

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE DOUTORADO**

**FITORREGULADORES E NITRATO DE PRATA NA CONSERVAÇÃO
IN VITRO DE ESPÉCIES SILVESTRES DO GÊNERO *Manihot***

JUCIENY FERREIRA DE SÁ

**CRUZ DAS ALMAS - BAHIA
MARÇO - 2022**

FITORREGULADORES E NITRATO DE PRATA NA CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DE ESPÉCIES SILVESTRES DO GÊNERO *Manihot*

JUCIENY FERREIRA DE SÁ

Licenciatura em Ciências Biológicas
Universidade de Pernambuco, 2016

Tese submetida ao Colegiado de Curso de Pós-Graduação em Ciências Agrárias da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, como requisito parcial para obtenção do Grau de Doutor em Ciências Agrárias, Área de Concentração: Fitotecnia.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto da Silva Ledo

Coorientador: Dr. Alfredo Augusto Cunha Alves

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
DOUTORADO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CRUZ DAS ALMAS - BAHIA – 2022

FICHA CATALOGRÁFICA

S111f	<p>Sá, Jucieny Ferreira de. Fitorreguladores e nitrato de prata na conservação in vitro de espécies silvestres do gênero Manihot / Jucieny Ferreira de Sá._ Cruz das Almas, BA, 2021. 110f.; il.</p> <p>Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, Doutorado em Ciências Agrárias.</p> <p>Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto da Silva Ledo. Coorientador: Dr. Alfredo Augusto Cunha Alves.</p> <p>1.Mandioca – Cultivo – Germoplasma vegetal. 2.Mandioca – Melhoramento genético. I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II.Título.</p> <p>CDD: 633.682</p>
-------	--

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE DOUTORADO**

**FITORREGULADORES E NITRATO DE PRATA NA CONSERVAÇÃO
IN VITRO DE ESPÉCIES SILVESTRES DO GÊNERO *Manihot***

Comissão Examinadora da Defesa de Tese de
Jucieny Ferreira de Sá

Realizada em 28 de março de 2022

Dr. Carlos Alberto da Silva Ledo
Embrapa Mandioca e Fruticultura
Examinador intero (Orientador)

Prof^a. Dr^a. Andréia Amariz
Universidade de Pernambuco
Examinador Externo

Dr^a. Karen Cristina Fialho dos Santos
Embrapa Mandioca e Fruticultura
Examinador Externo

Dr^a. Karine da Silva Simões
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
Examinador Externo

Dr^a. Maria Inês de Souza Mendes
Universidade Estadual de Santa Cruz
Examinador Externo

DEDICATÓRIA

O Deus Pai misericordioso pelo dom da vida, por toda sustentação e força do meu ser, que permitiu a consumação de mais uma etapa gloriosa.

Por esta benção, dedico a vós.

AGRADECIMENTOS

Direciono meus agradecimentos a Deus por sua infinita bondade, misericórdia e presença constante em minha vida.

Agradeço aos meus pais, Juraci e Ernestina, por todo amor, apoio e estímulos que sempre me transmitiram para estudar e gostar de aprender. A toda minha família, especialmente minhas tias (Nilda e Cremilda) e irmã (Juciely).

Ao meu orientador e professor Dr. Carlos Alberto da Silva Ledo, pela orientação, atenção, paciência e por ter contribuído grandemente na minha formação profissional. Também sou grata por ter tido a honra de ser sua aluna, pois todo o meu saber estatístico devo a você e digo-lhe com toda certeza que sua postura e didática docente são admiráveis.

Quero agradecer com especial carinho ao Dr. Antônio da Silva Souza, que sempre teve disponibilidade para ouvir, esclarecer minhas dúvidas/curiosidades, e que com toda sua preocupação, sabedoria e humildade, soube dar a este percurso um toque de tranquilidade. Todos os desafios que colocou, as palavras que corrigiu e até mesmo os desabafos que ouviu foram fundamentais para que eu “prosperasse” com liberdade, consciência e conhecimento. Obrigada por sua amizade e comprometimento em me ajudar sempre que foi necessário.

Agradeço a toda equipe do Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Mandioca e Fruticultura: Karen, Honorato, Tânia, Maria Inês, Denise, Marcus, Jorge, Camila e Leila que me ajudaram no desenvolvimento dos trabalhos.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos durante o curso. À UFRB, pelo apoio institucional. À Embrapa Mandioca e Fruticultura, pela disponibilização da infraestrutura necessária para realização dos trabalhos.

É com grande afeto que agradeço a todos os meus amigos que estiveram comigo ao longo dessa etapa e que demonstraram cuidado, paciência, carinho, companheirismo e apoio emocional. Vocês me fortaleceram nos momentos mais difíceis!

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

REFERENCIAL TEÓRICO.....01

Artigo 1

ÁCIDO ABCÍSIKO E CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DE ESPÉCIES SILVESTRES DE
Manihot.....25

Artigo 2

PACLOBUTRAZOL NA CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DE ESPÉCIES SILVESTRES DO
GÊNERO *Manihot*.....48

Artigo 3

NITRATO DE PRATA NA CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DE ESPÉCIES SILVESTRES
DO GÊNERO *Manihot*.....74

FITORREGULADORES E NITRATO DE PRATA NA CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DE ESPÉCIES SILVESTRES DO GÊNERO *Manihot*

Autor: Jucieny Ferreira de Sá
Orientador: Carlos Alberto da Silva Ledo

RESUMO: A conservação das espécies silvestres do gênero *Manihot* em Bancos Ativos de Germoplasma é indispensável, pois apresentam genes com características de resistência e tolerância a diversos fatores bióticos e abióticos, e ao serem utilizadas nos programas de melhoramento genético da mandioca possibilitam o desenvolvimento de variedades mais produtivas e menos susceptíveis a problemas que acometem essa cultura. Nesse contexto, a conservação *in vitro*, em condições de crescimento mínimo, é uma alternativa que, quando bem ajustada e associada ao sistema de propagação da planta, favorece a manutenção de uma cópia genética, preservando suas características após o período de armazenamento e reduz a possibilidade de perdas de acessos, permitindo a manutenção de um maior número de indivíduos ocupando uma pequena área, além de facilitar o intercâmbio do germoplasma vegetal. Portanto, este trabalho teve como objetivo contribuir para a otimização de protocolos de conservação *in vitro* de germoplasma, de forma a auxiliar na preservação de espécies silvestres de *Manihot*. Para tal, foram realizados experimentos de conservação *in vitro* no Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Mandioca e Fruticultura. No primeiro capítulo foram estudadas quatro espécies silvestres, *M. pseudoglaziovii*, *M. tristis*, *M. flabellifolia* e *M. chlorosticta*, e o acesso BGM 0868 (Casca Fina) de *M. esculenta*, como testemunha. Utilizou-se o meio de cultura MS 0,01 e cinco doses do ácido abscísico - ABA (0,00 mg L⁻¹; 0,25 mg L⁻¹; 0,50 mg L⁻¹; 0,75 mg L⁻¹ e 1,00 mg L⁻¹). Para o segundo capítulo foram estudadas as espécies *M. flabellifolia*, *M. pseudoglaziovii*, *M. tristis* e *M. caerulescens*, e o BGM 0376 (Peri) de *M. esculenta*, utilizando-se também o meio de cultura MS 0,01 e cinco doses de Paclobutrazol® - PBZ (0,0 mg L⁻¹; 0,10 mg L⁻¹; 0,20 mg L⁻¹; 0,30 mg L⁻¹ e 0,40 mg L⁻¹). No terceiro capítulo, foram estudadas quatro espécies silvestres, *M. pseudoglaziovii*, *M. flabellifolia*, *M. caerulescens*, *M. chlorosticta*, e a cultivar BGM 0540 de *M. esculenta*, utilizando também o meio de cultura MS 0,01 com seis doses de nitrato de prata - AgNO₃ (0,0 mg L⁻¹; 2,5mg L⁻¹; 5,0 mg L⁻¹; 7,5 mg L⁻¹; 10,0 mg L⁻¹

e 12,5 mg L⁻¹). A adição do ácido abscísico favoreceu a redução do crescimento das plantas das espécies *M. pseudoglaziovii*, *M. tristis* e *M. flabellifolia*, porém, não foi possível recomendar uma única dose para a conservação *in vitro* das espécies estudadas considerando-se as variáveis analisadas, durante o período de conservação *in vitro*. Por outro lado, o PBZ provocou alterações morfofisiológicas no crescimento das plantas e as doses entre 0,10 mg L⁻¹ e 0,26 mg L⁻¹ mostraram-se como as mais adequadas para a maioria dos acessos estudados. Com relação a adição do nitrato de prata, as doses entre 7,28 mg L⁻¹ e 8,86 mg L⁻¹ de AgNO₃ foram as mais adequadas para a maioria dos acessos, por terem proporcionado as melhores médias para as variáveis estudadas no período de 180 dias de conservação *in vitro*.

Palavras chave: cultura de tecidos; germoplasma; crescimento mínimo.

FITORREGULATORS AND SILVER NITRATE IN THE *IN VITRO* CONSERVATION OF WILD SPECIES OF THE GENUS *Manihot*

Author: Jucieny Ferreira de Sá
Advisor: Carlos Alberto da Silva Ledo

ABSTRACT: The conservation of wild species of the genus *Manihot* in Active Germplasm Banks is essential, as they present genes with characteristics of resistance and tolerance to several biotic and abiotic factors, and when used in cassava genetic improvement programs, they enable the development of more productive varieties and less susceptible to problems that affect this culture. In this context, *in vitro* conservation, under minimal growth conditions, is an alternative that, when well adjusted and associated with the plant propagation system, favors the maintenance of a genetic copy, preserving its characteristics after the storage period and reducing the possibility of loss of accessions, allowing the maintenance of a greater number of individuals occupying a small area, in addition to facilitating the exchange of plant germplasm. Therefore, this work aimed to contribute to the optimization of *in vitro* germplasm conservation protocols, in order to assist in the preservation of wild species of *Manihot*. To this end, *in vitro* conservation experiments were carried out at the Tissue Culture Laboratory of Embrapa Cassava and Fruticultura. In the first chapter, four wild species were studied, *M. pseudoglaziovii*, *M. tristis*, *M. flabellifolia* and *M. chlorosticta*, and accession BGM 0868 (Thin Bark) of *M. esculenta*, as a control. The culture medium MS 0.01 and five doses of abscisic acid - ABA (0.00 mg L⁻¹; 0.25 mg L⁻¹; 0.50 mg L⁻¹; 0.75 mg L⁻¹ and 1.00 mg L⁻¹). For the second chapter, the species *M. flabellifolia*, *M. pseudoglaziovii*, *M. tristis* and *M. caerulescens*, and the BGM 0376 (Peri) of *M. esculenta* were studied, also using the culture medium MS 0.01 and five doses of Paclobutrazol[®] - PBZ (0.0 mg L⁻¹; 0.10 mg L⁻¹; 0.20 mg L⁻¹; 0.30 mg L⁻¹ and 0.40 mg L⁻¹). In the third chapter, four wild species were studied, *M. pseudoglaziovii*, *M. flabellifolia*, *M. caerulescens*, *M. chlorosticta*, and the cultivar BGM 0540 of *M. esculenta*, also using the culture medium MS 0.01 with six doses of silver nitrate - AgNO₃ (0.0 mg L⁻¹; 2.5 mg L⁻¹; 5.0 mg L⁻¹; 7.5 mg L⁻¹; 10.0 mg L⁻¹ and 12.5 mg L⁻¹). The addition of abscisic acid favored the reduction of plant growth of the species *M. pseudoglaziovii*, *M. tristis* and *M. flabellifolia*, however, it was not possible to recommend a single dose for the *in vitro* conservation of the species studied,

considering the variables analyzed, during the *in vitro* storage period. On the other hand, PBZ caused morphophysiological changes in plant growth and doses between 0.10 mg L⁻¹ and 0.26 mg L⁻¹ proved to be the most adequate for most of the accessions studied. Regarding the addition of silver nitrate, doses between 7.28 mg L⁻¹ and 8.86 mg L⁻¹ of AgNO₃ were the most suitable for most accessions, as they provided the best means for the variables studied in the study period of 180 days of *in vitro* conservation.

Keywords: tissue culture, germplasm; minimal growth.

REFERENCIAL TEÓRICO

O GÊNERO *Manihot*

O gênero *Manihot* é nativo das regiões tropicais, com a principal concentração de espécies no México e no Brasil (ROGERS; APPAN 1973; NASSAR, 1978). Dessas, de acordo com os dados da Flora do Brasil (2020), 104 espécies ocorrem no Brasil, sendo 92 nativas. Ainda em conformidade com Rogers; Appan (1973), o centro de diversidade do gênero *Manihot* situa-se no Brasil, com cerca de 80% de suas espécies apresentando polimorfismo vegetativo, retratando um grande potencial para ser utilizado nos programas de melhoramento genético.

Nassar (2000) reconhece quatro centros da diversidade genética de espécies do gênero *Manihot*: o primeiro é o Brasil central, englobando os estados de Goiás e Minas Gerais, o segundo compreende o Sudoeste do México, o terceiro é o Nordeste do Brasil e o quarto abrange o Oeste do Mato Grosso do Sul e o Nordeste da Bolívia. O Brasil possui, portanto, uma ampla diversidade genética de espécies de *Manihot*, que está distribuída nos seus diferentes ecossistemas. De acordo com Ledo et al. (2010), a maior representatividade de espécies silvestres de *Manihot* encontra-se no bioma Cerrado.

Segundo os dados da Flora do Brasil (2020), na região Nordeste do País ocorrem 33 espécies do gênero *Manihot*, sendo elas: *M. alterniflora* P. Carvalho & M. Martins, *M. anomala* Pohl, *M. baccata* Allem, *M. bellidifolia* P. Carvalho & M. Martins, *M. brachyandra* Pax & K. Hoffm., *M. breviloba* P. Carvalho & M. Martins, *M. caerulescens* Pohl, *M. carthaginensis* (Jacq.) Müll. Arg., *M. compositifolia* Allem, *M. diamantinensis* Allem, *M. dichotoma* Ule, *M. elongata* P. Carvalho & M. Martins, *M. fortalezensis* Nassar, D. G. Ribeiro, Bonfim & P. T. C. Gomes, *M. glaziovii* Müll. Arg., *M. gracilis* Pohl, *M. jacobinensis* Müll. Arg., *M. janiphoides* Müll. Arg., *M. leptophylla* Pax, *M. longiracemosa* P. Carvalho & M. Martins, *M. macrocarpa* P. Carvalho & M. Martins, *M. maracasensis* Ule, *M. pandurata* M. Martins & M. Mend., *M. pohliana* Müll. Arg., *M. pohlii* Wawra, *M. quinquefolia* Pohl, *M. quinquepartita* Huber ex D. J. Rogers & Appan, *M. reflexifolia* P. Carvalho & M. Martins, *M. reniformis* Pohl, *M. tripartita* (Spreng.) Müll. Arg., *M. triphylla* Pohl, *M. tristis* Müll. Arg., *M. weddelliana* Baill e *M. zehntneri* Ule.

A maioria das plantas desse gênero são arbustos, que possuem quantidades diferenciadas de compostos cianogênicos, bastante variáveis em seus órgãos vegetativos, porém uniformes em suas estruturas reprodutivas, apresentando-se monoicas (ROGERS; APPAN, 1973).

Alguns estudos realizados mediante observações de campo apontam que muitas dessas espécies apresentam características que podem ser fonte de genes com grande potencial de utilização. Entre elas, pode-se destacar: *M. dichotoma*, que é resistente à cochonilha da mandioca e que se destaca na elevada produção de raízes; *M. paviaefolia* Pohl, que apresenta tolerância à toxicidade do solo; *M. tripartita*, com resistência ao mosaico africano, possui raízes grandes e consegue se adaptar em períodos de seca; *M. pruinosa* Pohl, com baixo teor de compostos cianogênicos; *M. nana* Müll. Arg., que apresenta baixa estatura e *M. anomala*, que se caracteriza pela capacidade de adaptação em locais encharcados e sombreados (NASSAR, 1978; NASSAR 2003; NASSAR et al., 2004).

Alguns autores citam que a *M. glaziovii* apresenta resistência ao mosaico africano e à cochonilha (JENNINGS, 1976; CHAVARRIAGA et al., 2004), enquanto a *M. pseudoglaziovii* Pax & K. Hoffm. é resistente à bacteriose (CHÁVEZ et al., 1989; BELTRÃO et al., 2015) e, além disso, consegue se adaptar em condições de seca. Já as espécies *M. neusana* Nassar e *M. grahamii* Hook expressam níveis de resistência à broca da haste (CHÁVEZ, 1990) e as espécies *M. tristis* Müll. Arg. e *M. angustifolia* Pohl ex Steud possuem alto teor de amido (SHEELA et al., 2008). Em concordância com os estudos realizados por Carabalí et al. (2010), a *M. tristis* Müll Arg. também apresenta resistência à mosca branca e ao ácaro verde.

A espécie *M. flabellifolia* Pohl apresenta resistência moderada a ácaro, mosca branca e cochonilha, e contém elevado teor de proteínas (BURBANO et al., 2007; AKINBO et al., 2012). Algumas espécies manifestam grande adaptação a baixas temperaturas, como a *M. attenuata* Müll. Arg., a *M. rubricaulis* I. M. Johnst e a *M. grahamii* Hook (CHÁVEZ, 1990). Já a *M. pentaphylla* Pohl se adapta bem em solos que possuem quantidades elevadas de cálcio (NASSAR, 2003). Para Nassar (1979), a *M. chlorosticta* Standl. & Goldman consegue se adaptar em áreas alcalinas e a *M. violacea* (Pohl) Müll. Arg. em solos que apresentam baixa retenção de água.

