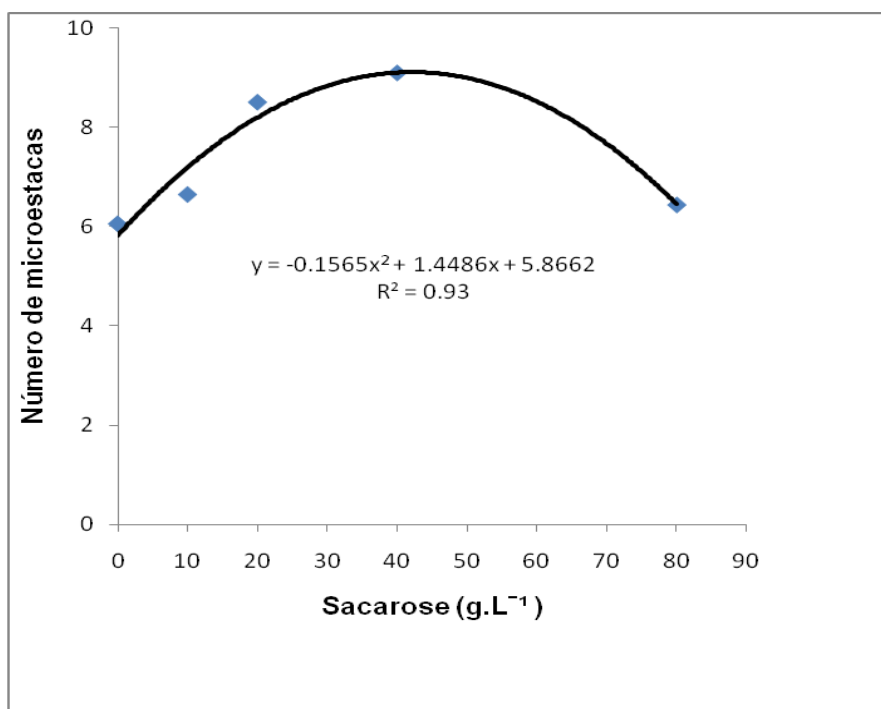


Figura 6. Número médio de microestacas em função da concentração de sacarose no meio de cultura após 12 meses.

Os açúcares exercem função regulatória em muitos processos fotossintéticos, entre os quais a regulação da expressão gênica, proliferação e morte celular, crescimento da planta, expansão foliar e senescência e desenvolvimento da semente (GIBSON, 2005; ROLLAND et al., 2006). Segundo CALDAS et al. (1998), a sacarose é o carboidrato mais utilizado nos meios nutritivos, sendo que esse açúcar promove as mais altas taxas de crescimento na maioria das espécies. O uso de 30 g.L⁻¹ é o mais indicado para um grande número de espécies, quando se objetiva crescimento contínuo e micropropagação.

A sacarose é necessária para o desenvolvimento de células do xilema e floema, em tecidos cultivados *in vitro*. De acordo com CALDAS (1990), a quantidade de vasos xilemáticos é dependente da concentração de sacarose no meio da cultura para promover uma perfeita conexão das raízes com os vasos xilemáticos das plantas, aumentando as taxas de absorção de água e nutrientes das raízes em ambiente *in vitro*.

Na conservação *in vitro* sob taxas de crescimento mínimo é preciso adequar essa função a uma redução do metabolismo mantendo, entretanto, a viabilidade da planta e garantindo sua posterior regeneração.

Variações nas fontes de carbono e nas concentrações de sacarose, já vêm sendo ensaiadas para a conservação *in vitro* de várias espécies a fim de otimizar a conservação das mesmas em condições de laboratório e reduzir o manejo da coleção.

Em orquídeas, resultados com diferentes espécies mostram a diversidade de resposta em relação ao tema. O uso de 20 g.L⁻¹ de sacarose adicionada ao meio de cultura foi mais eficiente tanto para a conservação *in vitro* de *Cattleya labiata* (FRÁGUAS et al., 2009), quanto para híbridos de *Phalaenopsis* (BHATTARCHARJEE et al., 1999). Já OLIVEIRA et al (2003), obtiveram melhores respostas para *Oncidium varicosum* Lndl. com a utilização de 60 g.L⁻¹ de sacarose, mostrando que também para as espécies de orquídeas ha uma grande variação na concentração ideal a ser usada.

Em cana de açúcar, LEMOS et al. (2002) testaram duas concentrações de sacarose (10 g.L⁻¹ e 20 g.L⁻¹) em associação com outros açúcares e três temperaturas (10°C, 15°C e 20°C). A adição de 1 mg.L⁻¹ de ácido abscísico, (ABA) 20 g.L⁻¹ de sacarose sob temperatura de 15°C, propiciaram o melhor tratamento para manter as plantas por 1 ano sem a necessidade de subcultivos intermediários.

Para bananeiras a concentração de 30 g.L⁻¹ de sacarose parece ser a mais recomendada, ainda que nem todas as variedades respondam de maneira igual. De acordo com o CGIAR (2010), o uso de 30 g.L⁻¹ de sacarose é a concentração mais utilizada para a manutenção de grandes coleções *in vitro*, como a da Bioversity, sediada em Leuven, na Bélgica. As condições estabelecidas neste banco permitem, em média, um intervalo de 12 meses entre um subcultivo e outro, o que facilita bastante o manejo da coleção.

Apesar da literatura mostrar uma grande variação de resultados no tocante a concentração de sacarose ideal, no caso da conservação *in vitro*, concentrações entre 10 g.L⁻¹ a 30 g.L⁻¹ parecem atender ao maior número de espécies, como constatado nos trabalhos discutidos acima.

Os resultados obtidos neste trabalho corroboram com esta afirmação, quando para todas as variáveis estudadas a ausência de sacarose proporcionou resultados pífios e desconsiderados pela impossibilidade de regenerar as plantas posteriormente. O uso de 80 g.L⁻¹ foi tóxico, promovendo resultados semelhantes aos que foram obtidos com a ausência do açúcar.

Por outro lado, a concentração de 40 g.L^{-1} mostrou um efeito indesejável para todos os acessos avaliados em uma variável de extrema importância, como o número de folhas verdes. Esse resultado é previsível, já que esta concentração de açúcar promove as melhores taxas de crescimento, acelerando o metabolismo das plantas favorecendo a senescência das folhas.

Dessa forma, quando analisadas em conjunto, todas as variáveis e seus efeitos sobre a conservação dos acessos avaliados, as concentrações de 10 g.L^{-1} e 20 g.L^{-1} proporcionaram os melhores resultados nas condições estabelecidas neste estudo para os acessos avaliados. Com essas concentrações foi possível reduzir o crescimento das plantas, porém mantendo folhas verdes e um número de microestacas que permite a posterior regeneração e multiplicação das cultivares/acessos avaliados.

CONCLUSÕES

A ausência de sacarose compromete o crescimento das plantas;

A concentração de 80 g.L^{-1} de sacarose é tóxica para as plantas conservadas; sobre as condições do experimento;

A concentração de 40 g.L^{-1} promove as maiores taxas de crescimento, não sendo assim, recomendado para a conservação *in vitro*;

As concentrações ideais para as cultivares avaliados são 10 g.L^{-1} e 20 g.L^{-1} de sacarose;

A cultivar BGM 0043 apresenta maior amplitude para ser conservada em diferentes concentrações de sacarose.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M.E. Meios nutritivos. In: TORRES, A.C.(Eds.). **Técnicas e aplicações de tecidos de plantas**. Brasília,: Embrapa-CNPH, 1990. 40-65p.

CALDAS, L.S. BUSO, J.A. (eds) **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa. p.87-132. 1998.

CANTO, A.M.M.E.; SOUZA, F. V.D.; COSTA, M.A.P.C.; LEDO, C.A.S.; CABRAL, J.R.S. Implicações do paclobutrazol no crescimento *in vitro* de plantas de abacaxi na conservação do germoplasma. Pesquisa Agropecuária Brasileira. V.40, p.717-720, 2004.

CARVALHO, J.M.F.C.; VIDAL, M.S. **Criopreservação no melhoramento vegetal**. Campina grande: Embrapa Algodão, 2003. 26p. (Embrapa Algodão. Documentos, 115).

CGIR In: [http://croptgenebank.2010 Sgrp.cgiar.org/index.php?option=com_content&view=article&id=547&itemid=742&lang=English](http://croptgenebank.2010.Sgrp.cgiar.org/index.php?option=com_content&view=article&id=547&itemid=742&lang=English). (Acessado em 16/Dez de 2010).

CIAT. Centro Internaciona de Agricultura Tropical. **El cultivo de meristemas para la conservacion de germoplasma de yucca in vitro**. Cali, Colombia: CIAT, 1984. 40-44p.

ENGELMANN, F. *In vitro* conservations methods. In: **Biotechnology and plant genetic resources: Conservation and uses**. CAB International, Wallingford. 1996. 112-115p

ENGELMANN, F. *In vitro* germoplasm conservation. In: DREW, R.A. (Ed.). **Tropical & Genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/Embrapa-CNPH, 1998.

EPPERSON, J.E.; PACHIÇO, D.H.; GUEVARA, C.L. The cost of maintaining genetic resources of cassava, *manihot esculenta* Crantz. **Acta Horticulture**. 429: p.409-413. 1996.

EPPERSON, J.E.; PACHIÇO, D.H.; GUEVARA, C.L. A cost analysis of maintaining cassava plant genetic resources. **Crop Science**, v.37 n.5. p.1641-1649. 2000.

FARIA, R.T.; RODRIGUES, F.N.; OLIVEIRA, L.V.R.; MULLER, C. In vitro *Dendrobium nobile* plant growth and rooting in different sucrose concentrations. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.22, p.780-783, 2004.

FORTES, G.R. de L.; PEREIRA, J.E.S. Conservação in vitro da batata com ácido acetilsalicílico e duas fontes de carboidratos. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 36, 2001.

FRÁGUAS, C.B.; VILLA, F.; SOUZA, A.V.; PASQUAL, M.; DUTRA, L.F. Crescimento *in vitro* de plântulas de orquídeas oriundas da hibridação entre *Cattleya labiata* x *Laelia itambana*. **Revista Ceres**, Viçosa, Viçosa, v.50, p.719-726, 2004.

FRÁGUAS, C.B.; PEREIRA, A.R.; RODRIGUES, V.A.; FERREIRA, E. A.; PASQUAL, M. Propagação *in vitro* de espécies ornamentais. Disponível em: www.editora.ufla.br/Bolextensao/pdfBE/bol_99.pdf. Acesso em 20 de novembro de 2009.

GIBSON, S.I. Control of plant development and gene expression by sugar signaling. **Current Opinion in plant Biology**, v.8, p.93-102. 2005.

LE MOS, M.S.F.; ALENCAR, L.M.C.; NETO, C.E.R.; ALBUQUERQUE, M.M. Conservação *in vitro* de germoplasma de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária**. Brasília, v.37, p.1359-1364, 2002.

MAFLA, G.; ROA, J.C.; ARANZALES, E. DEBOUCK, D. 2009. **Handbook of procedures for *in vitro* germplasm conservation of the genus *Manihot***. CIAT, Cali, Colombia. 56p. 2009.

MAFLA, G.; ROCA, W.; REYES, R.; ROA, J.C.; MUÑOZ, L.; BAÇA, A.E.; IEANAGA, M. *In vitro* management of cassava germoplasma. CIAT. In: International Scientific Meeting of the cassava Biotechnology network, Cartagena. **Proceedings...** cali: Ciat, 1993. 168-173 p.

MURASSHIGE, T.; SKOOG, F.A revised médium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiology Plantarum**, Copenhagen, v15, 1962. 437-497p.

OLIVEIRA, L.V.R.; FARIA, R.T.; FONSECA, I.C.B; SACONATO, C. Influencia da fonte e concentração de carboidratos no crescimento vegetativo e enraizamento *in vitro* de *Oncidium varicosum* lindl. (Orchidacea). **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 24, 2003. 165-272p.

ROCA, W.M. Cultivo de tejidos en yuca. In: DOMINGUEZ, C.E. **Yuca: investigación, producción y utilización**. Cali: PNUD: CIAT, 1982 Cap. 2, p.153-163.

ROCA, W.M.; CHAVES, R.; MARIN, M. L.; ARIAS, D.I.; MAFLA, G.; REYES, R. ***In vitro* methods of germoplasm conservation**. *Genome*, 31 (2): 813-817.1989.

ROCA, W.M.; ARIAS, D.I.; CHAVES, R. Métodos de conservación *in vitro* de germoplasma. In: **cultura de tejidos em La agricultura, fundamentos y aplicaciones**. CIAT, Cali, Colombia. 1991. 123 – 155p.

ROLLAND, F.; BAENA-GONZALES, E.; SHEEN, J. Sugar sensing and signaling in plants: Conserved and novel mechanisms. **Annual Review of plant Biology**, v. 57, p.675-709, 2006.

SAS INSTITUTE INC. SAS/STAT. **Users guide** V8.0 vol. I, II and III. Carry NC: SAS Institute, INC. 2000.

SHIBLI, R.A.; SMITH, M.A.L.; SPOMER, L.A. Osmotic adjustment and growth responses of three *Crysanthemum morifolium* Ramat. Cultivares to osmotic stress induced *in vitro*. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v.15, p.1373-1381, 2006.

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. (Eds.) **Aspectos socioeconômicos e agrônômicos da mandioca**. Cruz das Almas – BA: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2006, p.364-432.

TOWILL, L.E. Germoplasm preservation In: Trigiano, R.N. & Gray, D.J. (Ed.). **Plant tissue culture concepts and laboratory exercises**. 2nd. Ed, CRC. Press, Boca Raton, 2000, p.337-342.

VIEGA, R.F. de A. Banco de germoplasma. 2008. Disponível em <http://www.biota.org.br/pdf/v72cap04.pdf>. Acesso em: 15 set. 2009.

VIEIRA, M.L.C. Conservação de germoplasma *in vitro*. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**. Brasília, DF, v.3, 2006, 19p.

WITHERS, L.A.; WILLIAMS, J.T. Conservação *in vitro* de Recursos genéticos de plantas In: TORRES et al (Ed.). **Cultura de Tecidos e transformação Genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA, vol 1, p.297-330, 1998.

CAPÍTULO 2

REGULADORES OSMÓTICOS NA CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DA MANDIOCA¹

¹ Artigo Submetido ao Comitê Editorial do Periódico Científico Pesquisa Agropecuária Brasileira

REGULADORES OSMÓTICOS NA CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DA MANDIOCA

Autor: Ricardo Josué Macia

Orientadora: Dra. Fernanda Vidigal Duarte Souza

RESUMO: A utilização de reguladores osmóticos na conservação de germoplasma *in vitro* a fim de reduzir o metabolismo da planta e seu crescimento é uma das estratégias usadas para o estabelecimento de condições adequadas de manejo destas coleções. O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito de diferentes concentrações de manitol e sorbitol isolados ou em combinação com a sacarose, na redução do crescimento *in vitro* de plantas de mandioca BGM 1660. Com vista à obtenção de plantas para ambos os experimentos, meristemas foram inoculados em meio MS, suplementados com 1,0 mg.L⁻¹ de tiamina, 100 mg.L⁻¹ de inositol, 0,02 mg.L⁻¹ de ANA, 0,04 mg.L⁻¹ de BAP, 0,05 mg.L⁻¹ de GA₃, 20 g.L⁻¹ de sacarose e 2,4 g.L⁻¹ de Phytigel® e pH ajustado em 5,8; incubado em sala de crescimento sob temperatura de 27 ± 1 °C, fotoperíodo de 16 horas de densidade de fluxo de fótons de 22 μEm⁻²s⁻¹ por 30 dias. Para a conservação foram estabelecidos dois experimentos em DIC no esquema fatorial (2x3) sendo duas concentrações de sacarose (0 e 20 g.L⁻¹) e três de manitol ou sorbitol (0; 5 e 10 g.L⁻¹), usando como meio básico o 8S. A incubação foi a temperatura de 21 ± 1°C, intensidade de fluxo de Fótons de 2.0 x 10⁷ μmoles m⁻²s⁻¹ e fotoperíodo de 12 horas. Em ambos os experimentos observou-se que a ausência de sacarose comprometeu fortemente o desenvolvimento das plantas. O manitol mostrou um efeito redutor de crescimento mais acentuado que o sorbitol. A concentração de 10 g.L⁻¹ de ambos os açúcares inibiu o crescimento de forma crítica, deixando evidente que o estresse hídrico provocado não foi tolerado pelas plantas, interferindo de forma negativa no seu desenvolvimento. O tratamento com 20 g.L⁻¹ de sacarose, sem manitol ou sorbitol promoveu o melhor resultado, nas condições estabelecidas no trabalho, permitindo a conservação das plantas pelo período de 12 meses.