Demais estudos realizados também comprovam o potencial de outras espécies silvestres que apresentam características de interesse, a exemplo de *M. pringlei* S.

Watson, que possui baixo teor de cianeto (GÓMEZ et al., 1984), e *M. glaziovii* Müll. Arg., que demonstra resistência ao mosaico africano e à cochonilha (JENNINGS, 1976), enquanto que para Nassar et al. (2007) a espécie *M. oligantha* Pax & K. Hoffm. foi identificada com altos teores de proteínas, amido e luteína, além de apresentar níveis muito baixos de HCN e tolerância ao frio.

Considerando que as espécies silvestres desse gênero possuem genes de importância para serem utilizados como fonte de resistência aos principais estresses bióticos e abióticos (NASSAR, 2006), diversos trabalhos de melhoramento genético têm sido realizados envolvendo cruzamentos entre espécies silvestres e a espécie cultivada (*M. esculenta* Crantz). Além disso, em outras culturas, as espécies silvestres também são utilizadas por melhoristas como fonte de caracteres úteis, não encontrados em variedades da espécie cultivada (NASSAR et al., 1986; NASSAR, 2006; LEDO et al., 2014; SILVA et al., 2018). No caso da mandioca, esses cruzamentos também podem ser aplicados com o intuito de aumentar a diversidade genética nos programas de melhoramento dessa cultura.

A CULTURA DA MANDIOCA

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é uma espécie nativa da América do Sul, sendo o Brasil considerado como o provável centro de sua origem, diversidade e domesticação (OLSEN, 2004). É a única espécie que possui valor comercial dentro do gênero *Manihot* e, portanto, a de maior importância agrônômica. É um arbusto lenhoso de crescimento perene, sendo a parte aérea composta por um tronco e ramos sobre ele, que, normalmente, pode alcançar 1 m a 3 m de altura, porém, a depender da variedade, atingir até 4 m. Já a parte subterrânea é formada por raízes comestíveis que são responsáveis pela nutrição da planta, com disposição axial em torno do tronco.

Segundo Graner (1942), a mandioca é alógama, possui reprodução sexuada, apresenta inflorescências masculinas e femininas separadas, porém presentes na mesma planta (monoica). Além disso, apresenta protoginia expressiva, que contribui para a polinização cruzada e, provavelmente, essa característica pode explicar a elevada taxa de heterozigotidade na cultura. A semente é a via de reprodução sexual da planta, apesar de não ser a forma mais utilizada para a propagação da mandioca,

pois sua taxa de germinação é baixa, desuniforme (CHANDRARATINA; NANAYAKKARA, 1948) e algumas sementes são formadas sem a ocorrência da fertilização (apomixia), tornando-as inviáveis.

Algumas instituições como o Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), o Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), na Colômbia, o Instituto Internacional para a Agricultura Tropical (IITA), na Nigéria, e os dois centros do Conselho de Pesquisa Agrícola Internacional (CGIAR), realizam trabalhos e pesquisas com melhoramento genético fazem a multiplicação de sementes botânicas visando o aumento da variabilidade e conseqüentemente a produção de novas cultivares de mandioca geneticamente superiores (LARA et al., 2008). Por outro lado, o principal método de reprodução utilizado pelos produtores é a propagação vegetativa, onde se utilizam segmentos da haste, denominados manivas ou estacas, envolvendo aproximadamente de cinco a sete gemas (SILVA et al., 2009), 20 cm de comprimento e diâmetro em torno de 2,5 cm. A principal vantagem dessa técnica é a manutenção das características morfológicas e agrônômicas do genótipo, uma vez que as plantas geradas serão idênticas à planta-mãe, além de reduzir o tempo de estabelecimento da planta em relação à propagação sexuada (FUKUDA; CARVALHO, 2006).

O plantio da mandioca é bastante difundido mundialmente, principalmente no âmbito da agricultura familiar, desempenhando um importante papel social. Também se destaca pela capacidade de adaptação em diferentes condições de clima e solo, que geralmente são desfavoráveis à plantas de outras espécies (VENTURINI et al., 2016). No entanto, alguns fatores que acometem a cultura limitam a expansão do seu cultivo, como o ataque de pragas e doenças, a incidência de plantas espontâneas, a baixa produtividade de raízes quando comparada com o potencial da cultura (FELIPE et al., 2013), a baixa fertilidade dos solos, a utilização de manivas de baixa qualidade, o uso de cultivares pouco produtivas ou mal adaptadas à região de cultivo (CARDOSO et al., 2013).

De fato, a incidência de pragas e doenças pode reduzir a produção de raízes, podendo ocasionar também sintomas na haste e nas folhas, afetando diretamente a qualidade das safras e, em grandes proporções, ameaçando a segurança alimentar. De acordo com Hokanson et al. (2016) e Thomas-Sharma et al. (2017), por meio da propagação vegetativa muitos patógenos endógenos e sistêmicos que estão

associados a vírus, bactérias, fungos e fitoplasmas são transmitidos juntamente com o material propagado utilizado nos próximos cultivos.

Segundo Alvarez et al. (2012), a bacteriose, causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihots*, se dissemina por meio de hastes infectadas e pode se dispersar por gotas de chuva e pela utilização de ferramentas contaminadas. Já os sintomas do mosaico africano (*African cassava mosaic virus*, *Begomovirus*) ocorrem principalmente nas folhas, apresentando um mosaico amarelo com redução e distorção da área foliar, enquanto a virose do castanho listrado da mandioca (*Cassava brown streak virus*, *Ipomovirus*) causa necrose nas folhas e pode chegar a níveis mais severos, afetando também a haste; ambas as viroses são transmitidas por insetos (LEGG; THRESH, 2003; KAWEESI et al., 2014; LEGG et al., 2015; McCALLUM et al., 2017).

Entre as doenças fúngicas, a antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*), de ocorrência bastante comum, manifesta seus sintomas em folhas que apresentam manchas e desfolhação, e, além disso, ocasiona cancrios profundos no caule. Na podridão radicular (Botryosphaeriaceae, *Phytophthora* sp. e *Fusarium* sp.), os sintomas podem variar de acordo com o agente causal, atingindo principalmente as raízes e causando podridões com odores fortes (ALVAREZ et al. 2012; REDDY, 2015), enquanto que a doença do superalongamento, causada por *Sphaceloma manihoticola*, promove o crescimento exagerado das hastes, gerando ramos finas com longos entrenós.

Outra doença que se destaca é a couro-de-sapo, que por um período teve sua etiologia associada a um vírus. Entretanto, Alvarez et al. (2009) detectaram um fitoplasma que está relacionado com a doença, cujos sintomas atingem severamente as raízes, que se apresentam fibrosas, com sulcos profundos e diminuição do diâmetro. O superbrotamento, outra doença que atinge a mandioca, também associado a um fitoplasma, aumenta o surgimento de brotações atrofiadas, com entrenós encurtados e folhas pequenas.

Com relação às pragas, Carvalho et al. (2015) citam como principais: a mosca-branca [*Aleurothrixus aepim* (Goeldi, 1886)], o percevejo-de-renda (*Vatiga* sp.), o mandarová (*Erinnyis ello* L.), a cochonilha da mandioca (*Phenacoccus manihoti* Matile-Ferrero) e a broca-da-haste (*Sternocoelus* spp.).

IMPORTÂNCIA DA CULTURA

O cultivo da mandioca é de grande influência para a alimentação de milhões de pessoas que habitam as regiões tropicais e subtropicais da África, Ásia e América Latina (KURIA et al., 2017), por ser uma cultura de grande rusticidade e de fácil adaptação em diferentes tipos de solo e clima. Sua produtividade e área plantada se destacam em diversos países em todo o mundo, alcançando, no ano de 2020, a produção mundial de mais de 302 milhões de toneladas de raízes, sendo a Nigéria, República Democrática do Congo, Tailândia, Gana, Indonésia e Brasil os seis principais países responsáveis pela produção (FAO, 2020).

Nesse contexto, o Brasil é o sexto maior produtor mundial, com mais de 18 milhões de toneladas de raízes e área colhida acima de 1,2 milhão de hectares (FAO, 2020). Seu plantio predomina em todo território nacional e, de acordo com Felipe et al. (2010), a produção de mandioca apresenta características de subsistência, uma vez que é importante para a renda de pequenos e médios produtores, além de ser utilizada como matéria-prima para agroindústrias. Sua capacidade de desenvolvimento em áreas marginais ou em condições adversas favorece a produção em praticamente todas as regiões do Brasil (CARVALHO et al., 2016).

De acordo com Njoku et al. (2015), a mandioca possui raízes tuberosas que são ricas em carboidratos (amido) e estão presentes na alimentação humana e animal, sendo que boa parte do consumo humano se dá a partir das raízes cozidas. Como subproduto da mandioca, além da farinha, a fécula é bastante utilizada na preparação de bolos, tortas, biscoitos, tapioca, pães e polvilhos, entre outros produtos; ademais, é rica em proteínas, minerais, vitaminas B1, B2 e C, e carotenoides. A parte aérea também é utilizada, com o consumo de folhas acontecendo em muitas regiões africanas que possuem escassez de alimentos, e também nas regiões Norte e Nordeste brasileiras, onde está presente em um prato típico conhecido como maniçoba (REDDY, 2015; AGRE et al., 2017).

Na alimentação animal, resíduos do beneficiamento das raízes, hastes e folhas são utilizados como matéria prima para a elaboração de fenos e silagens, pois representam importantes fontes de proteínas, possuem vitaminas do complexo A, C e B, e minerais como o cálcio e o ferro. Além disso, o líquido amarelo extraído da mandioca quando passa pelo processo de fabricação da farinha, conhecido como

manipueira, é utilizado para adubação do solo e controle de pragas (ALMEIDA; FERREIRA FILHO, 2005; CHICHERCHIO, 2013).

Ainda considerando que toda a planta da mandioca pode ser utilizada na alimentação animal, a depender da variedade, todas as partes devem ser processadas para melhorar sua conservação e reduzir a concentração de ácido cianídrico (HCN). Portanto, as cultivares que possuem quantidades inferiores a 50 mg.kg⁻¹ de HCN são consideradas inofensivas, as que apresentam valores de 50 mg.kg⁻¹ a 100 mg.kg⁻¹ são classificadas como moderadamente tóxicas e as que contêm quantidades acima de 100 mg.kg⁻¹ de HCN são classificadas como tóxicas (LORENZI et al., 1993). Somando-se a isso, Mezette (2007) afirma que as variedades de mandioca que possuem baixo teor de compostos cianogênicos são classificadas como 'mansas' e podem ser consumidas na forma *in natura* pela população, enquanto as que apresentam alto teor do ácido são classificadas como 'bravas' e devem ser utilizadas após passarem por algum procedimento de desintoxicação.

De fato, o principal valor econômico da *M. esculenta* Crantz está associado principalmente às suas raízes, devido à característica de armazenar grandes quantidades de amido. Tendo em vista a procura de matéria-prima pelas indústrias, nos últimos anos houve um aumento no consumo de amido de mandioca no setor industrial, ampliando as possibilidades de sua utilização em diversos setores de processamento, como: alimentícios, têxtil, fogos de artifício, alcooleiro, farmacêutico, fabricação de fósforos, papel, embalagens, colas, creme dental e produtos de tinturaria (LEONEL et al., 2015). Barros et al. (2019) também afirmam que resíduos da mandioca podem ser utilizados na fabricação de etanol.

IMPORTÂNCIA DA CONSERVAÇÃO DE GERMOPLASMA

O germoplasma pode ser definido como o conjunto vegetal que compreende todas as informações relacionadas à constituição genética de uma determinada espécie e, assim, contém a variabilidade genética disponível para os programas de melhoramento de plantas (BESPALHOK et al., 2007). Ainda de acordo com esses autores, alguns tipos de germoplasma são divididos por origem: os centros de diversidade, que compreendem cultivares primitivas, híbridos naturais, parentais silvestres e gêneros relacionados; os centros de cultivo, que abrangem cultivares

comerciais, cultivares obsoletas, cultivares menos importantes e as crioulas; e os programas de melhoramento, que integram as cultivares de origem híbrida, linhagens e populações melhoradas.

O suporte de um programa de melhoramento genético fundamenta-se na diversidade biológica disponível e, assim, sua conservação se torna imprescindível, uma vez que mantém o equilíbrio e a estabilidade do ecossistema. Porém, continuamente, parte dessa diversidade tem sido degradada em decorrência da ação antrópica, crescimento populacional e redução dos incentivos financeiros por parte de alguns países para manter a pluralidade genética (HENRY-SILVA, 2005).

A segurança alimentar global é assegurada pela disponibilidade e potencial de utilização dos recursos genéticos de plantas. Nesse contexto, os bancos de germoplasma representam um papel de grande importância, auxiliando na redução da perda da diversidade biológica, por meio da conservação de espécies silvestres, de cultivares locais tradicionais e de variedades melhoradas, permitindo que o material possa ser regenerado a qualquer momento sem que haja perdas ao longo do tempo (WANG et al., 2005).

Considerando a importância que as espécies silvestres do gênero *Manihot* representam, devido ao potencial de utilização de genes com características de interesse em programas de melhoramento da mandioca para o desenvolvimento de novas variedades, justifica-se a necessidade de se conservar essas espécies em Bancos Ativos de Germoplasma (BAG). No Brasil, o BAG de mandioca da Embrapa Mandioca e Fruticultura foi criado no ano de 1976, em Cruz das Almas, Bahia, e apresenta a maior coleção de acessos de mandioca mantidos em campo do país. O BAG *in vitro* possui aproximadamente 680 acessos, para ambos os germoplasmas os acessos são oriundos de diferentes regiões do Brasil, bem como de outros países. No ano de 2005, no mesmo local, a coleção das espécies silvestres também foi instituída, com cerca de 40 acessos mantidos em laboratório, porém este número de acessos foi reduzido, pois, diferentemente da espécie cultivada, para as silvestres ainda não foi desenvolvido um protocolo de conservação *in vitro* bem definido.

ESTRATÉGIAS DE CONSERVAÇÃO

O princípio básico dos mecanismos de conservação de qualquer conteúdo genético se baseia na preservação e manutenção de toda essa diversidade, priorizando seu uso atual e futuro, o que pode ser alcançado por meio de três estratégias: conservação *in situ*, *on farm* e *ex situ*.

A conservação *in situ* se constitui na preservação de recursos genéticos por meio de reservas genéticas, reservas de desenvolvimento sustentável e reservas extrativistas, podendo ser realizada em áreas protegidas. Esse tipo de preservação considera, principalmente, a manutenção de indivíduos em seu habitat natural, sendo que para as espécies cultivadas essa conservação deve ser realizada no ambiente em que suas características específicas tenham sido desenvolvidas. Porém, nesse sistema, deve-se considerar que essas espécies estão submetidas a seleções do próprio ambiente, através de fatores bióticos e abióticos (VALOIS et al., 1996; MEDEIROS, 2003; SIMON, 2010; VIEIRA, 2013).

A conservação *on farm* é uma derivação importante da conservação *in situ*, onde a manutenção dos recursos genéticos de espécies cultivadas ocorre não somente no local de origem, mas também pela ação dos agricultores, que irão preservá-las em comunidades locais e tradicionais. Dispõe-se, de ampla diversidade vegetal, fundamental para a segurança alimentar, permitindo sua evolução por meio de recursos naturais e ação antrópica (RANA et al., 2008; SANTONIERI, 2015).

Por outro lado, a conservação *ex situ* é empregada na preservação de espécies fora do estado de ocorrência na natureza, objetivando principalmente o desenvolvimento de coleções e bancos de germoplasma, com o intuito de integrá-los a um conjunto de técnicas e estratégias direcionadas ao manejo e uso de recursos genéticos (BENELLI et al., 2013).

Em conformidade, Ramsay et al. (2000) afirmam que a conservação *ex situ* na maioria das vezes é a forma mais favorável para preservar espécies raras que estão ameaçadas de extinção, tornando-se uma estratégia cada vez mais utilizada para os recursos genéticos que se encontram em grande ameaça de erosão genética, bem como os que possuem destaque na agricultura e alimentação humana, assegurando o seu acesso no futuro de maneira mais eficiente e prática. Existem várias técnicas de conservação de germoplasma *ex situ*, por exemplo: o armazenamento de sementes, a formação de bancos de genes em campo ou em casas de vegetação, o

desenvolvimento de coleções *in vitro* (SOENGAS et al., 2009) e criopreservadas (SOUZA et al., 2009).

CULTURA DE TECIDOS E CONSERVAÇÃO DE GERMOPLASMA *IN VITRO*

A cultura de tecidos de plantas apresenta diversas possibilidades que podem contribuir com a manutenção da biodiversidade, pois permite a micropropagação de espécies protegidas, espécies endêmicas, novas variedades, bem como as espécies ameaçadas de extinção, considerando que serão acondicionadas em ambiente protegido, perante condições de armazenamento controladas, dificultando, dessa forma, que as plantas fiquem expostas a estresses bióticos e abióticos (WITHERS; ENGELMANN, 1997). Além disso, após a definição do meio de cultura, do tipo de explante, considerando sua origem, e das condições da planta matriz, essa técnica permite a produção de plantas em larga escala, assegurando a qualidade morfológica, fisiológica e a limpeza clonal, aspectos que não seriam garantidos quando comparados com as técnicas convencionais (LIMA et al., 2007; GONZÁLEZ VEGA, 2012).