Palavras-chave: Conservação *in vitro*, sacarose, *Manihot esculenta* Crantz.

OSMOTIC REGULATORS ON *IN VITRO* CONSERVATION OF CASSAVA

Author: Ricardo Josué Macia

Adviser: DSc. Fernanda Vidigal Duarte Souza

ABSTRACT. The use of osmotic regulators to *in vitro* germplasm conservation is one of the strategies used to reduce plant growth and to get the best conditions to an adequate management of the *in vitro* collections. This work aimed to evaluate the effect of different concentrations of manitol and sorbitol alone or in combination with sucrose in reducing the growth of *in vitro* cassava plants of BGM 1660 from cassava genebank. In order to obtain plants to install the experiments, shoot tips were inoculated in MS medium supplemented with 1.0 mg.L⁻¹ of thiamine, 100 mg.L⁻¹ of inositol, 0.02 mg.L⁻¹ of NAA, 0.04 mg.L⁻¹ of BA, 0.05 mg.L⁻¹ of GA₃, 20 g.L⁻¹ of sucrose and 2.4 g.L⁻¹ of Phytigel[®] with the pH adjusted to 5,8. The cultures were incubated in a growth chamber under the temperature of 27 ± 1 °C, 16 h light and light intensity of 22 μmol.m⁻²s⁻¹ for 30 days. For the conservation study, two experiments were performed in a completely randomized design in a 2x3 factorial scheme considering two sucrose concentrations (0 and 20 g.L⁻¹) and three concentrations of sorbitol or manitol (0; 0.5 and 1.0 g.L⁻¹), using the 8S as basic medium. The plants were incubated under the temperature of 21 ± 1°C, photoperiod of 12 h and light intensity of 2.0 x 10⁷ μmoles. In both experiments the absence of sucrose strongly hindered plant development. Mannitol showed a stronger reduction effect in comparison with sorbitol. The concentration of 10 g.L⁻¹ from both sugars inhibited growing making evident that the hydric stress promoted was not tolerated by plants, therefore affecting their development. The best result was obtained with 20 g.L⁻¹ of sucrose without manitol and sorbitol allowing plant conservation for 12 months.

Key-words: *In vitro* conservation, sucrose, *Manihot esculenta* Crantz.

INTRODUÇÃO

Nos últimos anos o surgimento de novas tecnologias, a antropização de novas terras, dentre outros fatores, provocaram uma rápida e profunda erosão nos recursos genéticos de valor real e potencial para a alimentação e agricultura. Essa erosão pode levar a uma extinção de materiais de valor agrícola incalculável, conferindo às coleções de germoplasma um papel fundamental na preservação destes recursos genéticos (ROCA et al., 1983; SILVA et al., 1997; AMARAL et al., 2004; PADUA, 2010).

As formas de conservação de germoplasma de uma espécie podem ser variadas e vão depender de uma série de fatores, como o sistema reprodutivo, as condições de amostragem, disponibilidade de recursos físicos e financeiros e humanos e mesmo de decisões no âmbito político.

A conservação *in situ* depende de conhecimentos ecológicos e genéticos fundamentais a respeito das populações, para que seja eficaz. Por outro lado, o contexto social, econômico e político da área desejada podem afetar o sucesso do planejamento (SCARIO; SEVILLA, 2007). A conservação *on farm*, realizada junto aos agricultores familiares é de grande importância, porém deve ser considerado um complemento para outro tipo de conservação *in situ* (CLEMENT et al., 2007). A conservação de sementes a baixas temperaturas é ideal para espécies de sementes ortodoxas, porém não se aplica a espécies cujas sementes são recalcitrantes ou com propagação vegetativa.

Por outro lado, espécies que possuem um elevado grau de heteroziguidade, não produzindo genotipicamente a planta mãe, como é o caso da mandioca, são conservadas por meio de coleções no campo, que embora requeiram pouca tecnologia, ocupam grandes áreas experimentais, demandando mão de obra, além de estarem sujeitas ao ataque de pragas e doenças (SOUZA et al., 2006; FALEIRO, 2010).

Estes aspectos levam à necessidade de se desenvolver técnicas alternativas de conservação e que possam funcionar como duplicatas de segurança.

A conservação *in vitro* de plantas micropropagadas é uma das alternativas que vem sendo largamente utilizada em muitas espécies de importância econômica, notadamente aquelas propagadas assexuadamente, principalmente como duplicata de segurança (GIACOMETTI; TIÓFELO, 1993; CANTO et al., 2004; SOUZA et al., 2009; SANTA-ROSA, 2010). A principal vantagem desta técnica é a ausência dos riscos existentes nas coleções de campo, assim como o pouco espaço que ocupa para a manutenção de um elevado número de plantas.

A obtenção de plantas para a conservação se realiza por meio da multiplicação *in vitro* dos acessos a serem introduzidos, sendo necessário adequar condições para retardar o crescimento das plantas, já que uma das desvantagens desta estratégia é a necessidade de subcultivos periódicos, o que a torna laboriosa e sujeita a riscos de variação somaclonal.

Alguns fatores influenciam o crescimento das plantas, como temperatura, intensidade luminosa, concentração osmótica e reguladores vegetais, que devidamente controlados, auxiliam no prolongamento do tempo entre subcultivos.

A estratégia de manter a planta em crescimento lento, ou à taxas mínimas, tem sido utilizada com sucesso, principalmente para a conservação de meristemas e/ou ápices meristemáticos de muitas espécies, e consiste em reduzir drasticamente o metabolismo da planta, sem afetar sua viabilidade, pela indução de estresse osmótico, redução da intensidade de luz ou temperatura, acréscimos de retardantes de crescimento e/ou diminuindo a concentração dos componentes salinos e orgânicos do meio de cultura (WITHERS; WILLIAMS, 1998).

Os agentes osmóticos, tais como manitol e sorbitol, dentre outros, ao serem adicionados ao meio de cultura, atuam externamente, removendo o excesso de água intracelular, por gradiente osmótico, fazendo com que o crescimento da cultura ocorra de forma mais lenta (DUMET et al., 1993; THORPE et al., 2008). O estresse osmótico ocorre quando a concentração de moléculas na solução fora da célula é diferente daquela interna à célula. Quando isso acontece, a água flui de dentro ou de fora da célula por osmose, alterando o ambiente intracelular e afetando o crescimento da planta (MADAKADZE; SENARATINA, 2000; MOREIRA et al., 2008).

Para maior eficiência na redução do metabolismo celular *in vitro* deve se buscar a combinação de vários fatores juntos, como alterações na temperatura de incubação, no fluxo de fótons, no fotoperíodo, assim como adição ou remoção de componentes ao meio de cultura (WITHERS, 1985),

Dentre os componentes do meio, os açúcares exercem grande influência no crescimento das plantas. O manitol e o sorbitol, açúcares alcoolizados, são de difícil metabolização, sendo considerados mais efetivos do que a sacarose para a limitação de crescimento. Deve-se considerar, no entanto, que estas substâncias interagem com o conteúdo de sacarose do meio e com a temperatura empregada na conservação para influenciar no metabolismo das plantas (ROCA et al., 1991).

Esses açúcares podem ser mais adequados que os açúcares solúveis inertes, pois por sua natureza altamente hidroxilantes podem tomar o lugar da água nos polissacarídeos do citoplasma, ajudando a manter o funcionamento normal das enzimas e membranas celulares, quando o nível da água começa a baixar devido à pressão osmótica (MABANZA; JONARD, 1981; MABANZA; MINGUÍ, 1998).

O manitol e o sorbitol já vêm sendo avaliados como potenciais retardantes no crescimento e desenvolvimento de um grande número de espécies *in vitro*, como cana de açúcar (LEMOS et al., 2002), maracujá (FARIA et al., 2006); bromélias (SOUZA, 2008) e mangabeira (JESUS et al.; 2010), dentre outras.

Para a mandioca, trabalhos realizados no CIAT já avaliaram o uso de ácido acetil salicílico, nitrato de prata, assim como diferentes concentrações de manitol ou sorbitol e a combinação de ambos para a manutenção de um grande número de acessos. Os resultados obtidos mostraram que a combinação sacarose e sorbitol proporcionou efeito retardador do crescimento de plantas *in vitro*, chegando a ser em alguns casos, tóxico (CIAT, 1995). Entretanto, pela especificidade das respostas e a elevada dependência, no caso da mandioca, em relação ao genótipo (genótipo-dependência) novos ensaios precisam ser feitos.

UNNIKRISHNAN; SHEELA (2000), avaliaram o uso da sacarose e manitol como agentes osmóticos na conservação *in vitro* de seis cultivares de mandioca, e efeitos significativos foram observados. Por outro lado a temperatura de incubação ($27 \pm 1^\circ\text{C}$) provocou um maior crescimento inicial das plantas e uma rápida deterioração, condição indesejável para conservação. Em algumas combinações sacarose – manitol os autores registraram um efeito deletério.

Os resultados encontrados por MONTARROYOS (1995), usando o ácido acetilsalicílico e por MAFLA et al. (2000) com uso de nitrato de prata, confirmam que as duas substâncias quando adicionados ao meio de cultura atuam como potentes inibidores da ação do etileno, assim como, sua incorporação produziu efeitos significativos sobre o crescimento de plantas *in vitro* de mandioca. Nos dois estudos foi observado que as cultivares usadas teve diferentes respostas a incorporação destes inibidores no meio de cultura, confirmando a especificidade citada anteriormente e a necessidade de estudos dirigidos.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito de reguladores osmóticos, como o manitol e o sorbitol isolados ou em combinação com a sacarose sobre a redução do metabolismo de plantas de mandioca *in vitro* com vistas à conservação *in vitro* de germoplasma.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetal da Embrapa Mandioca e Fruticultura, localizada no município de Cruz das Almas – BA.

Material vegetal

Para a realização deste trabalho foi selecionada a cultivar Aipim Brasil (BGM 1660), com base na facilidade de multiplicação *in vitro*, usada para diferentes finalidades e cultivados em diferentes regiões do Brasil.

Introdução de material

Manivas provenientes de plantas adultas foram plantadas em vasos de polietileno contendo uma mistura do substrato Plantmax[®] + fibra de coco (2:1). Após 21 dias de plantio, coletou-se a região apical dos brotos emergidos das manivas medindo 2,0 cm de comprimento, colocando-os em recipiente contendo água destilada. O processo de desinfestação foi realizado em câmara de fluxo, laminar onde brotos foram desinfetados em álcool a 50% por três minutos e hipoclorito de sódio a 0,25% por três minutos, seguido da tripla lavagem em água

destilada e autoclavada. Após esse processo, realizou-se a retirada dos meristemas com o auxílio de microscópio estereoscópio, bisturi e pinça. (Anexo 1).

Os meristemas foram inoculados em meio de cultura “4E”, contendo os sais do MS (MURASHIGE; SKOOG,1962), suplementado com 1 mg.L^{-1} de tiamina, 100 mg.L^{-1} de inositol, $0,01 \text{ mg.L}^{-1}$ de ANA (ácido naftalenoacético), $0,04 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP (benzilaminopurina), $0,05 \text{ mg.L}^{-1}$ de GA_3 , (ácido giberélico), 20 mg.L^{-1} de sacarose, gelificado com $2,4 \text{ mg.L}^{-1}$ de Phytigel[®] e pH ajustado em 5,8. A incubação foi realizada em câmara de crescimento sob temperatura de 27 ± 1 °C, fotoperíodo de 16 horas e densidade de fluxo de fótons de $30 \mu\text{mol.m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ por 30 dias (Estabelecimento).

Multiplicação *in vitro* de plantas

A etapa de multiplicação foi realizada em três subcultivos, utilizando-se como explante, microestacas de aproximadamente 1,2 cm, com uma gema apical e/ou uma gema lateral. O primeiro subcultivo foi realizado após 60 dias do estabelecimento e os outros em intervalos de 60 dias.

Conservação *in vitro*

Âpices caulinares das plantas obtidas na etapa anterior foram inoculados no meio de cultura em tubos de ensaio de 25 mm x 150 mm, tapados com plásticos PVC e incubados em sala de conservação, onde permaneceram sob condições de temperatura de 21 ± 1 °C, intensidade de fluxo de fótons de $22 \mu\text{mol.m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 12 horas. O meio básico utilizado foi o “8S” desenvolvido no Centro Internacional de Agricultura Tropical – CIAT, Cali, Colômbia, (CIAT, 1984) e constituído por sais minerais e vitaminas do “MS” (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com $0,01 \text{ mg.L}^{-1}$ de ANA + $0,02 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP + $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ AG_3 , gelificada com $2,4 \text{ g.L}^{-1}$ de Phytigel[®], pH ajustado em 5,8, contudo houve também suplementação de sacarose, manitol e sorbitol no meio de cultura que foi feita em dois experimentos separados.

No experimento 1, testou-se duas concentrações de sacarose (0 e 20 g.L^{-1}) com três concentrações de manitol (0, 5 e 10 g.L^{-1}) e no experimento 2 combinou-

se as mesmas concentrações de sacarose do experimento 1 com (0, 5 e 10 g.L⁻¹) de sorbitol.

Avaliações

As avaliações foram realizadas após doze meses de estabelecimento considerando as seguintes variáveis: altura de plantas (cm), número de microestacas, número de folhas verdes e número de folhas senescentes.

Delineamento experimental

O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial (2 x 3), duas concentrações de sacarose e três concentrações de manitol e sorbitol, seis tratamentos e 20 repetições, sendo cada parcela experimental representada por um tubo contendo uma planta. Para homogeneizar a variância, fez-se a transformação de dados usando a fórmula $\sqrt{y + 0.5}$.

Para a comparação de médias foi empregado o teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando o programa estatístico SAS, Statistical Analysis System (SAS Institute IN, 2000).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Experimento 1

A Tabela 1 mostra o resumo da análise de variância onde se pode observar que os tanto os fatores isolados assim com a interação entre esses promoveu efeitos significativos em todas as variáveis estudadas.

Tabela 1. Resumo da análise de variância para as variáveis altura de planta (AP) (CM), número de microestacas (NM), número de folhas verdes (NFV) e número de folhas senescentes (NFS) de plantas de mandioca em função de diferentes concentrações de sacarose e manitol.

FV	GL	Quadrados médios			
		AP	NM	NFV	NFS
Sacarose	1	20,906*	10,868*	1,534*	3,038*
Manitol	2	8,816*	5,236*	1,145*	1,912*
Sacarose x Manitol	2	6,145*	4,178*	4,435*	0,834*
Resíduo	64				
CV (%)		19,42	18,49	26,40	14,32

* = Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

Os resultados da análise de variância Tabela 2, mostram que a ausência de sacarose não causou diferenças significativas em todas as variáveis analisadas neste trabalho independentemente da concentração de manitol usada, entretanto, a adição de 20 g.L⁻¹ de sacarose promoveu efeitos significativos em todas as variáveis. Por outro lado, pode se observar na mesma tabela que os melhores resultados foram obtidos na concentração de 20 g.L⁻¹ sem adição de sacarose em todas as variáveis analisadas. Efeito significativo foi observado na comparação dos dois níveis de sacarose onde se destaca a superioridade do tratamento acrescido a 20 g.L⁻¹ de sacarose quando comparado com o tratamento sem adição de sacarose em todas as variáveis com exceção do tratamento acrescido a 10 g.L⁻¹ de manitol onde não se observou diferenças significativas.

O efeito retardante é ainda mais marcante em presença da sacarose. É possível observar que na ausência de sacarose não há diferenças estatísticas entre as doses de manitol para todas as variáveis. Quando em presença de sacarose, o aumento da concentração de manitol induz de forma significativa o efeito redutor deste açúcar, provavelmente pelo stress causado pelos dois açúcares em combinação.

Tabela 2. Resultado de ANAVA das variáveis alturas de plantas (AP) (cm), número de microestacas (NM), número de folhas verdes (NFV) e número folhas mortas (NFS).

Manitol (g.L ⁻¹)	Sacarose (g.l ⁻¹)							
	0		20		0		20	
	AP	NM	NFV	NFS	AP	NM	NFV	NFS
0	2,26aB	11,4aA	1,35aB	7,11aA	1,20aB	4,55aA	4,35aB	6,72aA
5	1,94aB	4,60bA	1,16aB	2,54bA	2,94aB	3,63bA	3,33aB	5,45aA
10	1,49aA	2,55cA	1,00aA	1,35cA	1,33aA	1,64cA	3,06aA	3,41bA
CV (%)	19,42		18,49		26,40		22,92	
Média	4,07		2,44		1,7		4,36	

Médias seguidas de mesma letra minúscula nas colunas e maiúscula nas linhas não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

A comparação destas médias com os tratamentos em presença de manitol, independente da ausência ou presença de sacarose, deixa evidente o efeito inibidor de crescimento causado pela adição deste agente osmótico ao meio de cultura. Segundo KARTHA (1981), o fato se explica pela diminuição da capacidade de absorção de água e nutrientes devido ao aumento do potencial hídrico.