No entanto, Bairu et al. (2011) relatam que durante a fase *in vitro* frequentemente são realizados diversos subcultivos, contribuindo, em alguns casos, para a indução de variação genética, ou somaclonal, e, conseqüentemente, pode resultar em risco à preservação de alguns genótipos. Dessa forma, o desenvolvimento de metodologias de conservação *in vitro* por crescimento mínimo torna-se uma alternativa bastante promissora, pois permitirá que os subcultivos ocorram em intervalos de tempo maiores, resultando na redução dos custos operacionais, uma vez que não necessitará de constante manutenção.

A conservação de germoplasma *in vitro* pode ser empregada por meio de modificações executadas no ambiente de cultivo, com o intuito de retardar o desenvolvimento de células, tecidos e órgãos (WITHERS; WILLIAMS, 1998). O crescimento mínimo das culturas tem sido praticado com sucesso, com o objetivo de restringir o metabolismo da planta, sem prejudicar sua viabilidade, e pode ocorrer por meio de estresses osmóticos, pela diminuição da intensidade de luz ou temperatura, pela adição de retardantes de crescimento e/ou limitando a concentração dos

componentes salinos e orgânicos do meio nutritivo (WITHERS; WILLIAMS, 1998; ARRIGONI-BLANK et al., 2014).

Os retardantes de crescimento vegetal são compostos sintéticos que atuam restringindo o alongamento do caule, mantendo os padrões de crescimento sem provocar reações tóxicas na planta (SELEGUINI, 2007). De acordo com Silva (2008), esse processo acontece com a redução do alongamento das células e a diminuição da taxa de divisão celular. Entre os diferentes tipos de retardantes de crescimento, tem-se o paclobutrazol (PBZ), um triazol que quando absorvido pelas folhas, caules e raízes é translocado através do xilema até os meristemas apicais de crescimento, onde ocorrerá a inibição da biossíntese das giberelinas e, portanto, a modificação do metabolismo (SILVA, 2008). A utilização dessa substância vem sendo estudada há mais de 15 anos como alternativa aos reguladores de crescimento convencionais (STERREFTT, 1985; VALLE; ALMEIDA, 1991; BEROVA et al., 2002; RIGHETO et al., 2012; D'ARÊDE et al., 2017; SÁ et al., 2021). O paclobutrazol, quando utilizado no cultivo *in vitro*, também favorece o engrossamento das raízes, beneficiando de certa forma o processo de aclimatização de mudas (CANTO et al., 2004).

Outra estratégia para limitar o crescimento das plantas *in vitro* se dá com a utilização do ácido abscísico, que favorece a dormência de gemas, retarda o crescimento, o estímulo à senescência e a abscisão das folhas e frutos (CASTRO et al., 2005). Dessa forma, o uso desse ácido pode favorecer a longevidade dos explantes, influenciando positivamente a conservação *in vitro* do germoplasma vegetal.

Um dos aspectos também considerado durante a conservação *in vitro* é a influência de gases presentes nos recipientes de cultivo. O etileno é o principal gás envolvido no sistema de cultivo *in vitro*, já que provoca diferentes respostas de acordo com a espécie, e vários trabalhos têm mostrado o efeito desse gás sobre as plantas (ADKINS et al., 1993; AGARWAL; BHOJWANI, 1993; NISSEN, 1994). De acordo com Pasqual et al. (2002), alguns estudos relacionados com a inibição do etileno têm sido realizados devido a ação negativa desse gás nas espécies cultivadas *in vitro*. Entre eles pode-se destacar o uso do nitrato de prata (AgNO_3), que além de atuar inibindo a ação do etileno pode promover a proliferação de calos e a embriogênese somática (AL-KHAYRI; AL-BAHRANY, 2001).

Por consequência, o uso dessas substâncias na conservação *in vitro* de germoplasma, mediante técnicas de cultura de tecidos, se torna uma estratégia eficiente quando comparada com a conservação em campo. Quando essas técnicas são estabelecidas prolongam o período entre os subcultivos, proporcionando uma redução nos custos de manutenção de coleções em laboratório. Além disso, os BAGs, quando bem estabelecidos, facilitam o intercâmbio de material genético livre de patógenos entre instituições, regiões e países, sendo um componente muito relevante para os programas de melhoramento genético.

Portanto, devido à necessidade de se conservar a diversidade genética e considerando a importância da manutenção das espécies silvestres do gênero *Manihot*, os impasses e a carência de estudos envolvidos nesse processo, torna-se imprescindível à adequação de metodologias de conservação *in vitro* desse germoplasma, sendo, neste trabalho, o foco direcionado para a preservação sob condições de crescimento mínimo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADKINS, S. W.; KUNANUVATCHAIDACH, R.; GRAY, S. J.; ADKINS, A. L. Effect of ethylene and culture environment on rice callus proliferation. **Journal of Experimental Botany**, v. 44, n. 269, p. 1829-1835, 1993.

AGARWAL, P. K.; BHOJWANI, S. S. Enhanced pollen grain embryogenesis and plant regeneration in anther cultures of *Brassica juncea* cv. PR-45. **Euphytica**, v. 70, p. 191-196, 1993.

AGRE, A. P.; BHATTACHARJEE, R.; DANSI, A.; BECERRA LÓPEZ-LAVALLE, L. A.; DANSI, M.; SANI, A. Assessment of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) diversity, loss of landraces and farmers preference criteria in southern Benin using farmers' participatory approach. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 64, n. 2, p. 307-320, 2017.

AKINBO, O.; LABUSCHAGNE, M. T.; MARÍN, J.; OSPINA, C.; SANTOS, L.; BARRERA, E.; GUTIÉRREZ, J.; EWA, F.; OKOGBENIN, E.; FREGENE, M. QTL analysis for root protein in a backcross family of cassava derived from *Manihot esculenta* ssp. *flabellifolia*. **Tropical Plant Biology**, v. 5, n. 2, p. 161-172, 2012.

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

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

ALVAREZ, E.; LLANO, G. A.; MEJÍA, J. F. Cassava diseases in Latin America, Africa and Asia. In: HOWELER, R. H. (ed.). **The cassava handbook**: A reference manual based on the asian regional cassava training course, held in Thailand, Bangkok. Cali: CIAT, 2012. p. 258-304.

ALVAREZ, E.; MEJÍA, J. F.; LLANO, G. A.; LOKE, J. B.; CALARI, A.; DUDUK, B.; BERTACCINI, A. Characterization of a phytoplasma associated with frogskin disease in cassava. **Plant Disease**, v. 93, p. 1139-1145, 2009.

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

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

BARROS, R. N.; SANTOS, M. do S. M.; CARDOSO, C. A. L.; BATISTOTE, M. A. Utilização de resíduos agroindustriais para produção de bioetanol. **Revista Gestão & Sustentabilidade Ambiental**, v. 8, n. 1, p. 31-43, 2019.

BASSINI, F. **Caracterização de populações de barueiros (*Dipteryx alata* Vog. – Fabaceae) em ambientes naturais e explorados**. 2008. 149 f. Tese (Doutorado em Ciências Ambientais) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2008.

BELTRÃO, F. A. S.; SILVA, D. S.; BEELEN, P. G.; LLAMOCA-ZARATE, R. M.; SANTA CRUZ, S. E. S. B. Caracterização química de diferentes acessos de maniçoba (*Manihot pseudoglaziovii* Pax e Hoffman.) de interesse forrageiro. **Engenharia Ambiental: Pesquisa e Tecnologia**, v. 12, n. 2, p. 135-142, 2015.

BENELLI, C.; CARLO, A. de; ENGELMANN, F. Recent advances in the cryopreservation of shoot-derived germplasm of economically important fruit trees of *Actinidia*, *Diospyros*, *Malus*, *Olea*, *Prunus*, *Pyrus* and *Vitis*. **Biotechnology Advances**, v. 31, p. 175-185, 2013.

BEROVA, M.; ZLATEV, Z.; STOEVA, N. Effect of Paclobutrazol on wheat seedlings under low temperature stress. **Bulgarian Journal of Plant Physiology**, v. 28, p. 75-84, 2002.

BESPALHOK, J. C. F.; GUERRA, E. P.; OLIVEIRA, R. Uso e conservação do germoplasma. In: BESPALHOK, J. C. F.; GUERRA, E. P.; OLIVEIRA, R. **Melhoramento de plantas.** Disponível em: <<http://www.bespa.agrarias.ufpr.br/paginas/livro/capitulo%203.pdf>> (2007). Acesso em: 17 de abr. 2020.

BURBANO, M.; CARABALÍ, A.; MONTOYA, J.; BELLOTTI, A. C. Resistencia natural de espécies silvestres de *Manihot* (Euphorbiaceae) a *Mononychellus tanajoa*, (Acariformes), *Aleurotrachelus socialis*, y *Phenacoccus herreni* (Homoptera). **Revista Colombiana de Entomologia**, v. 33, n. 2, p. 110-115, 2007.

CANTO, A. M. M. E.; SOUZA, F. V. D.; COSTA, M. A. C.; SOUZA, A. da S.; LEDO, C. A. da S.; CABRAL, J. R. S. Conservação *in vitro* de germoplasma de abacaxi tratado com paclobutrazol. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, n. 7, p. 717-720, 2004.

CARABALÍ, A.; BELLOTTI, A. C.; MONTOYA-LERMA, J.; FREGENE, M. Resistance to whitefly, *Aleurotrachelus socialis*, in wild populations of cassava, *Manihot tristis*. **Journal of Insect Science**, v. 10, n. 170, p. 1-10, 2010.

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

CARVALHO, L. M.; OLIVEIRA, H. W. L.; RANGEL, I. R.; SEDREZ, M. A.; SANTOS, V. S. Productivity and drought tolerance of cassava cultivars in the Coastal Tablelands of Northeastern Brazil. **Ciência Rural**, v. 46, n. 5, p. 796–801, 2016.

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

CASTRO, P. R. C; KLUGE, R. A.; PERES, L. E. P. Hormônios e reguladores vegetais. In: CASTRO, P. R. C; KLUGE, R. A.; PERES, L. E. P. (ed.). **Manual de fisiologia vegetal: teoria e prática**. Piracicaba: Editora Agronômica Ceres, 2005. p. 389-440.

CHANDRARATINA, M. F.; NANAYAKKARA, K. D. S. S. Studies in cassava: II. The production of hybrids. **Tropical Agriculture**, v. 194, p. 59-74, 1948.

CHAVARRIAGA, P.; PRIETO, S.; HERRERA, C. J.; LÓPEZ, D.; BELLOTTI, A. C.; TOHME, J. Screening transgenics unveils apparent resistance to hornworm (*E. ello*) in the nontransgenic, African cassava clone 60444. In: ALVES, A.; THOME, J. (ed.). INTERNATIONAL SCIENTIFIC MEETING OF THE CASSAVA BIOTECHNOLOGY NETWORK, 6th, 2004, Cali. **Adding value to a small-farmer crop: abstracts**. Cali: CIAT, 2004. p. 4.

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

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

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

D'ARÊDE, L. O.; MATSUMOTO, S. N.; SANTOS, J. L.; VIANA, A. E. S.; SILVA, P. A. R. Morfofisiologia do crescimento vegetativo inicial de cafeeiros arabica submetidos a aplicação via foliar de paclobutrazol. **Coffee Science**, v. 12, n. 3, p. 451-462, 2017.

FAO, FAOSTAT, DATABASE, CROP PRIMARY. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>>. FAOSTAT, DATABASE, CROP. Acesso em: 07. mar. 2022.

FELIPE, F. I.; ALVES, L. R. A.; CAMARGO, S. G. C. Panorama e perspectivas para a indústria de fécula de mandioca no Brasil. **Revista Raízes e Amidos Tropicais**, v. 6, p. 134-146, 2010.

FELIPE, F. I.; ALVES, L. R. A.; VIEIRA, R. M. Fécula de mandioca: produção na Tailândia versus Brasil. **Agroanalysis**, v. 33, n. 3, p. 28, 2013.

FLORA DO BRASIL 2020. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB17591>>. Acesso em: 24 nov. 2021.

FUKUDA, W. M. G.; CARVALHO, H. W. L. de. **Propagação rápida de mandioca no Nordeste brasileiro**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2006. 6 p. (Embrapa Tabuleiros Costeiros. Circular Técnica, 45).

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

GONZÁLEZ VEGA, M. El ñame (*Dioscorea* spp.). Características, usos y valor medicinal. Aspectos de importancia en el desarrollo de su cultivo. **Cultivos Tropicales**, v. 33, n. 4, p. 5-15, 2012.

GRANER, E. A. Notas sobre florescimento e frutificação da mandioca. **Bragantia**, v. 2, p. 1-12, 1942.

HENRY-SILVA, G. G. A importância das unidades de conservação na preservação da diversidade biológica. **Revista Logos**, v. 12, p. 127-151, 2005.

HOKANSON, K. E.; ELLSTRAND, N. C.; DIXON, A. G.; KULEMBEKA, H. P.; OLSEN, K. M.; RAYBOULD, A. Risk assessment of gene flow from genetically engineered virus

resistant cassava to wild relatives in Africa: an expert panel report. **Transgenic Research**, v. 25, n. 1, p. 71-81, 2016.

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

KAWEESI, T.; KAWUKI, R.; KYALIGONZA, V.; BAGUMA, Y.; TUSIIME, G.; FERGUSON, M. E. Field evaluation of selected cassava genotypes for cassava brown streak disease based on symptom expression and virus load. **Virology Journal**, v. 11, n. 216, p. 1-14, 2014.

KURIA, P.; ILYASC, M.; ATEKAA, E.; MIANOD, D.; ONGUSOA, J.; CARRINGTONC, J. C.; TAYLORC, N. J. Differential response of cassava genotypes to infection by cassava mosaic gemini viruses. **Journal Virus Research**, v. 227, p. 69–81, 2017.

LEDO, C. A. da S.; SANTOS, V. D. S.; MARTIN, M.; ALVES, A.; SILVA, D. D.; SANTOS, A.; TAVARES FILHO, L. D. Q. **Hibridação interespecífica entre espécies silvestres de *Manihot* (Euphorbiaceae-Magnoliophyta) e cultivares de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz)**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2014. 25 p. (Embrapa Mandioca e Fruticultura. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 65).

LEDO, C. A. da S.; SILVEIRA, T. C. S.; CARVALHO, P. C. L. de; MARTINS, M. L. L.; TAVARES FILHO, L. F. Q. **Coleta e conservação de germoplasma de espécies silvestres de *Manihot* no Estado da Bahia para ampliação da coleção de trabalho da Embrapa Mandioca e Fruticultura**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2010. 5 p. (Embrapa Mandioca e Fruticultura. Comunicado Técnico, 146).

LEGG, J. P.; KUMAR, P. L.; MAKESHKUMAR, T.; TRIPATHI, L.; FERGUSON, M.; KANJU, E.; NTAWURUHUNGA, P.; CUELLAR, W. Cassava virus diseases: biology,

epidemiology, and management. **Advances in Virus Research**, v. 91, p. 85-142, 2015.

LEGG, J. P.; THRESH, J. M. Cassava virus diseases in Africa. In: PROCEEDINGS OF THE FIRST INTERNATIONAL CONFERENCE ON PLANT VIROLOGY IN SUB-SAHARAN AFRICA, 1., 2001, Ibadan. Ibadan: IITA, 2003. p. 517-522.

LEONEL, M.; FELTRAN, J. C.; AGUIAR, E. B.; FERNANDES, A. M.; PERESSIN, V. A.; BICUDO, S. J. Mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). In: LEONEL, M.; FERNANDES, A. M.; FRANCO, C. M. L. (ed.). **Culturas amiláceas: batata-doce, inhame, mandioca e mandioquinha-salsa**. Botucatu: CERAT/UNESP, 2015. p.183-326.

LIMA, C. S. M.; BANDEIRA, J. de M.; RUBIN, S.; RIBEIRO, M. V.; BENITEZ, L.; PETERS, J. A.; BRAGA, E. J. B. Influência de fitorreguladores no crescimento *in vitro* de partes aérea de *Mentha viridis*. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, supl. 2, p. 669-671, 2007.

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

McCALLUM, E. J.; ANJANAPPA, R. B.; GRUISSEM, W. Tackling agriculturally relevant diseases in the staple crop cassava (*Manihot esculenta*). **Current Opinion in Plant Biology**, v. 38, p. 50-58, 2017.

MEDEIROS, J. de D. A biotecnologia e a extinção das espécies. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, DF, n. 30, p. 109-113, 2003.

MEZETTE, T. F. **Seleção de variedades de mandioca de mesa (*Manihot esculenta* Crantz) com altos teores de carotenoides e vitamina A**. 2007. 60 f. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical) – Instituto Agronômico de Campinas, Campinas.

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

NASSAR, N. M. A. Mandioca: Uma opção contra a fome. Estudos e lições no Brasil e no mundo. **Ciência Hoje**, v. 39, n. 231, p. 30-36, 2006.

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

NASSAR, N. M. A. Wild cassava spp.: biology and potentialities for genetic improvement. **Genetics and Molecular Biology**, v. 23, n. 1, p. 201-212, 2000.

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

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

NASSAR, N. M. A.; SILVA, J. R.; VIEIRA, C. Hibridação interespecífica entre mandioca e espécies silvestres de *Manihot*. **Ciência e Cultura**, v. 38, p. 1058-1065. 1986.

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

NISSEN, P. Stimulation of somatic embryogenesis in carrot by ethylene: effects of modulators of ethylene biosynthesis and action. **Physiologia Plantarum**, v. 92, p. 397-403, 1994.