O efeito retardante do uso do manitol em meios de cultura para a conservação *in vitro* já vem sendo registrado para várias culturas, entretanto as taxas de sobrevivência são consideradas ainda baixas, como no caso da batata (FORTES; PEREIRA, 2001) em que apenas 37% das plantas sobreviveram após nove meses de conservação em meio de cultura com adição de 2 g.L⁻¹ manitol em 27°C de temperatura, inviabilizando, desta forma uma conservação segura a partir deste tratamento.

Da mesma forma fica evidente a importância da sacarose para o desenvolvimento das plantas, haja vista os resultados obtidos nos tratamentos em que esta fonte de carbono se encontra ausente.

Segundo GRATTAPAGLIA; MACHADO (1998), a sacarose é a fonte de carbono mais utilizada nos protocolos de cultivo *in vitro*, sendo importante

considerada a melhor fonte para a diferenciação celular e o desenvolvimento das plantas cultivadas *in vitro*.

Em bromeliáceas do gênero *Aechmea*, MOREIRA (2008) testou o uso de sacarose e manitol no meio de cultura visando a conservação *in vitro* de duas espécies, com resultados satisfatórios a partir do uso de manitol, ainda que registre o efeito residual deste agente osmótico na posterior regeneração e multiplicação das plantas conservadas.

Em cana de açúcar, LEMOS et al. (2002) também avaliaram o uso da sacarose e de duas fontes de carbono alcoóis, (manitol e sorbitol). Os resultados foram similares aos encontrados neste trabalho, e de acordo com os autores, muito provavelmente, devido à incapacidade dessa espécie de metabolizar este tipo de açúcar, tornando-o mesmo tóxico às plantas. Os autores obtiveram os melhores resultados para a conservação de cana reduzindo a temperatura de incubação para 16 °C.

LATA (1991), em trabalho realizado com *Podophyllum peltatum* para a conservação *in vitro* desta espécie e observaram de manitol e sorbitol efeitos nocivos com ambos os agentes osmóticos, obtendo êxito apenas com a redução da temperatura para 18 °C.

Em plantas germinadas *in vitro* de mangabeira, SANTOS (2010), registrou a viabilidade de conservar por um período de 180 dias este material, a partir da adição de 15 e 20 g.L⁻¹ de manitol ao meio de cultura.

Ainda que um dos objetivos para otimizar a conservação *in vitro* seja a redução do metabolismo das plantas para retardar seu crescimento, os resultados obtidos neste experimento apontam a inviabilidade do uso de manitol para esta variedade, considerando, principalmente o reduzido número de folhas verdes (NFV) e de microestacas (NM). Após um ano de cultivo, plantas com estas características terão muito poucas chances de serem regeneradas e aclimatizadas.

Vale destacar também, que a presença do manitol, pelo menos na concentração de 5 g.L⁻¹, não impediu a senescência das folhas, quando comparado ao tratamento com sacarose. Esse aspecto precisa ser considerado na escolha do melhor tratamento. A maior concentração de manitol (10 g.L⁻¹) induziu menor senescência foliar, provavelmente, devido ao baixo número de microestacas e folhas verdes que este tratamento propiciou. As menores médias

para todas as variáveis foram obtidas no meio contendo 10 g.L⁻¹ de manitol e 20 g.L⁻¹ de sacarose, confirmando que com o aumento da concentração do agente osmótico, aumenta também seu efeito deletério induzindo o efeito redutor da sacarose. Efeitos nocivos ou de crescimento nulo do manitol foram descritos por LEMOS; BAKER (1998), em internós de *Annona muricata* cultivados *in vitro*.

O manitol tem sido comumente utilizado na cultura de tecidos, por seu efeito osmótico, para simular condições de déficit hídrico porque é um composto quimicamente inerte e não tóxico (THORPE et al., 2008), sendo essa sua importância para a conservação *in vitro*.

Esse efeito, entretanto, ainda que reduza o metabolismo das plantas conservadas devido ao déficit hídrico, pode causar um elevado estresse, além do desejável para a integridade das plantas conservadas. Em vista disso o ajuste de uma concentração ideal precisa considerar a manutenção da capacidade regenerativa das plantas.

Na Figura 1 pode se observar as plantas obtidas a partir dos tratamentos realizados. Vale destacar a formação de raízes apenas nos tratamentos com 20 g.L⁻¹ de sacarose. A presença de raízes é uma variável importante na conservação *in vitro* de mandioca, visto que sinaliza o bom desenvolvimento da planta e uma garantia em caso de aclimatização direta da planta conservada. Esse aspecto deve ser considerado para o intercâmbio de germoplasma a partir de plantas conservadas *in vitro*.

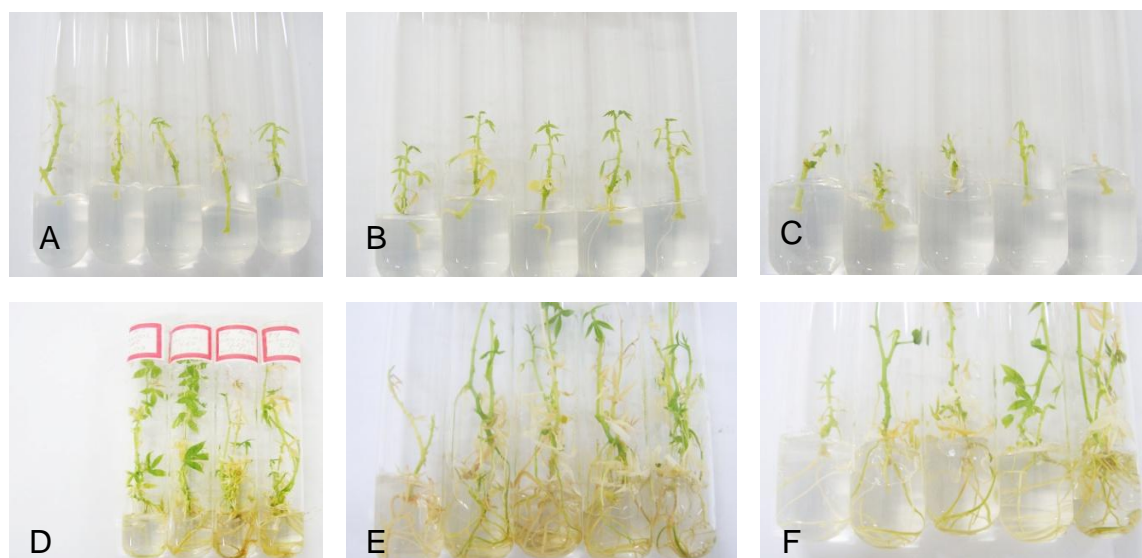


Figura 1. Plantas de mandioca oriunda de diferentes tratamentos após 12 meses de conservação *in vitro*: (A) 0 g.L⁻¹ sacarose + 0 g.L⁻¹ de manitol; (B) 0 g.L⁻¹ de sacarose + 5 g.L⁻¹ de manitol; (C) 0 g.L⁻¹ de sacarose + 10 g.L⁻¹ de manitol; (D) 20 g.L⁻¹ de sacarose + 0 g.L⁻¹ de manitol; (E) 20 g.L⁻¹ de sacarose + 5 g.L⁻¹ de manitol; (F) 20 g.L⁻¹ + 10 g.L⁻¹ de manitol.

Experimento 2

A análise de variância (Tabela 3) indicou que houve efeito significativo da interação sacarose x sorbitol para as variáveis altura da planta (cm) e número de microestacas e efeito não significativo para as variáveis número de folhas verdes e de folhas senescentes.

Tabela 3. Resumo da análise de variância para as variáveis alturas de planta (AP), número de microestacas (NM), número de folhas verdes (NFV) e número de folhas senescentes (NFS) de plantas de mandioca após 12 meses de conservação.

FV	GL	Quadrados médios			
		AP	NM	NFV	NFS
Sacarose	1	8,139*	4,745*	3,422*	3,360*
Sorbitol	2	0,446 ^{ns}	0,545 ^{ns}	2,024*	6,275*
Sacarose x sorbitol	2	1,412*	0,203*	0,158 ^{ns}	5,539 ^{ns}
Resíduo	64				
CV (%)		27,24	20,09	18,52	33,55

* = Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F; ns= não significativo a 5% de probabilidade.

Os resultados apresentados na (Tabela 4), mostram que ausência de sacarose não causou efeitos significativos nas variáveis altura da planta e número de microestacas independentemente do nível de sorbitol usada, entretanto, os tratamentos acrescido a 20 g.L⁻¹ promoveu efeitos significativos nas duas variáveis. A semelhança do que foi observado no experimento com manitol, a concentração de 5 g.L⁻¹, promoveu resultados estatisticamente iguais aos que foram obtidos com apenas presença de sacarose ao meio de cultivo para as duas variáveis, não se identificando efeitos deletérios ou tóxicos, como os que foram observados com o manitol, ainda que os valores absolutos encontrados tenham sido mais baixos que o tratamento com apenas sacarose.

Tabela 4. Médias da altura de planta e número de microestacas de plantas de mandioca em função de concentração de sacarose e sorbitol conservada por 12 meses.

Sorbitol (g.L ⁻¹)	Sacarose (g.L ⁻¹)			
	0		20	
	AP (cm)		NM	
0	2,44 aB	8,94 aA	1,85 aB	6,00 aA
5	2,53 aB	6,81 aA	1,76 aB	4,50 aA
10	1,50 aA	2,82 bA	1,75 aA	1,00 bA

Médias seguidas de mesma letra minúscula nas colunas e maiúscula nas linhas não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade

Igualmente como foi observado com o manitol, esses dois tratamentos promoveram a formação de raízes, enquanto o uso de 10 g.L⁻¹ de sorbitol, não apenas foi bastante tóxico para as plantas, como inibiu totalmente a formação de um sistema radicular (Figura 2).

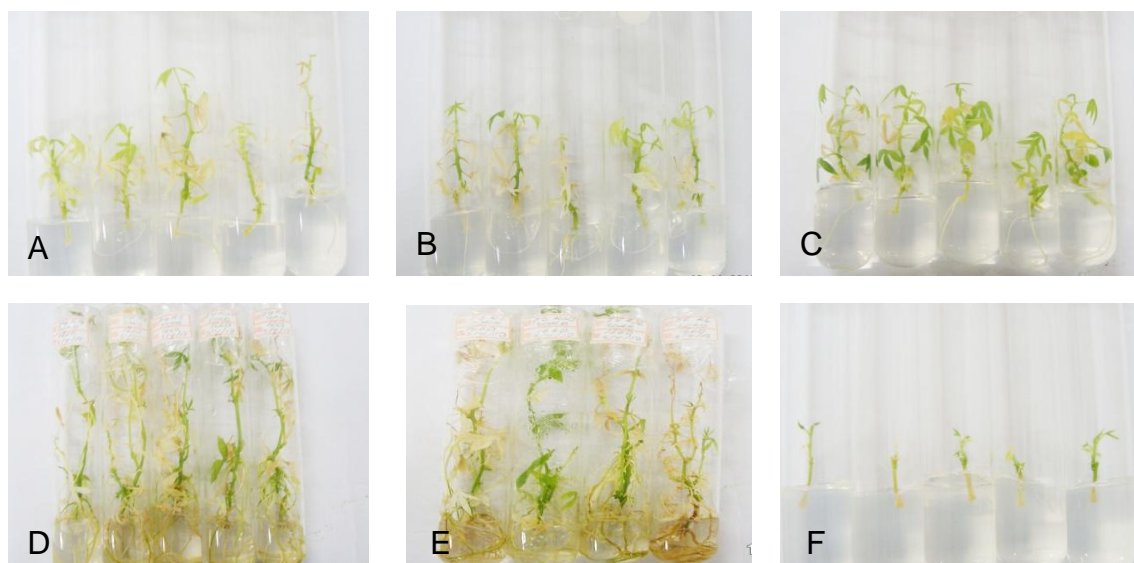


Figura 2. Plantas de mandioca oriunda de diferentes tratamentos após 12 meses de conservação *in vitro*: (A) 0 g.L⁻¹ sacarose + 0 g.L⁻¹ de sorbitol; (B) 0 g.L⁻¹ de sacarose + 5 g.L⁻¹ de sorbitol; (C) 0 g.L⁻¹ de sacarose + 10 g.L⁻¹ de sorbitol; (D) 20 g.L⁻¹ de sacarose + 0 g.L⁻¹ de sorbitol; (E) 20 g.L⁻¹ de sacarose + 5 g.L⁻¹ de sorbitol; (F) 20 g.L⁻¹ + 10 g.L⁻¹ de sorbitol.

Não houve efeito significativo da interação sacarose x sorbitol para a variável número de folhas verdes e número de folhas senescentes, porém houve um efeito significativo de forma isolada. O efeito da sacarose, por sua vez mostrou menos folhas verdes e mais folhas senescentes, o que, provavelmente aconteceu por ser o tratamento que promoveu maior crescimento, com metabolismo mais acelerado.

De forma geral, tanto para o experimento 1, quanto para o experimento 2 observou-se que a ausência de sacarose influenciou fortemente no desenvolvimento das plantas conferindo-lhes um aspecto de pouca viabilidade.

Efeito semelhante foi observado quando se usou concentrações altas de ambos os agentes osmóticos, deixando evidente que o estresse hídrico provocado não foi tolerado pelas plantas, interferindo de forma negativa no seu crescimento e desenvolvimento. GARZÓN (1987), testando o efeito da concentração de sacarose e manitol sobre a conservação de seis cultivares da mandioca obteve resultados diferentes aos encontrados neste trabalho, apontando o uso da combinação sacarose/manitol como viável para a conservação *in vitro* das cultivares testadas. Essa diferença nos resultados provavelmente se deu devido às diferenças nas concentrações usadas. Comparando os dois trabalhos, a concentração de manitol usada por Garzón foi marcadamente menor (10 g.L^{-1} de sacarose e 0.50 g.L^{-1} de manitol) conservada a $27 \text{ }^\circ\text{C}$.

Por outro lado, a concentração de 20 g.L^{-1} de sacarose usada em ambos os experimentos promoveu o maior desenvolvimento das plantas. No experimento 1, a associação com o manitol, mesmo na concentração mais baixa reduziu o metabolismo das plantas, enquanto que esse mesmo efeito não foi observado com o sorbitol, evidenciando a diferença de atuação de ambos os açúcares.

De acordo com os resultados observados nos dois experimentos o manitol, para cultivar usada, mostrou-se menos eficiente que o sorbitol, visto que reduz o crescimento das plantas, porém em detrimento da sua viabilidade para propagação.

A eficiência destes agentes osmóticos para a redução do metabolismo celular em cultivos *in vitro* com vistas à conservação de germoplasma tem se mostrado bastante variável a depender da espécie. Como mostrado anteriormente, para *Annona muricata* (LEMOS; BAKER, 1998), cana de açúcar

(LEMOS et al, 2002), batata (LUCAS FORTES; PEREIRA, 2001) e *Podophyllum* (LATA et al., 2010) a redução da temperatura foi mais eficiente que alterações no meio de cultivo, principalmente se considerar o uso de manitol e sorbitol.

Resultados interessantes mostraram a eficiência de ambos os açúcares para bromélias (MOREIRA, 2008), mangaba (SANTOS, 2010) e para *Passiflora* (FARIAS et al., 2006).

Apesar dos resultados negativos obtidos com algumas espécies, o uso de agentes osmóticos continua sendo testado na conservação *in vitro*, como uma das estratégias de redução de metabolismo celular a partir de alterações no meio de cultivo, a fim de se evitar os reguladores vegetais. De acordo com CALDAS et al. (1998), os reguladores vegetais atuam diretamente nas rotas metabólicas das plantas, podendo causar maiores transtornos fisiológicos ou genéticos, o que não ocorre com os agentes osmóticos, pois sua ação está relacionada com a redução do potencial hídrico no meio da cultura (CALDAS et al., 1998).

Neste trabalho os resultados sugerem que, apesar do efeito redutor registrado tanto para o manitol, quanto para o sorbitol, as concentrações usadas são elevadas. Ensaio para avaliar concentrações abaixo de 5 g.L^{-1} devem ser realizado.