NJOKU, D. N.; GRACEN, V. E.; OFFEI, S. K.; ASANTE, S. K.; EGESI, C. N.; KULAKOW, P.; CEBALLOS, H. Parent-offspring regression analysis for total

carotenoids and some agronomic traits in cassava. **Euphytica**, v. 206, p. 657-666, 2015.

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

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

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

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

REDDY, P. P. Cassava, *Manihot esculenta*. In: REDDY, P. P. (ed.). **Plant protection in tropical root and tuber crops**. New Delhi: Springer India, 2015. p. 17-81.

RIGHETO, M. V. L.; ALMEIDA, L. V.; BRONDANI, G. E.; AMARAL, A. F. C.; ALMEIDA, M. Morfofisiologia de plântulas de *Cattleya labiata* Lindley e *Cattleya eldorado* Linden cultivadas *in vitro* sob influência de paclobutrazol. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 10, n. 1, p. 20-25, 2012.

ROGERS, D.; APPAN, C. ***Manihot* and *Manihotoides* (Euphorbiaceae)**: a computer-assisted study. Flora Neotropica. (Monograph nº 13). New York: Hafner Press, 1973. 272 p.

SA, J. F. de; SILVEIRA, D. M. de S.; SANTOS, K. C. F. dos; SOUZA, A. da S.; LEDO, C. A. da S.; CARVALHO, M. de J. da S. de. Effects of different doses of paclobutrazol

and sucrose in the minimum *in vitro* growth of wild species of *Manihot*. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 16, n. 2, p. 1-8, 2021.

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

SELEGUINI, A. **Uso de Paclobutrazol na produção de mudas, no crescimento, produção e qualidade de frutos de tomateiro em ambiente protegido**. 2007. 101 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Engenharia do Campus de Ilha Solteira, Ilha Solteira.

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

SILVA, B. B. da; MENDES, F. B. G.; KAGEYAMA, P. Y. **Desenvolvimento econômico, social e ambiental da agricultura familiar pelo conhecimento agroecológico**. 2009. Mandioca. Disponível em: <<http://www.almanaquedocampo.com.br/imagens/files/caracter%C3%ADsticas%20da%20mandioca%20esalq.pdf>>. Acesso em: 11 mar. 2020.

SILVA, D. de C. S. da; MARTINS, M. L. L.; SANTOS, A. S.; SANTOS, V. da S.; ALVES, A. A. C.; LEDO, C. A. da S. Obtaining hybrids of cultivars and wild subspecies of cassava. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 53, p. 182-188, 2018.

SILVA, K. S. **Uso de Paclobutrazol em tomateiro cultivado em dois ambientes**. 2008. 79 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Engenharia do Campus de Ilha Solteira, Ilha Solteira.

SILVA, N. D. G; DUTRA, L. F; BIANCHI, V. J; SOMMER, L. R; VARGAS, D. P; PETERS, J. A. Conservação *in vitro* de amoreira-preta: Crescimento lento. **Plant Cell Culture and Micropropagation**, v. 12, n. 1, p. 7-12, 2016.

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

SOENGAS, P.; CARTEA, E.; LEMA, M.; VELASCO, P. Effect of regeneration procedures on the genetic integrity of *Brassica oleracea* accessions. **Molecular Breeding**, v. 23, p. 389-395, 2009.

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

STERREFTT, J. P. Paclobutrazol: a promising growth inhibitor for injection into woody plantas. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 110, p. 4-8, 1985.

THOMAS-SHARMA, S.; ANDRADE-PIEDRA, J.; CARVAJAL YEPES, M.; HERNANDEZ NOPSA, J. F.; JEGER, M. J.; JONES, R. C. A.; GARRETT, K. A.; KROMANN, P.; LEGG, J. P.; YUEN, J.; FORBES, G. A. A risk assessment framework for seed degeneration: informing an integrated seed health strategy for vegetatively propagated crops. **Phytopathology**, v. 107, n. 10, p. 1123-1135, 2017.

VALLE, R. R.; ALMEIDA, A. Growth reduction effects of paclobutrazol applied at different cacao seedling stages. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 26, p. 1911-1917, 1991.

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

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

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

WANG, Y. L.; FAN, M. J.; LIAW, S. L. Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of papaya (*Carica papaya* L.) by vitrification. **Botanical Bulletin of the Academia Sinica**, v. 46, p. 29-34, 2005.

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

WITHERS, L. A.; WILLIAMS, J. T. Conservação *in vitro* de recursos genéticos de plantas In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: Embrapa-SPI: Embrapa-CNPQ, 1998. p. 297-330.

ARTIGO 1

ÁCIDO ABSCÍSICO E CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DE ESPÉCIES SILVESTRES DE *Manihot*¹

¹Artigo aceito para publicação pelo periódico Acta Scientiarum. Biological Sciences.

ÁCIDO ABCSÍCIO E CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DE ESPÉCIES SILVESTRES DE *Manihot*

RESUMO: O ácido abscísico (ABA) está associado à dormência de gemas, abscisão foliar e é utilizado como inibidor de crescimento na conservação *in vitro* de germoplasma. Neste trabalho, avaliou-se a ação do ABA em quatro acessos silvestres de *Manihot* e um acesso de mandioca (*M. esculenta* Crantz), para definir protocolos mais eficientes para a conservação *in vitro* dessas espécies. O experimento foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Mandioca e Fruticultura, no delineamento inteiramente ao acaso em esquema fatorial 5 x 5 [(5 doses de ABA (0; 0,25; 0,50; 0,75 e 1 mg L⁻¹) e 5 espécies de *Manihot* (*M. pseudoglaziovii*, *M. tristis*, *M. flabellifolia*, *M. chlorosticta* e *M. esculenta*)], com 15 repetições. Utilizou-se miniestacas com 1 cm de tamanho, cada uma inoculada em 10 mL do meio Murashige & Skoog modificado, solidificado com Phytigel® (2,4 g L⁻¹) e contendo as doses de ABA. Os tubos contendo as miniestacas foram colocados em sala de conservação com irradiância de 20 μmol m⁻² s⁻¹, temperatura de 22±1 °C e fotoperíodo de 12 horas. Após 150 dias, foram analisadas as variáveis altura de planta (cm), números de folhas vivas e senescentes, número de brotos, número de miniestacas (com 1 cm), massa fresca e seca de parte aérea e de raízes (mg). As espécies *M. pseudoglaziovii*, *M. tristis*, *M. flabellifolia* se destacaram na redução do crescimento durante o período de conservação *in vitro*. Nesse trabalho, a adição do ABA não promoveu o efeito esperado na redução do crescimento das plantas.

Palavras-chave: Inibidor de crescimento; melhoramento genético de plantas; germoplasma *in vitro*.

ABSCISIC ACID AND IN VITRO CONSERVATION OF *Manihot* WILD SPECIES

ABSTRACT: Abscisic acid (ABA) is associated with bud dormancy, leaf abscission and growth inhibition for germplasm *in vitro* conservation. We evaluated the effects of ABA in four wild *Manihot* accessions and one cassava accession (*M. esculenta* Crantz) to define more efficient protocols for the *in vitro* conservation of these species. The experiment was performed at the Laboratory for Tissue Culture from Embrapa, in Cruz das Almas-Bahia, Brazil. The statistical design was set as completely random in a 5 x 5 factorial scheme [(5 ABA dosages (0; 0.25; 0.50; 0.75 and 1 mg L⁻¹) and 5 *Manihot* species (*M. pseudoglaziovii*, *M. tristis*, *M. flabellifolia*, *M. chlorosticta* and *M. esculenta*)], with 15 replicates. Mini-cuttings with 1 cm were used, each one inoculated in 10 mL modified Murashige & Skoog, solidified with Phytigel® (2.4 g L⁻¹) and containing the respective ABA dosages. Tubes containing these mini-cuttings were set in a germplasm conservation room with irradiance of 20 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, temperature of 22±1 °C and 12 hours photoperiod. Plant height (cm), number of living and senescent leaves, number of shoots, number of mini-cuttings (1 cm) and fresh and dry weight of shoots and roots (mg), were evaluated after 150 days. Growth reduction was remarkable in *M. pseudoglaziovii*, *M. tristis* and *M. flabellifolia* during the *in vitro* conservation period. In the present work, the addition of ABA did not promote the expected reduction of plant growth.

Keywords: Growth inhibitor, plant genetic improvement, *in vitro* germplasm.

INTRODUÇÃO

O gênero *Manihot* se destaca economicamente devido a *M. esculenta* Crantz (mandioca) possuir um alto valor comercial. As raízes de mandioca são cultivadas mundialmente e servem de alimento básico para milhões de pessoas, principalmente em regiões tropicais e subtropicais da África, Ásia e América Latina (KURIA et al., 2017). Segundo os dados da FAO (2019), para esse ano, a produção mundial de mandioca foi superior a 303 milhões de toneladas, sendo a Nigéria, República Democrática do Congo, Tailândia, Gana, Brasil e Indonésia os principais países produtores. Nesse contexto, o Brasil se destaca como o quinto maior produtor mundial de mandioca, com produção de mais de 17 milhões de toneladas de raízes.

As espécies silvestres encontradas no gênero *Manihot* apresentam características de grande potencial de utilização para o melhoramento genético. Para Nassar (2006), essas espécies possuem genes de resistência e tolerância a fatores bióticos e abióticos, que, através de cruzamentos, é possível o desenvolvimento de variedades mais produtivas e menos susceptíveis aos principais fatores agrônômicos que acometem a cultura da mandioca (*M. esculenta* Crantz). Além disso, esses cruzamentos empregando as espécies silvestres permitem ampliar a diversidade genética dos programas de melhoramento da espécie cultivada (NASSAR et al., 1986; NASSAR, 2006; LEDO et al., 2014).

A conservação de germoplasma *in vitro* utilizando técnicas de cultura de tecidos surgiu como alternativa para os bancos de germoplasma mantidos em campo, devido à exposição das plantas a fatores como o ataque de pragas e patógenos, intempéries climáticas, perda por vandalismos, erros humanos ou falhas na identificação de acessos, entre outros. Esse tipo de conservação se mostra conveniente por diversos motivos, destacando-se entre eles o fato de que geralmente é mais econômico e prático (SANGHAMITRA et al., 2019), já que permite a manutenção de uma grande quantidade de plantas em um espaço reduzido, além de possibilitar a preservação de cópias de segurança dos acessos que estão em campo e facilitar o intercâmbio de germoplasma entre instituições, regiões e países.

Essa conservação pode ser realizada sob condições de crescimento mínimo, onde mudanças no meio de cultivo são realizadas a fim de desacelerar ou suprimir parte do crescimento de células, tecidos e órgãos, tendo como principal objetivo

aumentar ao máximo o intervalo entre os subcultivos ou estendê-los por longo prazo (ROCA et al., 1991; WITHERS; WILLIAMS, 1998). Dessa forma, reduz-se a mão de obra e o espaço necessários para a preservação, facilita o acesso imediato a todo o germoplasma da coleção, favorece a estabilidade genética das plantas, mantendo suas características após o período de armazenamento, diminuindo a probabilidade de perdas de indivíduos (KOVALCHUK et al., 2009; SANTOS et al., 2011).

Uma das estratégias adotadas para o crescimento mínimo emprega a adição de retardantes de crescimento no meio de cultura, pois eles são componentes sintéticos que reduzem o alongamento da haste, sem afetar a viabilidade das plantas, e podem até intensificar a coloração verde das folhas (SOUZA et al., 2009). Além disso, esses componentes inibem a divisão celular no meristema apical das gemas e reduzem a produção de folhas e o crescimento de raízes (GIANFAGNA, 1987).

Nesse contexto, o ácido abscísico (ABA) atua de diferentes formas nos vegetais, sendo de grande importância para a regulação de vários processos fisiológicos, pois permite que as plantas fiquem protegidas em condições de estresses, como o salino, o hídrico e o térmico (RAI et al., 2011). Também é considerado inibidor de crescimento, por estar associado à dormência de gemas, sementes e órgãos subterrâneos (TAIZ; ZEIGER, 2017; MOOSIKAPALA; TE-CHATO, 2010). Além disso, induz o fechamento dos estômatos, conferindo, portanto, proteção contra o déficit hídrico que irá reduzir a perda de água pela transpiração, limitando a assimilação de carbono e, em consequência, a produção de biomassa (TAIZ; ZEIGER, 2017). Ademais, apresenta efeito direto na abscisão de folhas, flores e frutos.

A conservação *in vitro* representa uma das alternativas mais amplamente utilizadas na preservação e disponibilização do germoplasma de mandioca, principalmente por ser uma espécie de propagação vegetativa. Dessa maneira, essa estratégia também se faz importante para a conservação das espécies silvestres, que são difíceis de serem mantidas em campo e até mesmo *in vitro*. Apesar de alguns estudos terem sido realizados para avaliar o efeito do ácido abscísico na conservação *in vitro* de germoplasma (WATT et al., 2000; LEMOS et al., 2002; GOPAL et al., 2004; RAI et al., 2011; SÁ et al., 2011; SANTOS et al., 2012), são poucos os trabalhos dessa mesma natureza com a cultura da mandioca (SATO et al., 2001; BARRUETO CID;

CARVALHO, 2008) e em relação às espécies silvestres do gênero *Manihot* ainda não existem relatos na literatura.

Devido à insuficiência de estudos visando o aprimoramento dos métodos de conservação *in vitro* para as espécies silvestres de *Manihot*, justifica-se a necessidade de estudos específicos para o aperfeiçoamento dessas metodologias. Considerando que esse estudo é pioneiro na cultura de tecidos utilizando o ABA na conservação *in vitro* de espécies do gênero *Manihot*, esse trabalho teve como objetivo avaliar a ação de diferentes concentrações desse inibidor em quatro acessos silvestres de *Manihot* e um de mandioca (*M. esculenta*), com o intuito de aperfeiçoar os protocolos para conservação *in vitro* das espécies silvestres por meio do crescimento mínimo das plantas.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi desenvolvido no período de setembro de 2019 a fevereiro de 2020 no Laboratório de Cultura de Tecidos (LCT), do Núcleo de Biologia Avançada (NBA), situado à Embrapa Mandioca e Fruticultura (CNPMPF), localizada em Cruz das Almas, Bahia. Nesse estudo, foram utilizadas as espécies silvestres *Manihot pseudoglaziovii* Pax & Hoffman, *M. tristis* Müll.Arg, *M. flabellifolia* Pohl, *M. chlorosticta* Standl, e o acesso BGM 0868 (Casca Fina) de *M. esculenta* Crantz, pertencentes à coleção *in vitro* da Embrapa Mandioca e Fruticultura.

Para a obtenção dos explantes, utilizou-se plantas previamente micropropagadas, que, em câmara de fluxo laminar, foram seccionadas para obtenção de miniestacas com aproximadamente 1 cm de comprimento, contendo pelo menos uma gema. Em seguida, as miniestacas foram inoculadas em tubos de ensaio (2,5 cm x 15 cm) contendo 10 mL do meio de cultura Murashige & Skoog (1962) modificado por Souza et al. (2008), acrescentado das concentrações de ABA de 0 mg L⁻¹; 0,25 mg L⁻¹; 0,50 mg L⁻¹; 0,75 mg L⁻¹ e 1 mg L⁻¹, solidificado com Phytigel® (2,4 g L⁻¹), com pH ajustado para 5,8 e autoclavado por 20 min a 120 °C.

Empregou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado em esquema fatorial 5 x 5, composto por cinco concentrações de ABA e cinco acessos de *Manihot*, com 15 repetições, em que cada parcela experimental foi constituída por um explante (miniestaca) cultivado em um tubo de ensaio.

Posteriormente, os tubos de ensaio que continham os explantes foram mantidos durante 150 dias em sala de conservação de germoplasma com irradiância de $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, temperatura de $22 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas.

Após esse período, as plantas foram submetidas à avaliação das seguintes variáveis: altura de planta (AP; cm), número de folhas vivas (NFV), número de folhas senescentes (NFS), número de brotações (NB), número de miniestacas com tamanho de 1 cm (NME), massa fresca de parte aérea (MFPA; mg) e massa fresca de raízes (MFR; mg). Depois dessa avaliação, o material vegetal foi identificado e mantido em estufa com circulação de ar forçada e temperatura de $70 \text{ }^\circ\text{C}$, e após 48 horas, quando o peso ficou constante, determinou-se as massas secas de parte aérea (MSPA; mg) e de raízes (MSR; mg).

Após a avaliação, os dados obtidos foram submetidos ao teste F da análise de variância. As médias dos acessos foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade e para as médias das concentrações de ABA ajustou-se modelos de regressão polinomial. Os valores do número de folhas vivas, número de folhas senescentes, número de brotos e número de miniestacas foram transformados em $\sqrt{(x+0,5)}$, visando o atendimento das pressuposições da análise de variância. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o pacote 'ExpDes.pt' (FERREIRA, CAVALCANTI; NOGUEIRA, 2018) implementado no software R versão 3.4 (R Development Core Team, 2021).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com a Tabela 1, por meio da análise de variância, observa-se que os acessos utilizados no estudo tiveram influência altamente significativa para todas as variáveis analisadas. Esse resultado pode estar relacionado ao fato do gênero *Manihot* apresentar ampla variabilidade genética (NASSAR; GRATTAPAGLIA, 1986; VENTURINI et al., 2016), aspecto de grande potencial para ser explorado em programas de melhoramento.