CONCLUSÃO

A ausência de sacarose inviabiliza o desenvolvimento das plantas em ambos os experimentos;

A presença do manitol ou sorbitol nos meios com ausência de sacarose não influenciou no desenvolvimento das plantas;

Nos meios com 20 g.L^{-1} de sacarose se observou um efeito sinérgico com ambas as concentrações de manitol ou sorbitol na redução do crescimento: quanto maior a concentração maior o efeito;

A concentração de 10 g.L^{-1} de ambos os reguladores osmóticos influenciou de forma crítica o desenvolvimento das plantas, não sendo, portanto, recomendada;

O tratamento com 20 g.L⁻¹ de sacarose proporcionou os melhores resultados, permitindo a conservação das plantas por 12 meses.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMARAL, W.; THOMSON, L.; YAUNCHUR, A. Conservation of genetic resource in The natural environment. In: FAO, FLD, IPGRI. **Forest genetic resource conservation and management: overview, concepts and some systematic approach**. Rome: International plant genetic resource Institut, v.1, p.1-4. 2004.

CIAT. Centro Internaciona de Agricultura Tropical. **El cultivo de meristemas para la conservacion de germoplasma de yucca in vitro**. Cali, Colombia: CIAT, 1984, p.40-44.

CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Eds) **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa. p.87-132. 1998.

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

CLEMENT, R.C.; ROCHA, S.F.R.; COLE, D.M.; VIVAN, J,L. Conservação *on farm*. IN: NASS, L.L. (Ed.). **Recursos Genéticos Vegetais**. Capitulo 15. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, p.544. 2007.

DUMET, D. ENGELMANN, F.; CHABRILLANGE, N.; DUVAL, Y.; DEREUDDRE, J. Importance of source of the acquisition of tolerance to dessication and cryopreservation of oil palm somatic embryos. **Cryo-letters**, London, v.5, p.243-250, 1993.

FALEIRO, F.G. Preservação da viabilidade genética de plantas: um grande desafio. **Boletim Pecuária**. <http://www.boletimpecuarias.com.br/artigos/>. Acesso em: 20 de set 2010.

FARIA, G.A.; COSTA, M.A.P. de CARVALHO.; JUNGHANS, T.G. LEDO, C.A. da SILVA.; SOUZA, A. da SILVA. Efeito da sacarose e sorbitol na conservação *in vitro* de passiflora giberti N.E. Brown. **Revista Brasileira Fruticultura**, Jaboticabal, v.2, p.56-64. 2006.

FORTES, G.R. de L.; PEREIRA, J.E.S. Preservação *in vitro* de batata com ácido acetilsalicílico e duas fontes de carboidratos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 36, p.1261-1264. 2001.

GARZÓN, D.I.A. **Efeito de la concentración de sacarose y manitol sobre el crecimiento *in vitro* de seis variedades de yuca, (*Manihot esculenta Crantz*).** 1987. 140f. Dissertação (Universidade Del Valle), Departamento de biologia e química. Cali. Colômbia.

GIACOMELLI, E.J.; TEÓFELO, S.J. Seleção preliminar de alguns cultivares de abacaxizeiro resistentes à fusariose. In: Congresso Brasileiro de fruticultura, 7. Florianópolis, 1983. Anais. Florianópolis, Sociedade Brasileira de fruticultura/Embrapa catrinense de Pesquisa Agropecuária, v. 1, p.145-161, 1982.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Eds). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI: Embrapa-CNPH, v.1, p.184-215. 1998,

JESUS, A. de S.; LEDO, A. da S.; LEDO, C.A. da S. Conservação *in vitro* de ma Gabeira da região Nordeste do Brasil. **Ciência Rural**, v14, p. 8-12, 2010.

KARTHA, K.K. Genepool conservatin through tissue culture. In: **proceedings...** Costed Symposium on tissue culture of economically important plants (A.N. Rao, (ed.). Singapore, 1981, p. 213-218.

LATA, H. *In vitro* conservation of tropical plant germoplasm, a review. *Euphytica*, **Netherlands Journal of Plant Breeding**, Mississippi, v. 57, p.227-243, 1991.

LEMOS, E.E.P.; FERREIRA, M.S.; ALENCAR, L.M.C.; RAMALHO NETO, C.E.; ALBUQUERQUE, M.M. Conservação *in vitro* de germoplasma de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.37, p.54, 2002.

LEMOS, E.E.P.; BAKER, D. Shoot regeneration in response to carbon source on intermodal explants of *Annona muricata* L. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v.25, p.105-112, 1998.

MABANZA, J. MINGUI, J.M. Amélioration des cultivars Africains de manioc. In: **Proceedings of the 6th ISTRC-AB symposium**. Lilongwe, Malawe 22-28 october 1998. (Akoroda and Ekanayake, (Eds). 1998.

MABANZA, J. JORNARD, R. La multiplication des clones de manioc a partir d'apex isoles *in vitro*. **C.R. Acad. Sci.** Paris. v.2, p.839-842, 1981.

MADAKADZE, R.M.; SENARATNA, T. Effect of growth regulators on maturation of geranium (*Pelargonium x hortorum*) somatic embryos. **Plant Growth Regulation**, v.30, p.34-45, 2000.

MAFLA, G.; ROA, J.C.; GUEVARA, C.L. Advances on the *in vitro* growth control of cassava, using silver nitrate. In: International Scientific Meeting Cassava Biotechnology. Salvador. **Proceedings...** Brasilia, DF: Embrapa- Cenargen, 2000. 438-440p.

MONTARROYOS, A.V. **Conservação *in vitro* de variedades de mandioca com uso do ácido acetilsalicílico**. 1995. 98f. Dissertação (Mestrado em agronomia área de concentração em fitotecnia). Faculdade de Agronomia, Universidade da Bahia. Cruz das Almas, 1995.

MOREIRA, M.J.S. **Conservação *in vitro* de bromeliáceas**. 2008. 68f. (Dissertação Mestrado) Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas.

MURASSHIGE, T.; SKOOG, F. A revised médium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiology Plantarum**, Copenhagen, v.15, p.37-497, 1962.

PADUA, J.G. **Rede Nacional de Recursos Genéticos Vegetais-PC12-** conservação de coleções vegetais a médio e longo prazos. <<http://plataformarg.cenargen.embrapa.br/redevegetal/> acessado em 18 de se. 2010.

ROCA, W.M.; ARIAS, D.I.; CHAVES, R. Efect of various factors on minimal growth in tissue culture storage of cassava germoplasm. **VI Symposium International Society of Root Crops**. Lima. Perú. 1983.

ROCA, W.M.; ARIAS, D.I.; CHAVES, R. Métodos de conservación *in vitro* del germoplasma. In: Roca, W.M.; Mroginski, L.A. (Ed.). **Cultivo de tejidos en la agricultura, fundamentos y aplicaciones**. CIAT, Cali, Colombia. 1991. 697-712p.

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

SANTOS, M. da C. Conservação *in vitro* de mangabeira nativa da região nordeste: disponível em: http://www.ufs.br/bicen//tde_busca/arquivo.php?codArquivo=386. Acessado em 10 de dez. 2010.

SAS INSTITUTE INC. SAS/STAT. User's guide, vol. I, II and III. Carry NC: SAS Institute, INC., 2000.

SCARIOT, A.O.; SEVILLA, A.C. Conservação *in situ* de Recursos Genéticos Vegetais. In: NASS, L.L. (Ed.). **Recursos Genéticos Vegetais**. Brasília, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. 2007, cap.14.

SILVA, S.O.; SHEPHERD, K.; DANTAS, J.L.L.; SOUZA, A.S.; CARNEIRO, M.S. Germoplasma. In: Alves, E.J. (Org.). **A cultura da banana: aspectos técnicos, socioeconomia e agroindústrias**. Brasília: Embrapa-CNPMPF, 1997, p.61-84.

SOUZA, A. da S.; JUNGHANS, T.G.; SOUZA, F.V.D.; SEREJO, J.A.S; NETO, H. P.; MENESES, M.C.; SILVEIRA, D.G.; SANTOS, V. da S. Micropropagação da mandioca. In: **Aspetos Práticos da Micropropagação de Plantas**. 1ª Ed 2009. Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, Cruz das Almas-BA, p.324-331, 2009.

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. das D.; FARIAS, A.R.N.; MATTOS, P.L.P. de; FUKUDA, W.M.G. (Eds.). **Aspectos socioeconômicos e agrônômicos da mandioca**. Cruz das Almas –BA: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2006, p. 364-432.

SOUZA, A. da S.; SOUZA, F.V.D.; SANTOS-SEREJO, J. A. dos; JUNGHANS, T. G.; SILVA NETO, H.P. Micropropagação da mandioca mediante ápices caulinares e segmentos nodais. **Circular Técnica 88**. Embrapa. Cruz das Almas, n.11, p. 2008.