Tabela 1. Resumo da análise de variância para as variáveis: altura de planta (AP; cm), número de folhas vivas (NFV), número de folhas senescentes (NFS), número de brotações (NB), número de miniestacas (NME), massas fresca (MFPA; mg) e seca de parte aérea (MSPA; mg) e massas fresca (MFR; mg) e seca de raízes (MSR; mg) dos acessos *Manihot pseudoglaziovii*, *M. tristis*, *M. flabellifolia*, *M. chlorosticta* e BGM 0868 (Casca Fina) em função de cinco concentrações de ácido abscísico (ABA; mg L⁻¹), após 150 dias de conservação *in vitro*.

FV	GL	AP	NFV	NFS	NB	NME	MFPA	MSPA	MFR	MSR
ABA	4	9,82 ^{ns}	1,14 [*]	1,05 ^{ns}	0,96 ^{ns}	0,28 ^{ns}	20605,00 ^{ns}	656,90 ^{ns}	34453,00 ^{ns}	1150,20 ^{**}
Acessos	4	1541,89 ^{**}	3,50 ^{**}	26,49 ^{**}	14,37 ^{**}	1,85 ^{**}	1203792,00 ^{**}	20515,00 ^{**}	675764,00 ^{**}	10792,00 ^{**}
ABA * Acessos	16	77,44 ^{ns}	0,99 ^{**}	1,05 [*]	0,86 ^{ns}	0,18 ^{ns}	96572,00 ^{ns}	1167,40 ^{ns}	24894,00 ^{ns}	975,90 ^{**}
Resíduo	185	46,90	0,45	0,54	0,56	0,19	51296,00	814,90	16117,00	326,70
Média		13,16	4,11	8,28	7,26	0,76	398,67	57,43	287,31	32,88
CV (%)		52,02	33,47	26,44	28,40	42,34	56,81	63,51	44,19	54,97

^{ns} = não significativo, ^{**} e ^{*} = significativo ao nível de 1% e 5% de probabilidade, respectivamente, pelo teste F da ANAVA.

Ainda com relação à análise de variância (Tabela 1), observa-se que para as variáveis número de folhas vivas (NFV) e massa seca de raízes (MSR) houve efeito altamente significativo ($p < 0,01$) para a interação entre os fatores (ABA x Acessos), ocorrendo efeito significativo ($p < 0,05$) também para número de folhas senescentes. A maioria das demais variáveis não apresentou efeito significativo para o fator isolado ABA.

A conservação *in vitro* das plantas dos diferentes acessos apresentaram crescimento distintos quando considerados os referentes coeficientes de variação (CVs), que oscilaram entre 26,44% e 63,51% (Tabela 1) para as variáveis número de folhas senescentes e massa seca de parte aérea, respectivamente. De acordo com Werner et al. (2013), esses valores podem estar relacionados com a inconstância do crescimento das plantas nos estudos *in vitro*, sendo considerados normais para trabalhos de cultura de tecidos vegetais, garantindo, então, a precisão experimental. Nesse contexto, na conservação *in vitro* de *Hancornia speciosa* Gomes, Sá et al. (2011) encontraram coeficientes de variação oscilando de 35,65% a 112,44%, enquanto Rezende et al. (2018) obtiveram CVs entre 18,9% e 82,10% na conservação *in vitro* de *Physalis peruviana* L. sob crescimento mínimo.

Na Tabela 2 observa-se os valores médios das variáveis que, isoladamente, apresentaram-se significativas para o fator acessos.

Tabela 2. Valores médios de altura de planta (AP; cm), número de brotos (NB), número de miniestacas (NME), massas fresca (MFPA; mg) e seca de parte aérea (MSPA; mg) e massa fresca de raízes (MFR; mg) dos acessos BGM 0868 (Casca Fina), *Manihot chlorosticta*, *M. flabellifolia*, *M. pseudoglaziovii* e *M. tristis*, após 150 dias de conservação *in vitro*.

Acessos	AP	NB	NME	MFPA	MSPA	MFR
BGM 0868	15,87 b	9,39 a	1,00 ab	491,83 ab	80,96 a	440,85 a
<i>M. chlorosticta</i>	22,65 a	11,20 a	1,67 a	591,55 a	77,14 a	385,79 a
<i>M. flabellifolia</i>	11,45 c	6,41 b	0,43 bc	384,90 b	53,15 b	155,97 c
<i>M. pseudoglaziovii</i>	7,71 c	5,05 bc	0,68 bc	236,15 c	49,11 b	282,51 b
<i>M. tristis</i>	8,21 c	4,28 c	0,14 c	209,99 c	27,13 c	184,42 c

Médias seguidas por letras diferentes nas colunas diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Para que a conservação *in vitro* seja efetiva é importante considerar que a diminuição do metabolismo esteja associada com a manutenção da viabilidade das plantas (WITHERS; WILLIAMS, 1998; ARRIGONI-BLANK et al., 2014). Nesse contexto, é desejável que as variáveis altura de planta e número de folhas senescentes expressem médias mais inferiores, que, por sua vez, devem estar associadas a médias mais elevadas nas demais variáveis. Dessa forma, é possível constatar se a redução do crescimento é viável, ao permitir, posteriormente, a recuperação e multiplicação das plantas mantidas sob conservação *in vitro*.

Com relação a variável altura de planta, as espécies *M. pseudoglaziovii*, *M. tristis* e *M. flabellifolia* apresentaram as médias mais baixas, respectivamente 7,71 cm, 8,21 cm e 11,45 cm, e não apresentaram diferença estatística entre si. Estudos realizados por Vieira et al. (2014) mostraram que a adição de 0,10 mg L⁻¹ de ABA no meio de cultura promoveu menor altura da parte aérea, comprovando o efeito inibitório desse fitorregulador no crescimento de plantas de *Allium sativum* L. Além disso, o ácido abscísico pode modificar a síntese ou atividade das citocininas, que são utilizadas no meio de cultura para quebrar a dominância apical dos brotos e aumentar a taxa de multiplicação (LEMOS, 2000).

Já para o número de brotações, o BGM 0868 (9,39) e *M. chlorosticta* (11,20) foram estatisticamente superiores aos demais acessos, apresentando as maiores médias. Esse resultado é contrastante com os encontrados por Barrueto Cid; Carvalho (2008), que observaram o efeito inibitório total nos brotos de *M. esculenta* nas concentrações superiores a 2,6 mg L⁻¹ de ABA durante a conservação *in vitro*. Por outro lado, esses mesmos autores mantiveram as plantas de mandioca por apenas 90 dias em concentrações de ABA superiores a 2,6 mg L⁻¹, enquanto que, neste estudo, as plantas foram mantidas por 150 dias utilizando concentrações de ABA inferiores e igual a 1 mg L⁻¹. Lemos et al. (2002) afirmam que ao adicionarem 1 mg L⁻¹ de ABA no meio de cultura MS foi possível conservar microplantas de cana-de-açúcar por 12 meses.

A superioridade do comportamento dos dois acessos citados anteriormente se repete quando se observa as demais variáveis: número de miniestacas, massas fresca e seca de parte aérea (mg) e massa fresca de raízes (mg). Dessa forma, a viabilidade desses acessos pôde ser mantida e, possivelmente, os mesmos podem tolerar doses mais altas do inibidor. Além disso, o bom desempenho dessas variáveis provavelmente garantirá uma multiplicação eficiente e a manutenção adequada das plantas após o período de preservação *in vitro*.

Apesar da interação entre as concentrações de ABA e os acessos de *Manihot* ter sido significativa para a variável número de folhas vivas, apenas foi possível o ajuste de modelo de equação linear decrescente e com significado biológico para *M. tristis* (Figura 1).

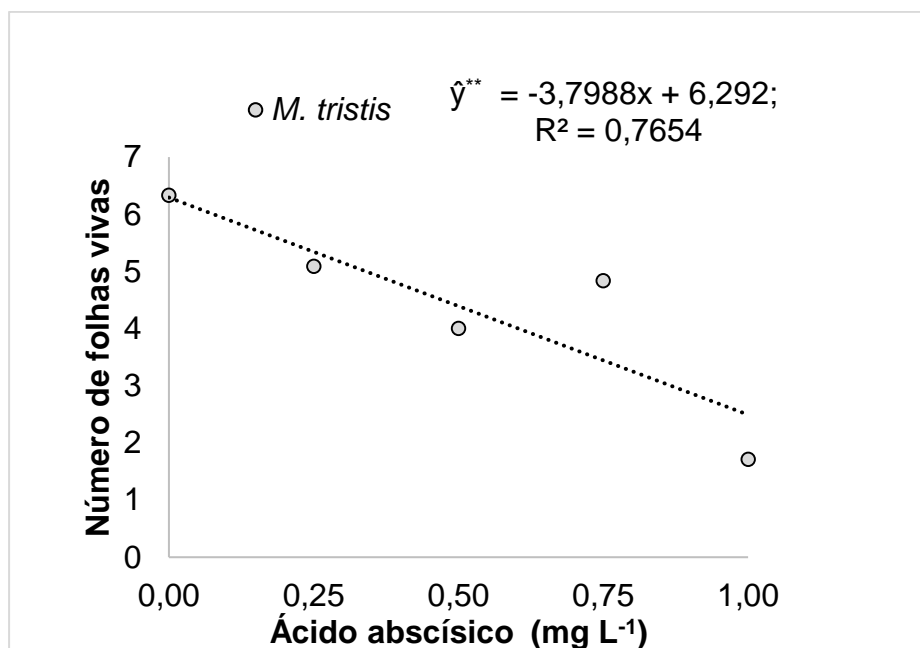


Figura 1. Número de folhas vivas produzido por *Manihot tristis* em função de cinco concentrações de ABA (mg L⁻¹), após 150 dias de conservação *in vitro*.

De acordo com a Figura 1, o maior valor estimado (6,29) para *M. tristis* foi obtido na ausência de ABA, porém o número de folhas vivas foi diminuindo conforme o aumento das concentrações utilizadas. Apesar desse resultado, na dose máxima de ABA (1 mg L⁻¹) ainda foi possível comprovar a existência de folhas vivas, indicando que as plantas conseguiram manter a viabilidade e que possivelmente esse acesso pode tolerar doses mais altas do inibidor em estudo. Esse resultado corrobora com os encontrados por Arrigoni-Blank et al. (2014), que ao utilizarem 2 mg L⁻¹ de ABA na conservação dos genótipos IPB-052 e IPB-007 de batata-doce conseguiram reduzir o crescimento das plantas e mantiveram as folhas verdes, permitindo a posterior regeneração e multiplicação dos genótipos. Já Bello-Bello et al. (2015) conseguiram estabelecer um protocolo de conservação *in vitro* para *Vanilla planifolia* Jacks. a partir da dose de 3 mg L⁻¹ de ABA.

Com relação à significância da interação dos fatores para a variável número de folhas senescentes, foi possível o ajuste de modelo de equação linear crescente e com significado biológico apenas para *M. pseudoglaziovii* (Figura 2). O menor valor estimado de 5,52 foi obtido na ausência de ABA, observando-se que o número de folhas senescentes foi se elevando à medida que as doses do inibidor foram

aumentando, comprovando que o ABA promove a senescência, em vez da própria abscisão foliar (Taiz; Zeiger, 2017).

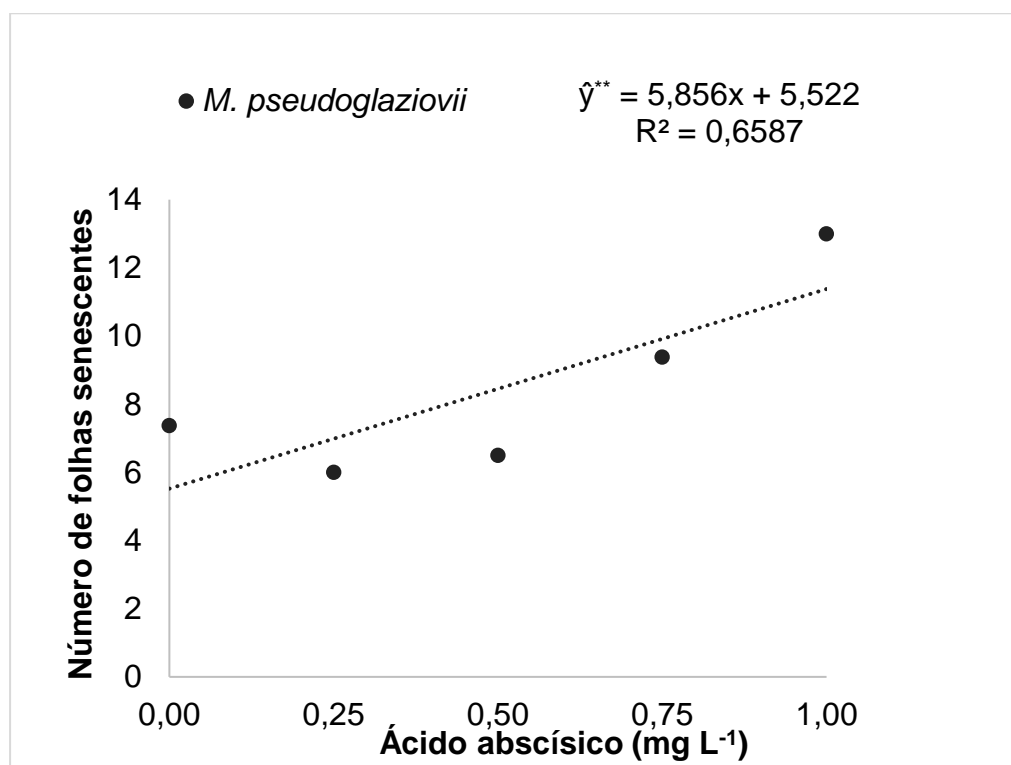


Figura 2. Número de folhas senescentes de *Manihot pseudoglaziovii* em função de cinco concentrações de ABA (mg L⁻¹), após 150 dias de conservação *in vitro*.

Na Figura 3 observa-se a significância da interação dos fatores para a variável massa seca de raízes (mg), sendo possível o ajuste de modelo de equação linear decrescente e com significado biológico para o BGM 0868 (Casca Fina), onde o maior valor estimado de 69,70 mg foi obtido na ausência de ABA e, apesar da massa seca de raízes ter diminuído, conforme o aumento das concentrações do inibidor, na dose máxima (1 mg L⁻¹) ainda foi possível registrar o valor estimado de 39,36 mg. Esse fato pode estar associado ao efeito inibitório do ácido abscísico no crescimento das raízes em sistemas de cultivo *in vitro* (Pilet; Barlow, 1987). Nesse sentido, Kaminska et al. (2016) afirmam que a adição de ABA no meio de cultura reduziu significativamente o enraizamento de *Taraxacum ptenicum* Pawl.

O contrário se observa com a espécie *M. pseudoglaziovii*, que apresentou um modelo de equação linear crescente e maior valor estimado de 53,24 mg na dose de 1 mg L⁻¹, indicando que a massa seca de raízes foi incorporada com o aumento das concentrações de ABA.

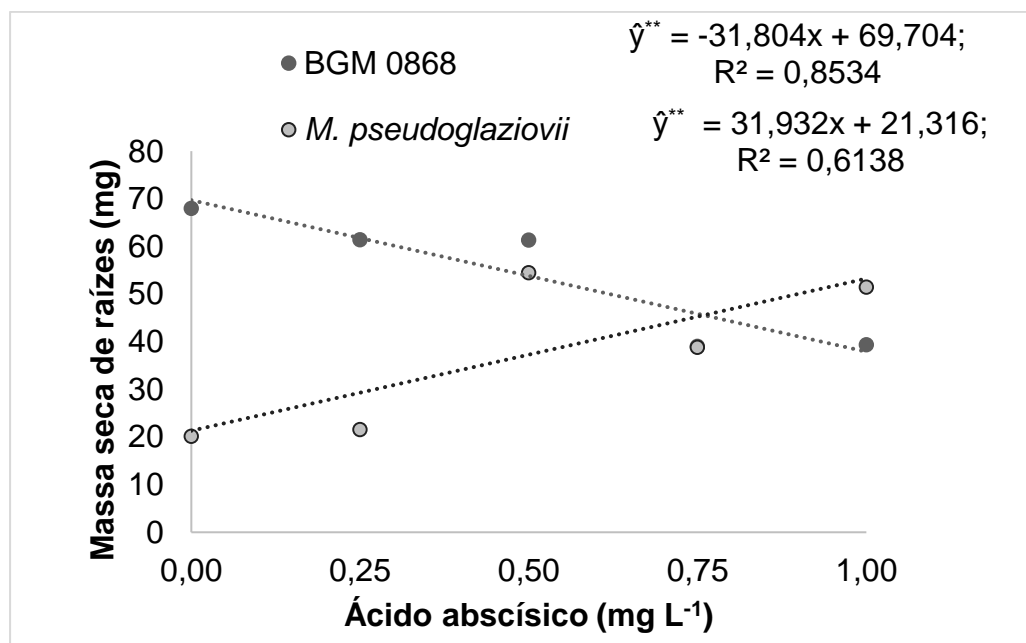


Figura 3. Massa seca de raízes produzida pelo BGM 0868 (Casca Fina) e *Manihot pseudoglaziovii* em função de cinco concentrações de ABA (mg L⁻¹), após 150 dias de conservação *in vitro*.

Em relação ao comportamento dos acessos em cada concentração de ABA para o número de folhas vivas (Tabela 3), observa-se que na ausência de ABA e na dose de 0,50 mg L⁻¹ não houve diferenças significativas entre eles. No geral, independentemente das concentrações do ácido abscísico, as espécies *M. flabellifolia* e *M. pseudoglaziovii* foram responsáveis, respectivamente, pelas médias mais altas e mais baixas na quantidade de folhas vivas. Em contrapartida, Cabrera et al. (2019) afirmam que durante a conservação *in vitro* de *Ipomoea batatas* (L.) não houve formação de folhas nas plantas cultivadas nos meios que continha ABA.

Tabela 3. Valores médios do número de folhas vivas, número de folhas senescentes e massa seca de raízes (mg) das plantas dos acessos BGM 0868 (Casca Fina), *Manihot chlorosticta*, *M. flabellifolia*, *M. pseudoglaziovii* e *M. tristis* em função das concentrações de ABA (mg L⁻¹), após 150 dias de conservação *in vitro*.

Acessos	Ácido abscísico (mg L ⁻¹)				
	0	0,25	0,50	0,75	1
	Número de folhas vivas				
BGM 0868	3,33 a	3,42 ab	4,00 a	6,80 a	5,82 a
<i>M. chlorosticta</i>	3,80 a	2,78 ab	1,13 a	5,10 ab	2,71 ab
<i>M. flabellifolia</i>	6,88 a	4,92 a	4,44 a	4,45 ab	6,50 a
<i>M. pseudoglaziovii</i>	4,38 a	1,71 b	3,00 a	1,87 b	1,60 b
<i>M. tristis</i>	6,33 a	5,09 a	4,00 a	4,83 ab	1,71 b
	Número de folhas senescentes				
BGM 0868	12,44 b	10,58 bc	14,00 c	8,40 b	11,91 bc
<i>M. chlorosticta</i>	11,40 b	13,89 c	11,62 bc	12,90 b	13,29 c
<i>M. flabellifolia</i>	8,25 ab	7,92 bc	5,33 ab	3,36 a	6,20 b
<i>M. pseudoglaziovii</i>	7,37 ab	6,00 b	6,50 abc	9,38 b	13,00 c
<i>M. tristis</i>	4,55 a	2,00 a	2,55 a	2,33 a	1,71 a
	Massa seca de raízes (mg)				
BGM 0868	67,94 a	61,37 a	61,32 a	39,02 a	39,36 ab
<i>M. chlorosticta</i>	28,52 b	29,11 b	67,14 a	26,4 ab	37,9 ab
<i>M. flabellifolia</i>	27,28 b	24,72 b	18,82 c	9,11 b	14,82 bc
<i>M. pseudoglaziovii</i>	20,16 b	21,54 b	54,45 ab	38,83 a	51,43 a
<i>M. tristis</i>	13,78 b	16,64 b	26,52 c	17,03 ab	12,16 c

Médias seguidas por letras diferentes na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Conforme a Tabela 3, para a variável número de folhas senescentes, nota-se que o acesso *M. tristis* foi responsável pelas médias mais baixas, sendo que na concentração de 1 mg L⁻¹ de ABA se obteve um valor de 1,71 diferindo estatisticamente dos demais acessos. O contrário se observa para *M. chlorosticta*, que alcançou a maior média de 13,89 na dose de 0,25 mg L⁻¹ de ABA. A senescência foliar é um processo desfavorável, pois, segundo Taiz; Zeiger (2017), além de provocar a degradação dos conteúdos celulares, também promove a destruição de algumas organelas, ocasionando danos na energia potencial da planta.

Ainda na Tabela 3, para a variável massa seca de raízes, médias superiores foram observadas no BGM 0868 (Casca Fina), na ausência e nas concentrações de 0,25 e 0,75 mg L⁻¹ de ABA. Médias elevadas também foram obtidas Para *M. Chlorosticta* na concentrações de 0,50 mg L⁻¹ e para *M. pseudoglaziovii*, nas concentrações de 0,75 e 1 mg L⁻¹ de ABA. Os demais genótipos apresentaram médias inferiores ou que não diferiram estatisticamente destas. Sato et al. (2001) relatam que o uso de ABA na micropropagação de algumas espécies beneficia o processo de formação de órgãos de reservas, enquanto Yamaguchi; Street (1977) afirmam que esse inibidor favorece o desenvolvimento de raízes, especialmente em baixas concentrações. No entanto, neste trabalho, a adição de ABA não refletiu em um aumento substancial na massa seca de raízes.

De acordo com Kerbauy (2008), o ácido abscísico atua bloqueando a ação de auxinas e giberelinas, tornando-o bastante utilizável na conservação *in vitro* de espécies vegetais. Nesse cenário, as respostas dos genótipos de *Manihot* em relação à adição de ABA ao meio de cultura foram as mais diversas possíveis e essas diferentes respostas morfogênicas durante a conservação *in vitro* podem estar relacionadas às características genéticas dos genótipos utilizados nesse estudo. Conclusão semelhante foi observada por Arrigoni-Blank et al. (2014), pois, ao conservarem diferentes genótipos de batata-doce, constataram que a adição de ABA no meio de cultivo foi satisfatória para alguns genótipos, enquanto que em outros provocou efeitos prejudiciais. Por sua vez, Sanghamitra et al. (2019) obtiveram resultados satisfatórios na redução do crescimento de *Dioscorea* utilizando doses mais elevadas (10 mg L⁻¹) de ABA.

Sabendo-se que o ABA interfere em muitos aspectos do desenvolvimento da planta, atuando como antagonista da ação dos promotores de crescimento (auxinas,

citocininas e giberelinas), diante de todo o contexto, ao considerar que as citocininas irão estimular as divisões celulares favorecendo o desenvolvimento da planta, neste trabalho, o efeito do ABA se mostrou superior, bloqueando a ação das citocininas e conseqüentemente inibindo o crescimento.

Dessa forma, Sato et al. (2001) afirmam que o efeito inibitório do ácido abscísico no crescimento e no desenvolvimento pode ser explorado para a conservação *in vitro* de germoplasma de mandioca, porém, para efetivar seu emprego, é necessário que mais estudos sejam realizados, haja vista que o ABA pode incrementar processos estimulatórios nos níveis morfológicos, fisiológicos, celulares e moleculares (PARTHIER et al., 1992).

Considerando a importância da manutenção dos recursos genéticos e as diferentes particularidades que as espécies silvestres apresentam, é necessário a realização de novos trabalhos testando as mesmas doses para acessos diferentes e doses mais altas para os acessos já em estudo, visando uma melhor definição da atuação desse inibidor no crescimento das plantas e assim facilitar a adequação dos protocolos para cada espécie.

CONCLUSÕES

A redução do crescimento das espécies *M. pseudoglaziovii*, *M. tristis* e *M. flabellifolia* foi superior às demais espécies estudadas, considerando-se as variáveis analisadas, durante o período de conservação *in vitro*.

A adição do ácido abscísico não promoveu o efeito esperado na redução do crescimento das plantas de todos os acessos analisados, não sendo possível recomendar uma única dose para a conservação *in vitro* das espécies em estudo.

REFERÊNCIAS

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

BARRUETO CID, L. P.; CARVALHO, L. L. C. B. Importance of abscisic acid (ABA) in the *in vitro* conservation of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Chilean Journal of Agricultural Research**, v. 68, n. 3, p. 304-308, 2008.

BELLO-BELLO, J. J.; GARCÍA-GARCÍA, G. G.; IGLESIAS-ANDREU, L. Conservación de vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks.) bajo condiciones de lento crecimiento *in vitro*. **Revista fitotecnia mexicana**, v. 38, n. 2, p. 165-171, 2015.

CABRERA, A. R.; TORRES, J. L.; VEGA, V. R. M.; PÉREZ, M. B.; PINO, A. S.; SÁNCHEZ, Y. Z. Conservación *in vitro* de cultivares de *Ipomoea batatas* (L.) Lam por crecimiento mínimo con el uso de manitol. **Biotecnología Vegetal**, v. 19, n. 1, p. 43-51, 2019.

FAO, FAOSTAT, DATABASE, CROP PRIMARY. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>>. FAOSTAT, DATABASE, CROP. Acesso em: 09. jul. 2021.

FERREIRA, E. B.; CAVALCANTI, P. P.; NOGUEIRA, D. A. Pacote experimental designs (Portuguese). R package version 1.2.0, 2018. Disponível em: <https://CRAN.R-project.org/package=ExpDes.pt>.

GIANFAGNA, T. J. Natural and synthetic growth regulators and their use in horticultural and agronomic crops. In: DAVIES, P. J. (ed.). **Plant hormones and their role in plant growth and development**. Dordrecht: Martinus Nijhoff Publishers, 1987. p. 614-635.

GOPAL, J; CHAMAIL, A; SARKAR, D. *In vitro* production of microtubers for conservation of potato germplasm: effect of genotype, abscisic acid, and sucrose. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 40, n. 5, p. 485-490, 2004.

KAMIŃSKA, M.; SKRZYPEK, E.; WILMOWICZ, E.; TRETYN, A.; TREJGELL, A. Effect of light conditions and ABA on cold storage and post-storage propagation of *Taraxacum pieninicum*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 127, n. 1, p. 25-34, 2016.

KERBAUY, G. B. **Fisiologia vegetal**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2008. 431 p.

KOVALCHUK, I.; LYUDVIKOVA, Y.; VOLGINA, M.; REED, B. M. Medium, container and genotype all influence *in vitro* cold storage of apple germplasm. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 96, n. 2, p. 127-136, 2009.

KURIA, P.; ILYASC, M.; ATEKAA, E.; MIANOD, D.; ONGUSOA, J.; CARRINGTONC, J. C.; TAYLORC, N. J. Differential response of cassava genotypes to infection by cassava mosaic geminiviruses. **Journal Virus Research**, v. 227, p. 69-81, 2017.

LEDO, C. A. da S.; SANTOS, V. D. S.; MARTIN, M.; ALVES, A.; SILVA, D. D.; SANTOS, A.; TAVARES FILHO, L. D. Q. **Hibridação interespecífica entre espécies silvestres de *Manihot* (Euphorbiaceae-Magnoliophyta) e cultivares de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz)**. Cruz das Almas, BA: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2014. 25 p. (Embrapa Mandioca e Fruticultura. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 65).

LEMOS, E. E. P. de. Ácido abscísico. In: BARRUETO CID, L. P. (ed.). **Introdução aos hormônios vegetais**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2000. p. 159-180.

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

MOOSIKAPALA, L.; TE-CHATO, S. Application of *in vitro* conservation in *Vetiveria zizanioides* Nash. **Journal of Agricultural Technology**, v. 6, n. 2, p. 401-407, 2010.

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

NASSAR, N. M. A. Mandioca: Uma opção contra a fome. Estudos e lições no Brasil e no mundo. **Ciência Hoje**, v. 39, n. 231, p. 30-36. 2006.

NASSAR, N. M. A.; GRATTAPAGLIA, D. Variabilidade de clones de mandioca em relação a fertilidade e aspectos morfológicos. **Turrialba**, v. 36, p. 555-559, 1986.

NASSAR, N. M. A.; SILVA, J. R.; VIEIRA, C. Hibridação interespecífica entre mandioca e espécies silvestres de *Manihot*. **Ciência e Cultura**, v. 38, p. 1058-1065. 1986.

PARTHIER, B.; BRUCKNER, C.; DATHE, W.; HAUSE, B.; HERRMANN, G.; KNÖFEL, H. D; KRAMELL, H. M.; KRAMELL, R.; LEHMANN, J.; MIERSCH, O.; REINBOTHE, S. T.; SEMBDNER, G.; WASTERACK, C.; NIEDEN, U. Z. Jasmonates: metabolism, biological activities, and modes of action in senescence and stress responses. **Progress in Plant Growth Regulation**, v. 13, p. 276-285, 1992.

PILET, P. E.; BARLOW, P. W. The role of abscisic acid in root growth and gravireaction: a critical review. **Plant Growth Regulation**, v. 6, p. 217-265, 1987.

R DEVELOPMENT CORE TEAM (2021). R: A language and environment for statistical computing, reference index version 3.4. R foundation for statistical computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0 <http://www.R-project.org>.

RAI, M. K; SHEKHAWAT, N. S; GUPTA, A. K; PHULWARIA, M.; RAM, K; JAISWAL, U. The role of abscisic acid in plant tissue culture: a review of recent progress. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 106, n. 2, p. 179-190, 2011.

REZENDE, R. A. L. S.; RODRIGUES, F. A.; REZENDE, R. M.; SOARES, J. D. R.; PASQUAL, M.; ASSIS, F. A. de. *In vitro* conservation of cape gooseberry through slow-growth nodal segment cultures. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 53, n. 5, p. 651-655, 2018.

ROCA, W. M.; NOLT, B; MAFLA, G.; ROA, J.; REYES, R. Eliminación de virus y propagación de clones en la yuca (*Manihot esculenta* Crantz). In: ROCA, W. M.; MROGINSKI, L. A. (ed.). **Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones**. Cali: CIAT, 1991. p. 403-420.

SÁ, A. de J.; LEDO, A. da S.; LEDO, C. A. da S. Conservação *in vitro* de microestacas de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). **Ciência Rural**, v. 41, n. 1, p. 57-62, 2011.

SANGHAMITRA, P.; SAMANTARAY, S.; BAGCHI, T. B.; MANDAL, B. B. Conservation of medicinal yam *in vitro*: Effect of ionic strength, sucrose, mannitol, ABA and low temperature. **Indian Journal of Horticulture**, v. 76, n. 4, p. 701-706, 2019.

SANTOS, M. da C.; LÉDO, A. da S.; LÉDO, C. A. da S.; SOUZA, F. V. D.; SILVA JUNIOR, J. F. da. Efeito da sacarose e do sorbitol na conservação *in vitro* de segmentos nodais de mangabeira. **Revista Ciência Agronômica**, v. 42, n. 3, p. 735-741, 2011.

SANTOS, T. C; ARRIGONI-BLANK, M. de F; BLANK, A. F. Propagação e conservação *in vitro* de vetiver. **Horticultura Brasileira**, v. 30, n. 3, p. 507-513, 2012.

SATO, A. Y.; MARIA, J.; SEDIYAMA, T.; BORÉM, A.; CECON, P. R.; JUNQUEIRA, C. S. Influência do ácido abscísico na micropropagação da cultura da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). **Acta Scientiarum**, v. 23, n. 5, p. 1235-1237, 2001.

SOUZA, A. da S.; SOUZA, F. V. D.; SANTOS-SEREJO, J. A. dos; JUNGHANS, T. G.; PAZ, O. P. da; MONTARROYOS, A. V. V.; SANTOS, V. da S.; MORAIS, L. S. **Preservação de germoplasma vegetal, com ênfase na conservação *in vitro* de**

variedades de mandioca. Cruz das Almas, BA: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2009. 24 p. (Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical. Circular Técnica, 90).

SOUZA, 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.** Cruz das Almas, BA: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2008. 12 p. (Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical. Circular Técnica, 88).

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal.** 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. 918 p.

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

VIEIRA, R. L.; SILVA, A. L. da; ZAFFARI, G. R.; FELTRIM, A. L. *In vitro* morphogenesis of garlic plants: The role of growth regulators in bulb induction and development. **Ciência Rural**, v. 44, n. 3, p. 439-445, 2014.

WATT, M. P.; THOKOANE, N. L.; MYCOCK, D.; BLAKEWAY, F. *In vitro* storage of *Eucalyptus grandis* germplasm under minimal growth conditions. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 61, n. 2, p. 161-164, 2000.

WERNER, E. T.; MOTTA, L. B.; MARTINS, M. Q.; LIMA, A. B. P.; SCHMILDT, E. R. Coeficiente de variação como medida da precisão em experimentos de cultura de tecidos de plantas. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, v. 8, n. 1/2, p. 27-36, 2013.

WITHERS, L. A.; WILLIAMS, J. T. Conservação *in vitro* de recursos genéticos de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas.** Brasília, DF: Embrapa-SPI: Embrapa-CNPq, 1998. p. 297-330.

YAMAGUCHI, T.; STREET, H. E. Stimulation of the growth of excised cultured roots of soya bean by abscisic acid. **Annals of Botany**, v. 41, n. 6, p. 1129-1133, 1977.

ARTIGO 2

**PACLOBUTRAZOL NA CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DE ESPÉCIES
SILVESTRES DO GÊNERO *Manihot*¹**

¹Artigo submetido ao periódico científico Ciência Agrônômica

PACLOBUTRAZOL NA CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DE ESPÉCIES SILVESTRES DO GÊNERO *Manihot*

RESUMO: O crescimento mínimo *in vitro* pode ser alcançado ao limitar o metabolismo da planta com a adição de retardantes de crescimento no meio de cultura e assim reduzir os subcultivos durante a preservação do germoplasma. Este trabalho teve como objetivo avaliar a ação do paclobutrazol em quatro acessos silvestres de *Manihot* e um de mandioca (*M. esculenta*) com o intuito de aperfeiçoar os protocolos para manutenção *in vitro* do germoplasma mediante o crescimento mínimo. O experimento foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Mandioca e Fruticultura, no delineamento inteiramente ao acaso, em esquema fatorial 5 x 5, sendo 5 doses de PBZ (0; 0,10; 0,20; 0,30 e 0,40 mg L⁻¹) e 5 espécies de *Manihot* (*M. flabellifolia*; *M. pseudoglaziovii*; *M. tristis*; *M. caerulescens* e *M. esculenta*), com 15 repetições. Como explantes foram utilizadas miniestacas com 1 cm de tamanho, cada uma inoculada em 10 mL do meio MS 0,01 solidificado com Phytigel® (2,4 g L⁻¹), contendo as doses de PBZ. Os tubos com essas miniestacas foram colocados em sala de conservação de germoplasma com irradiância de 20 µmol m⁻² s⁻¹, temperatura de 22±1 °C e fotoperíodo de 12 horas. Após 150 dias, foram analisadas as variáveis altura de planta (cm), números de folhas vivas e de folhas senescentes, número de brotos e de miniestacas (com 1 cm), massas fresca e seca de parte aérea e de raízes (mg). O PBZ provocou alterações morfofisiológicas no crescimento e suas doses entre 0,10 mg L⁻¹ e 0,26 mg L⁻¹ mostraram-se como as mais adequadas para a maioria dos acessos. Os acessos estudados apresentaram comportamentos distintos, reforçando a hipótese da dependência genotípica em relação à resposta individual de cada um dos materiais quando mantidos *in vitro*, dificultando o estabelecimento de um único protocolo para a conservação de todos.