SOUZA, M.J. **Conservação *in vitro* de bromeliáceas**. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal do recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, 2008. 61f.

STEEL, R.G.D.; TORRIE, J.H. **Principles and procedures of statistcs**. McGraw. Hill. New York. 1960.

THORPE, T.; STASOLLA, C.; YEUNG, E.C. The components of plant Tissue Culture Media II: Organic additions and pH Effects, and Support Systems. In: GEORGE, E.F.; HALL, M.A.; DE KLERK, G.J. (Eds.). **Plant propagation by Tissue Culture**, v.1, 3rd ed – The Background, Springer, Netherlands, p.115-155. 2008.

UNNIKRISHNAN, M.; SHEELA, M.N. Studies on midia, explants and incubation conditions for in vitro conservation of cassava germoplasm. In: CARVALHO, L.J. C. B.; THRO, A.M.; VILARINHOS, A.D. Cassava biotechnology. IV International Scientific Meeting – CBN, 1998, Brasília. Embrapa Recursos genéticos e Biotecnologia. **Proceedings...** CENARGEN, 2000. p.425 – 430.

WITHERS, L.A.; WILLIAMS J.T. Conservação *in vitro* de recursos genéticos de plantas. (Eds.). In: TORRES, C.A.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformações geneticas de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI: Embrapa, CNPH, v.1, p.298-305.1998.

WITHERS, L.A. **Cryopreservation and storage of germoplasm**. In: Dixon, R.A. (Ed). *Plant cell culture: a practical approach*: New York. Press, p.169-191, 1985.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estabelecimento de bancos de germoplasma *in vitro* vem sendo considerado como uma estratégia alternativa na conservação de germoplasma de espécies cujas sementes são recalcitrantes ou aquelas de propagação vegetativa.

Em relação a mandioca, apesar de possuir sementes ortodoxas, sua propagação é realizada preferencialmente de forma vegetativa, em vista da elevada heterozigosidade de suas sementes, dificultando a fixação de características desejáveis.

O estabelecimento de bancos *in vitro* para esta espécie é estratégico, não apenas pela importância de se manter uma duplicata de segurança de um cultivo tão importante para o Brasil e países africanos, mas para garantir o intercâmbio de germoplasma e atender ao Tratado Internacional de Recursos Genéticos para Alimentação e Agricultura – FAO.

Este tipo de conservação, entretanto, apesar das vantagens que apresenta, necessita ajustes no sentido de reduzir as taxas de crescimento das plantas *in vitro*, que podem tornar o manejo de grandes coleções complexo e laborioso, além dos custos elevados.

No presente trabalho buscou-se adequar condições de crescimento mínimo a partir do uso de reguladores osmóticos como sacarose, manitol e sorbitol, já que, este recurso para retardar crescimento, incide sobre o meio de cultura, causando um estresse osmótico e conseqüentemente um estresse sobre a planta, afetando diretamente seu metabolismo.

A abordagem feita no capítulo 1 baseou-se na importância e no papel que a sacarose tem no desenvolvimento de plantas *in vitro* e que em função disso, trabalhar com suas concentrações pode ser uma alternativa para aumentar ou diminuir o crescimento de plantas conservadas sob esta condição.

Os resultados encontrados neste capítulo mostraram que efetivamente a ausência de sacarose, em lugar de reduzir o metabolismo das plantas, compromete seu desenvolvimento, tornando seu posterior resgate inviável. Por outro lado, mostrou que concentrações muito elevadas como 80 g.L^{-1} causam um estresse elevado e funcionam como um agente tóxico e causam resultados semelhantes aos que foram obtidos na ausência de sacarose, ainda que por motivos diferentes.

Das concentrações testadas a de 40 g.L^{-1} acelerou o crescimento de tal forma, que para fins de conservação não se mostrou interessante, já que, como conseqüência disto, o número de folhas verdes é menor do que nas concentrações menores, assim como apresentou mais folhas senescentes. A aceleração do crescimento, leva a um esgotamento do meio de cultura acelerando também o processo de envelhecimento da planta.

Os resultados deste capítulo são claros, no sentido de que a redução nas concentrações de sacarose para 20 g.L^{-1} ou 10 g.L^{-1} é mais efetiva na redução do metabolismo das plantas pela diminuição de carbono disponível. Outro aspecto observado foi o diferente comportamento entre os acessos avaliados.

Já no capítulo 2 buscou-se avaliar outros agentes osmorreguladores, como manitol e sorbitol em combinação ou não com sacarose na redução das taxas de crescimento de uma cultivar de mandioca.

O efeito redutor de ambos os açúcares ficou evidente, mas também seus efeitos deletérios nas plantas conservadas, pelo menos nas conservações usadas neste trabalho. Confirma-se também a importância da sacarose como fonte preferencial de carbono para plantas de mandioca *in vitro*, já que a semelhança dos resultados obtidos no capítulo 1, a ausência da mesma praticamente inviabiliza a conservação das plantas.

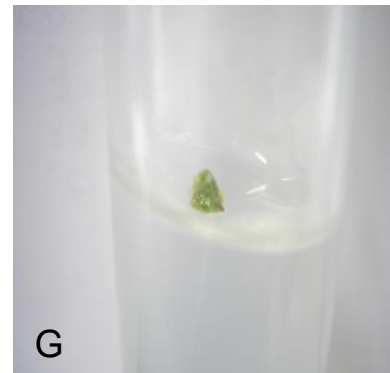
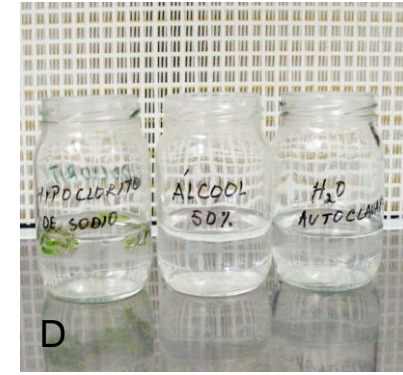
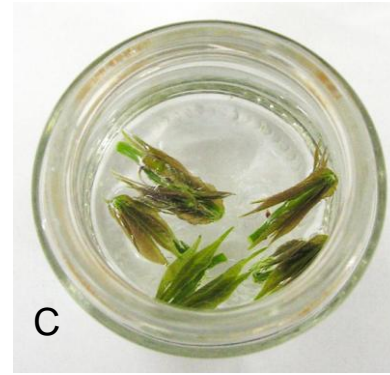
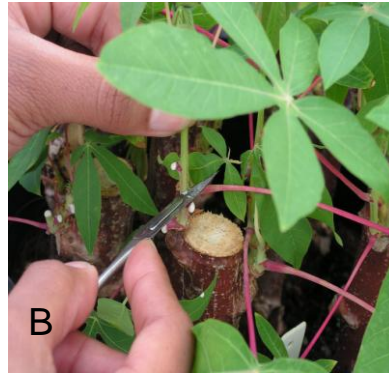
As diferenças entre os dois açúcares alcolizados foi evidente, destacando que o manitol para a cultivar estudada apresentou um efeito redutor mais drástico que o sorbitol, pois esta na concentração de 5 g.L^{-1} combinada com 20 g.L^{-1} de sacarose promoveu resultados estatisticamente iguais aos que foram obtidos com apenas sacarose no meio de cultura, entretanto, não justificando seu uso.

Finalmente, é possível concluir que as concentrações de manitol e sorbitol testados neste trabalho, não proporcionou um balanço adequado no meio de

cultura para a conservação *in vitro* de mandioca, ainda que seu efeito redutor foi registrado, dessa forma, os resultados encontrados neste trabalho sugerem a necessidade de se trabalhar com esses açúcares em concentrações baixas a fim de ajustar uma concentração osmótica do meio de cultura que permita um crescimento mínimo de plantas conservadas, sem no entanto, comprometer sua viabilidade.

Os resultados mostraram também, que a redução nas concentrações de sacarose normalmente usada no meio para mandioca, pode ser uma alternativa eficiente para a conservação de cultivares de mandioca a médio prazo.

ANEXOS



Anexo 1: Etapas de introdução, estabelecimento e multiplicação de material de propagação

(A) manivas em vasos na casa de vegetação, (B) Coleta dos brotos, (C) ápices colocadas em água destilada, (D) desinfestação em álcool 50%, hipoclorito de sódio a 0,25% e água autoclavada, (F) microscópio estereoscópico para retirada de meristemas (F) retirada de meristemas com ajuda de bisturi e pinça (G) estabelecimento (H) multiplicação