Palavras-chave: preservação de germoplasma; cultura de tecidos; mandioca.

PACLOBUTRAZOL IN THE *IN VITRO* CONSERVATION OF WILD SPECIES OF THE GENUS *Manihot*

ABSTRACT: Minimal *in vitro* growth can be achieved by limiting plant metabolism by adding growth retardants to the culture medium and thus reducing subcultures during germplasm preservation. This study aimed to evaluate the action of paclobutrazol in four wild accessions of *Manihot* and one of cassava (*M. esculenta*) in order to improve the protocols for *in vitro* maintenance of germplasm through minimal growth. The experiment was carried out at the Laboratory of Tissue Culture of Embrapa Cassava and Fruticulture, in a completely randomized design, in a 5 x 5 factorial scheme, with 5 doses of PBZ (0; 0.10; 0.20; 0.30 and 0.40 mg L⁻¹) and 5 species of *Manihot* (*M. flabellifolia*; *M. pseudoglaziovii*; *M. tristis*; *M. caerulescens* and *M. esculenta*), with 15 replications. As explants, minicuttings with 1 cm in size were used, each one inoculated in 10 ml of MS 0.01 medium solidified with Phytigel® (2.4 g L⁻¹), containing the doses of PBZ. The tubes with these minicuttings were placed in a germplasm conservation room with an irradiance of 20 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, a temperature of 22±1 °C and a photoperiod of 12 hours. After 150 days, the variables plant height (cm), number of live and senescent leaves, number of shoots and mini-cuttings (with 1 cm), fresh and dry mass of shoots and roots (mg) were analyzed. PBZ caused morphophysiological changes in growth and its doses between 0.10 mg L⁻¹ and 0.26 mg L⁻¹ proved to be the most suitable for most accessions. The accessions studied showed different behaviors, reinforcing the hypothesis of genotypic dependence in relation to the individual response of each of the materials when kept *in vitro*, making it difficult to establish a single protocol for the conservation of all.

Keywords: germplasm preservation; tissue culture; cassava.

INTRODUÇÃO

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), pertencente à família Euphorbiaceae, é cultivada mundialmente, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais da África, Ásia e América Latina (KURIA et al., 2017), onde é uma cultura de grande importância alimentar devido ao alto consumo de suas raízes tuberosas, que são ricas em amido. Em 2020, a produção mundial de mandioca foi acima de 302 milhões de toneladas, sendo a Nigéria, República Democrática do Congo, Tailândia, Gana, Indonésia e Brasil (mais de 18 milhões de toneladas) os principais países produtores (FAO, 2020). Suas raízes servem de alimento básico para milhões de pessoas em todo o mundo, possuindo de 30% a 35% de amido e quantidades consideráveis de cálcio e vitamina C. Seu amido é amplamente utilizado no preparo de bolos, tortas, biscoitos, pães, polvilho, tapioca e entre outros produtos (RAJASEKHARAN; SAHIJRAM, 2015), enquanto as folhas, ricas em proteínas, são empregadas na alimentação animal e humana.

Por ser uma espécie de propagação vegetativa, muitos patógenos endógenos e sistêmicos que estão associados à vírus, bactérias, fungos e fitoplasmas são transmitidos juntamente com o material de plantio utilizado nos próximos cultivos (HOKANSON et al., 2016; THOMAS-SHARMA et al., 2017), o que implica na redução da produção de raízes, afetando diretamente a qualidade das safras.

Nesse contexto, as espécies silvestres do gênero *Manihot*, que é o mesmo da mandioca, possuem genes de resistência e tolerância, que permite através de cruzamentos, o desenvolvimento de variedades mais produtivas e menos susceptíveis aos principais fatores bióticos e abióticos (NASSAR, 2006). Somando-se a isso, os cruzamentos entre espécies silvestres e a cultivada são realizados com o intuito de aumentar a diversidade genética nos programas de melhoramento (SILVA et al., 2018). Nesse cenário e considerando-se também a preservação dos recursos genéticos, nota-se a importância e a necessidade de conservar essas espécies em Bancos Ativos de Germoplasma (BAGs), a campo e *in vitro*.

Nesse sentido, técnicas de cultura de tecidos podem ser utilizadas em associação com os sistemas clássicos de propagação e de conservação de germoplasma, com o intuito de superar limitações que afetam a cultura da mandioca. Entre os procedimentos utilizados *in vitro* para a conservação de germoplasma, o

método de crescimento mínimo tem sido praticado com sucesso, baseando-se em limitar o metabolismo da planta, que pode ocorrer com a adição de retardantes de crescimento no meio de cultivo.

Esses retardantes são compostos sintéticos que atuam restringindo o alongamento do caule, sem provocar reações tóxicas na planta (WITHERS; WILLIAMS, 1998; ARRIGONI-BLANK et al., 2014). Nesse âmbito, o PBZ é um retardante de crescimento que ao ser absorvido pelas folhas, caules e raízes é translocado através do xilema até os meristemas apicais de crescimento, ocorrendo a inibição da biossíntese das giberelinas. Essa inibição, conseqüentemente, irá reduzir a divisão e o alongamento celular, retardando o crescimento da planta sem causar fitotoxicidade (WITCHARD, 1997; SILVA et al., 2003; ZHENG et al., 2012; RADEMACHER, 2016).

Diante da importância de se conservar a diversidade genética e considerando a necessidade de preservar as espécies silvestres do gênero *Manihot*, assim como a insuficiência de estudos envolvidos nesse processo, faz-se necessário o desenvolvimento de estratégias para a conservação *in vitro* desse germoplasma. Dessa forma, este trabalho teve como objetivo avaliar a ação do paclobutrazol em quatro acessos silvestres de *Manihot* e um de mandioca (*M. esculenta*) com o intuito de aperfeiçoar os protocolos para manutenção *in vitro* do germoplasma mediante o crescimento mínimo.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi desenvolvido no período de outubro de 2019 a março de 2020 no Laboratório de Cultura de Tecidos (LCT), do Núcleo de Biologia Avançada (NBA), situado à Embrapa Mandioca e Fruticultura (CNPMPF), localizada em Cruz das Almas, Bahia. Neste estudo, foram utilizadas as espécies silvestres *Manihot flabellifolia* Pohl, *M. pseudoglaziovii* Pax & Hoffman, *M. tristis* Müll. Arg, *M. caerulescens* Pohl e o acesso BGM 0376 (Peri) de *M. esculenta* Crantz, pertencentes às coleções *in vitro* da Embrapa Mandioca e Fruticultura.

Para a obtenção dos explantes, utilizou-se plantas previamente micropropagadas, que, em câmara de fluxo laminar, foram seccionadas para obtenção de miniestacas com aproximadamente 1 cm de comprimento, contendo pelo menos uma gema. Em seguida, as miniestacas foram inoculadas em tubos de ensaio (2,5 cm

x 15 cm) contendo 10 mL do meio de cultura Murashige & Skoog (1962) modificado por SOUZA et al. (2008), suplementado com PBZ nas concentrações de 0 mg L⁻¹; 0,10 mg L⁻¹; 0,20 mg L⁻¹; 0,30 mg L⁻¹ e 0,40 mg L⁻¹, solidificado com Phytigel® (2,4 g L⁻¹), com pH ajustado para 5,8 e autoclavado por 20 min a 120 °C.

Empregou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado em esquema fatorial 5 x 5, composto por cinco concentrações de PBZ e cinco acessos de *Manihot*, com 15 repetições, em que cada parcela experimental foi constituída por um explante (miniestaca) cultivado em um tubo de ensaio.

Posteriormente, os tubos de ensaio que continham os explantes foram mantidos durante 150 dias em sala de conservação de germoplasma com irradiância de 20 µmol m⁻² s⁻¹, temperatura de 22±1 °C e fotoperíodo de 12 horas.

Após esse período, as plantas foram submetidas à avaliação das seguintes variáveis: altura de planta (AP; cm), número de folhas vivas (NFV), número de folhas senescentes (NFS), número de brotações (NB), número de miniestacas com tamanho de 1 cm (NME), massa fresca de parte aérea (MFPA; mg) e massa fresca de raízes (MFR; mg). Depois dessa avaliação, o material vegetal foi identificado e mantido em estufa com circulação de ar forçada e temperatura de 70 °C, e após 48 horas, quando o peso ficou constante, determinou-se as massas secas de parte aérea (MSPA; mg) e de raízes (MSR; mg).

Após a avaliação, os dados obtidos foram submetidos ao teste F da análise de variância. As médias dos acessos foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade e para as médias das concentrações de PBZ ajustou-se modelos de regressão polinomial. Os valores das variáveis altura de planta, número de folhas vivas, número de folhas senescentes, número de brotações e número de miniestacas foram transformados em $\sqrt{(x+0,5)}$, visando o atendimento das pressuposições da análise de variância. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o software R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2021).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O cultivo *in vitro* dos acessos utilizados nesse estudo sobre a aplicação do paclobutrazol (PBZ) originou plantas com diferenças significativas no crescimento. Conforme a Tabela 1, por meio da análise de variância, nota-se que os acessos, da

mesma maneira que as concentrações de PBZ, como fatores isolados, influenciaram de forma altamente significativa ($p < 0,01$) para todas as variáveis analisadas, com exceção das massas fresca e seca de raízes no fator isolado acessos ($p < 0,05$). Vale ressaltar também a interação altamente significativa entre acessos x PBZ para quase todas as variáveis, exceto para número de brotos e massa seca de raízes.

Tabela 1. Resumo da análise de variância para as variáveis: altura de planta (AP; cm), número de folhas vivas (NFV), número de folhas senescentes (NFS), número de brotações (NB), número de miniestacas (NME), massas fresca (MFPA; mg) e seca de parte aérea (MSPA; mg), massas fresca (MFR; mg) e seca de raízes (MSR; mg) dos acessos *Manihot flabellifolia*, *M. pseudoglaziovii*, *M. tristis*, *M. caerulescens* e BGM 0376 (Peri) de *M. esculenta*, em função de cinco concentrações de paclobutrazol (PBZ; mg L⁻¹), após 150 dias de conservação *in vitro*.

FV	GL	AP	NFV	NFS	NB	NME	MFPA	MSPA	MFR	MSR
PBZ	4	6,44**	4,45**	17,70**	0,63**	6,19**	314052,26**	4807,93**	180007,75**	5735,36**
Acessos	4	23,36**	1,95**	8,23**	0,74**	11,88**	395839,55**	5137,01**	85321,60*	753,93*
PBZ * Acessos	15	3,32**	1,02**	1,36**	0,16 ^{ns}	1,74**	114035,22**	1051,75*	102236,29**	406,11 ^{ns}
Resíduo	143	0,79	0,44	0,46	0,11	0,40	41487,13	526,86	28912,17	240,13
Média		13,15	5,21	7,71	0,53	7,23	373,70	50,67	328,66	29,86
CV (%)		25,77	29,31	25,47	36,30	24,41	54,40	45,30	51,74	51,90

^{ns} = não significativo, ** e * = significativo ao nível de 1% e 5% de probabilidade, respectivamente, pelo teste F da ANAVA.

Ainda de acordo com a Tabela 1, observa-se que os coeficientes de variação (CV) variaram de 24,41% a 54,40% para as variáveis número de miniestacas e massa fresca de parte aérea, respectivamente. Apesar das condições de cultivo *in vitro* (temperatura, luz e fotoperíodo) serem controladas nos experimentos realizados em cultura de tecidos, geralmente os coeficientes obtidos são elevados, pois cada variável é influenciada por fatores desconhecidos e não controlados em trabalhos dessa natureza (WERNER et al., 2013). Nesse contexto, Sá et al. (2018) obtiveram valores de CV's oscilando entre 12,88% e 72,46% na multiplicação *in vitro* de espécies silvestres de *Manihot*, enquanto Santos et al. (2021) conseguiram valores de CV's que variaram entre 12,70% e 30,06% também na multiplicação *in vitro* de espécies do mesmo gênero.

Na Tabela 2 observa-se os valores médios das variáveis que, isoladamente, apresentaram-se significativas para o fator acessos.

Tabela 2. Valores médios do número de brotações (NB), e massa seca de raízes (MSR; mg) dos acessos *Manihot flabellifolia*, *M. pseudoglaziovii*, *M. tristis*, *M. caerulescens* e BGM 0376 (Peri) de *M. esculenta*, em função de cinco concentrações de paclobutrazol (PBZ; mg L⁻¹), após 150 dias de conservação *in vitro*.

Acessos	NB	MSR
<i>M. flabellifolia</i>	0,86 a	27,43 ab
<i>M. pseudoglaziovii</i>	0,66 ab	30,83 ab
<i>M. tristis</i>	0,14 bc	37,07 a
<i>M. caerulescens</i>	0,26 abc	34,58 a
BGM 0376 (Peri)	0,05 c	22,44 b

Médias seguidas por letras diferentes nas colunas diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Nota-se que para a variável número de brotações apesar do BGM 0376 (Peri) não ter diferido estatisticamente dos acessos *M. tristis* e *M. caerulescens*, o mesmo, apresentou a menor média quando comparado aos demais acessos. Comportamento semelhante ocorreu com esse mesmo acesso (BGM 0376) na variável massa seca de raízes, mesmo não diferindo estatisticamente dos acessos *M. flabellifolia*, *M. pseudoglaziovii*.

A biossíntese de giberelinas é inibida pelo PBZ, pois mesmo ocorrendo divisão celular as novas células formadas não serão capazes de sofrer alongamento (INDRAYANTI et al., 2019). Considerando-se a análise da variável altura de planta, foi possível obter um ajuste de modelo de 2º grau com significado biológico apenas para *M. flabellifolia* e *M. pseudoglaziovii*. Desta forma, observa-se que para *M. pseudoglaziovii* a menor média (7,11 cm) foi obtida na dose estimada de 0,15 mg L⁻¹ de PBZ, indicando a eficiência do reagente na redução do crescimento das plantas para esse acesso. Para a *M. flabellifolia* a menor média ocorreu na ausência do PBZ, havendo aumento da altura até a concentração de 0,26 mg L⁻¹, onde obteve-se uma altura máxima estimada de 23,71 cm (Figura 1). Dessa maneira, o PBZ provocou efeito contrário, assim, é importante considerar a necessidade dos estudos com diferentes acessos silvestres, em função das variações principalmente genéticas que ocorrem entre eles, como se observa para esses dois acessos.

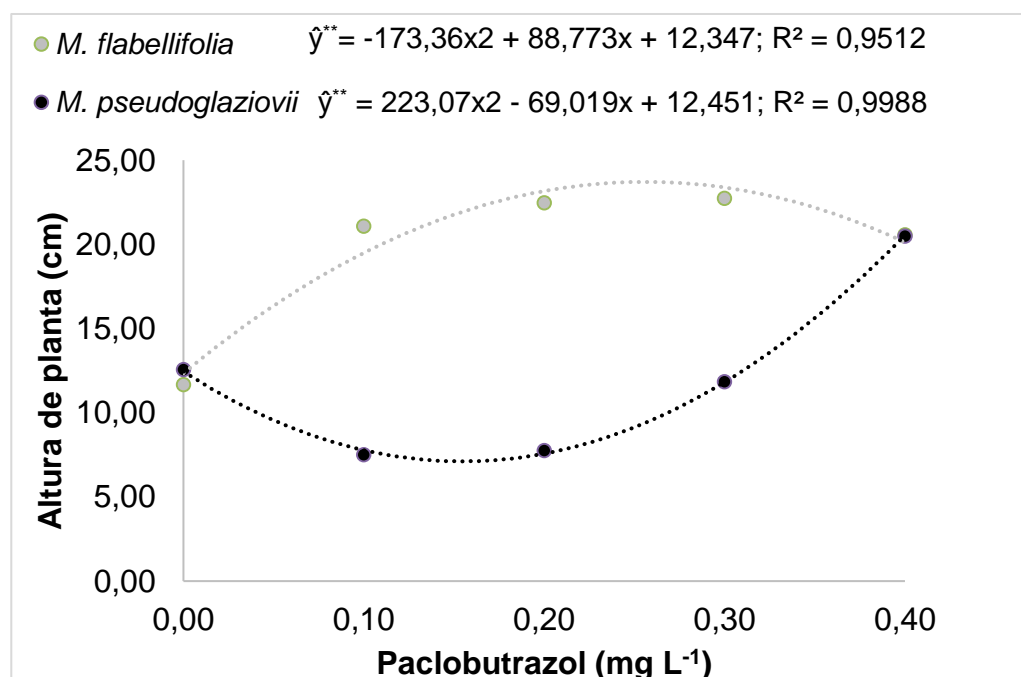


Figura 1. Altura de planta (cm) para *Manihot flabellifolia* e *M. pseudoglaziovii* em função de cinco concentrações de PBZ (mg L⁻¹), após 150 dias de conservação *in vitro*.

Nesse contexto, além da associação do PBZ com a inibição da síntese de giberelina, Te-chato et al. (2009) afirmam que o modo de atuação do paclobutrazol

pode estar relacionado com a diminuição na taxa de transpiração, altura da planta, biomassa e área foliar.

Com relação ao número de folhas vivas, para o BGM 0376 (Peri) e o acesso *M. caerulescens* foram ajustados modelos de equação linear decrescente, onde, respectivamente, os valores estimados de 9,81 e 7,51 foram obtidos na ausência de PBZ (Figura 2), indicando que a quantidade de folhas foi reduzida conforme o aumento das doses utilizadas. Esses resultados são semelhantes aos encontrados por Canto et al. (2004), que também observaram o maior número de folhas verdes na ausência de PBZ em estudo com o abacaxizeiro.

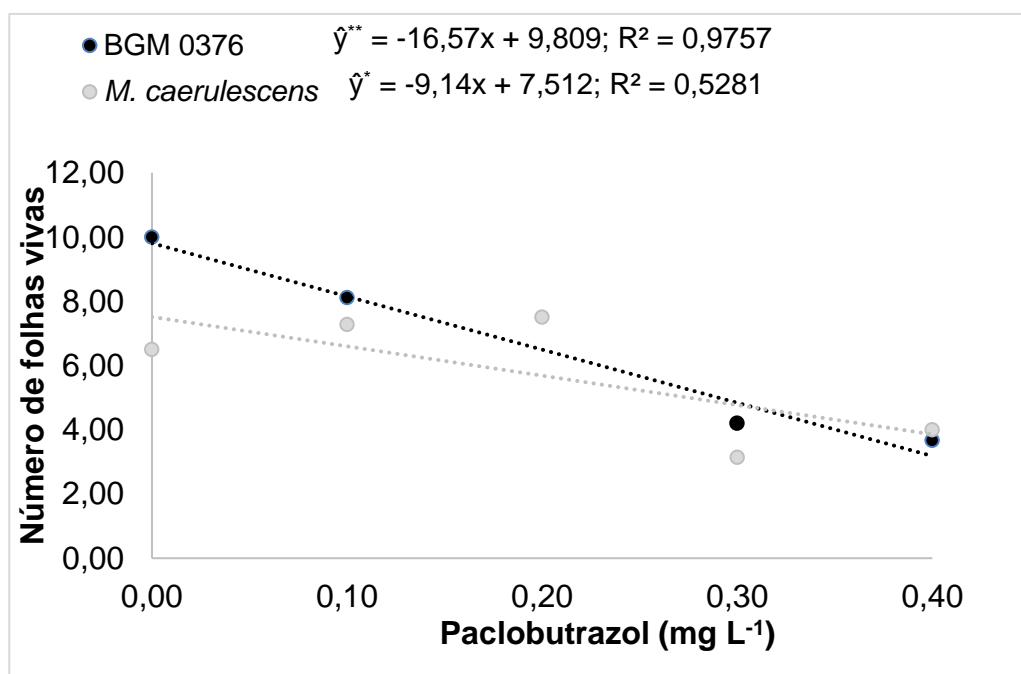


Figura 2. Número de folhas vivas em plantas do BGM 0376 (Peri) e de *Manihot caerulescens* em função de cinco concentrações de PBZ (mg L⁻¹), após 150 dias de conservação *in vitro*.

De acordo com a Figura 3, para a variável número de folhas senescentes observa-se um ajuste de equação de 2^o grau para o acesso *M. flabellifolia*, com o maior valor estimado de 13,47 obtido na concentração de 0,31 mg L⁻¹ de PBZ, enquanto que para a *M. pseudoglaziovii* o ajuste de modelo de 1^o grau crescente evidenciou que a quantidade de folhas senescentes aumentou à medida que as doses foram incrementadas, com o menor valor estimado de 2,32 ocorrendo na ausência de PBZ. Nesse contexto, Wu et al. (2019) relatam que doses mais altas de

PBZ podem estar diretamente relacionadas com a senescência progressiva nas plantas.

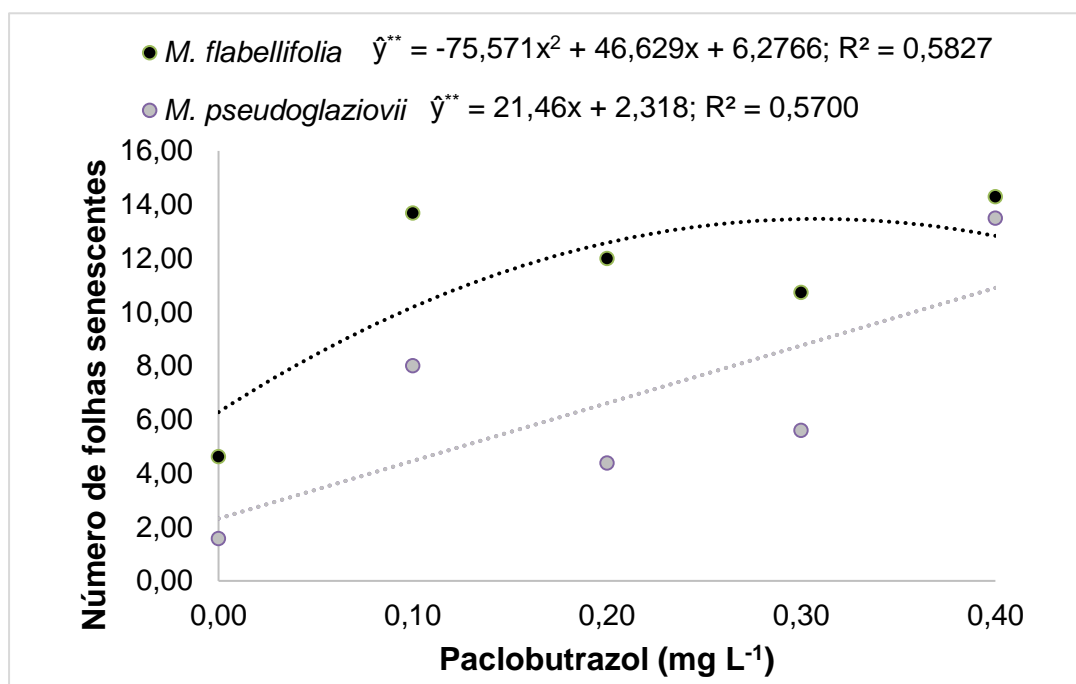


Figura 3. Número de folhas senescentes em plantas de *Manihot flabellifolia* e *M. pseudoglaziovii* em função de cinco concentrações de PBZ (mg L⁻¹), após 150 dias de conservação *in vitro*.

Para a variável número de miniestacas, nota-se que a maior média para *M. flabellifolia* ocorreu na dose de 0,24 mg L⁻¹ de PBZ, com um valor máximo estimado de 13,22, enquanto a concentração de 0,15 mg L⁻¹ proporcionou um valor mínimo estimado de 3,74 para o acesso *M. pseudoglaziovii*, que foi a menor média estimada (Figura 4). Portanto, com a média do número de miniestacas observada nesses acessos, provavelmente, pode-se garantir a preservação adequada e uma multiplicação eficiente após a etapa de manutenção, ao utilizar essas concentrações de PBZ.

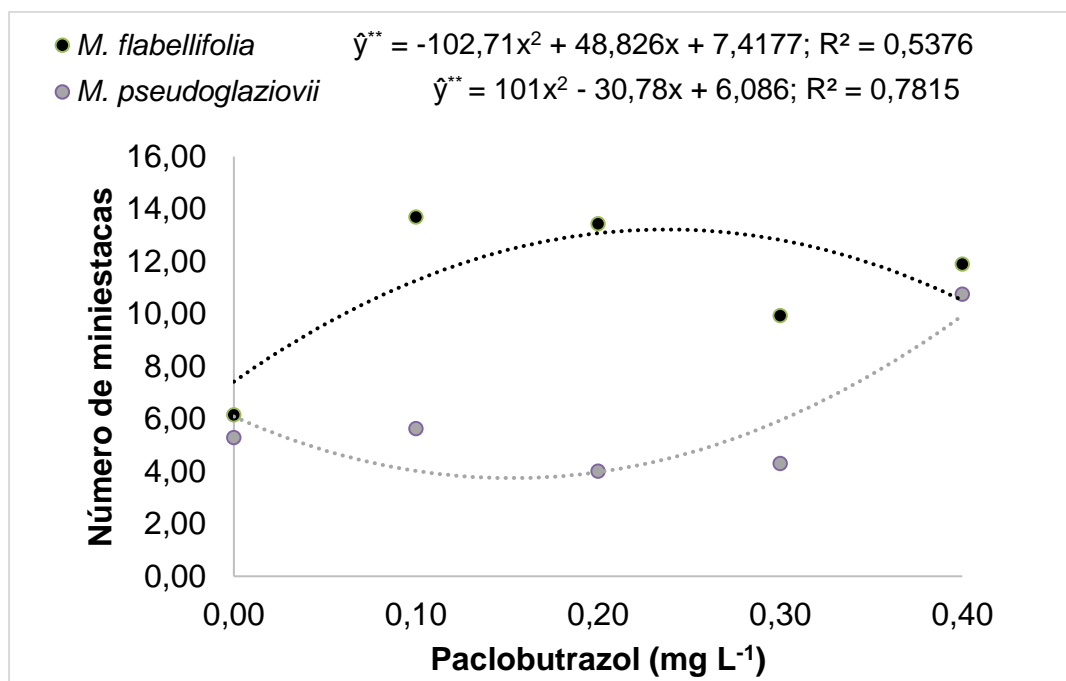


Figura 4. Número de miniestacas para os acessos *Manihot flabellifolia* e *M. pseudoglaziovii* em função de cinco concentrações de PBZ (mg L⁻¹), após 150 dias de conservação *in vitro*.

Na Figura 5, observa-se que para a variável massa fresca de parte aérea foi possível um ajuste de modelo de 2º grau com significado biológico para *M. flabellifolia*, onde o valor estimado de 687,30 mg foi obtido na dose ótima de 0,21 mg L⁻¹ de PBZ, onde tem-se a maior média. Além disso, conforme o modelo linear apresentado na Figura 5, a dose de 0,40 mg L⁻¹ de PBZ proporcionou um valor estimado de 417,40 mg para *M. pseudoglaziovii*, indicando que a massa fresca de parte aérea para essa espécie foi incrementada conforme o aumento das doses de PBZ.

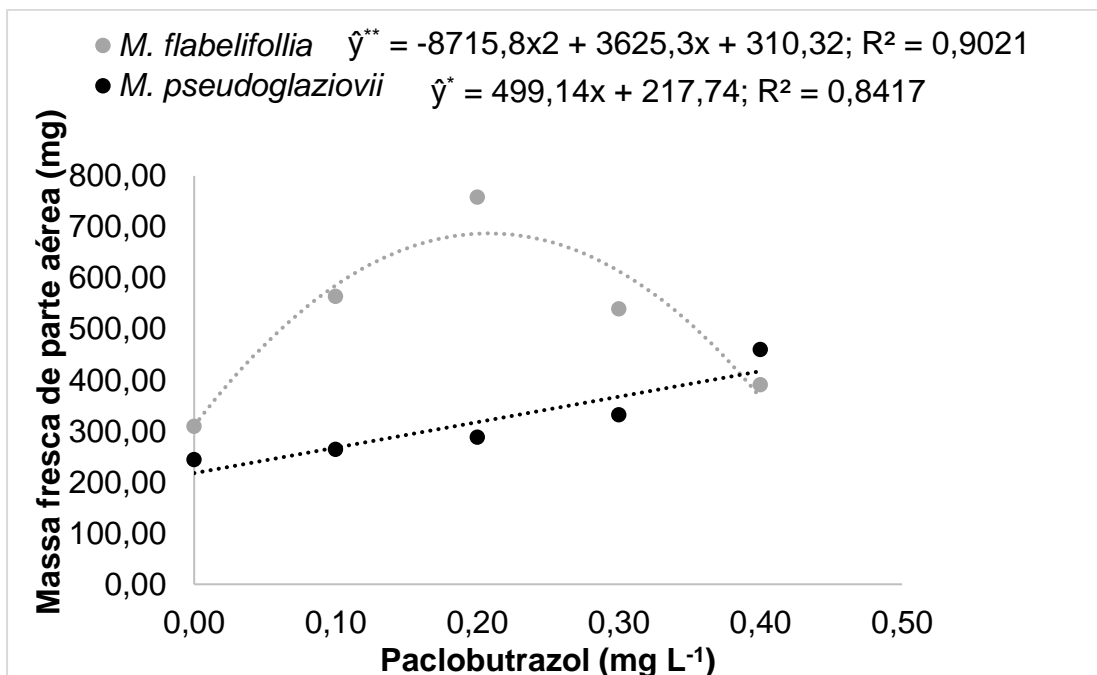


Figura 5. Massa fresca de parte aérea (mg) para os acessos *Manihot flabelifolia* e *M. pseudoglaziovii* em função de cinco concentrações de PBZ (mg L⁻¹), após 150 dias de conservação *in vitro*.

Nota-se que a interação dos fatores também foi significativa para a variável massa seca de parte aérea (mg) (Figura 6), onde o maior valor estimado de 83,71 mg foi obtido na dose de 0,23 mg L⁻¹ de PBZ, para o acesso *M. tristis*, enquanto os acessos *M. flabelifolia* e *M. pseudoglaziovii* apresentaram valores de 75,41 mg e 61,41 mg respectivamente, na dose de 0,40 mg L⁻¹ de PBZ, havendo aumento da massa seca com o acréscimo das concentrações de PBZ. Nesse contexto, apesar das concentrações ideais de PBZ variarem de acordo com a espécie, esse resultado é contrastante com os encontrados por Silva et al. (2019), que, ao avaliarem a massa seca de parte aérea na conservação *in vitro* de *Poincianella pyramidalis*, obtiveram a maior média de 131,35 mg na ausência desse regulador.

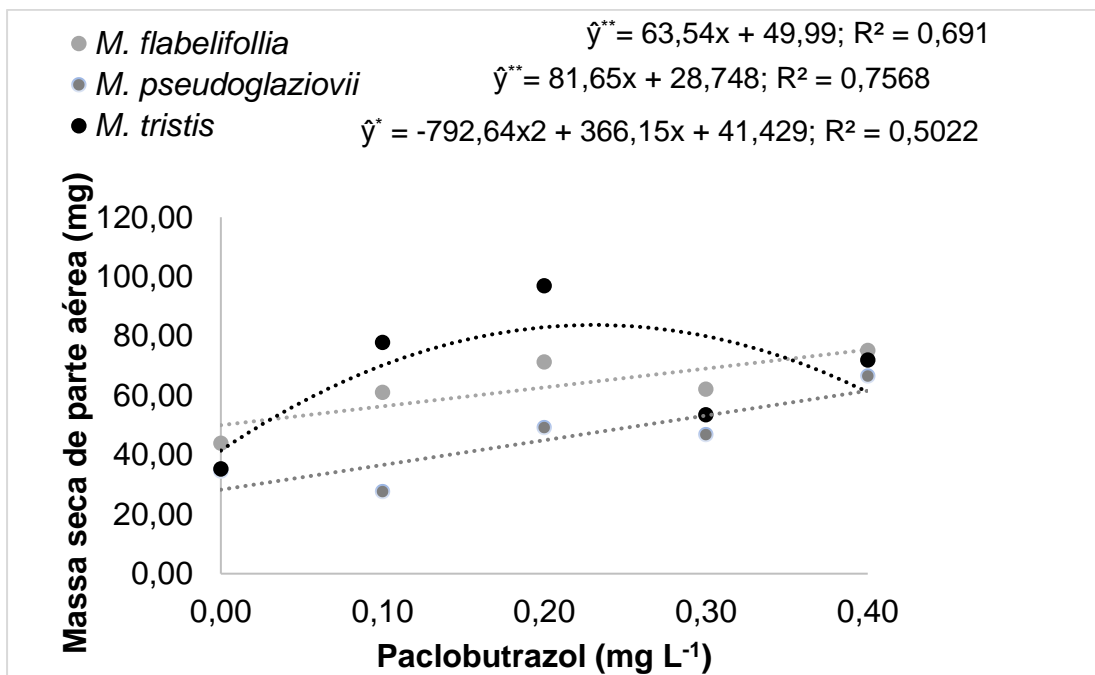


Figura 6. Massa seca de parte aérea (mg) para as espécies *Manihot flabelifolia*, *M. pseudoglaziovii* e *M. tristis* em função de cinco concentrações de PBZ (mg L⁻¹), após 150 dias de conservação *in vitro*.

Em se tratando da variável massa fresca de raízes, foi possível o ajuste de modelo de 2º grau apenas para o BGM 0376 (Peri), com valor mínimo estimado de 76,31 mg alcançado na concentração de 0,21 mg L⁻¹ de PBZ (Figura 7). Por outro lado, para as espécies *M. flabelifolia* e *M. pseudoglaziovii* foram ajustados modelos de 1º grau crescente, mostrando que o incremento gradual das doses de PBZ favoreceu o aumento da massa fresca de raízes das plantas; os valores máximos estimados de 434,11 mg e 461,11 mg foram obtidos na dose de 0,40 mg L⁻¹ de PBZ (Figura 7). Nota-se, portanto, que para essa variável o incremento gradual das concentrações do inibidor foi favorável, o que está condizente com as afirmações de Negi et al. (2017) e Te-chato et al. (2009) de que a ação do PBZ tem sido associada com o espessamento das raízes, indicando, inclusive, que a planta pode possuir mecanismos adaptativos para as condições *ex vitro*.

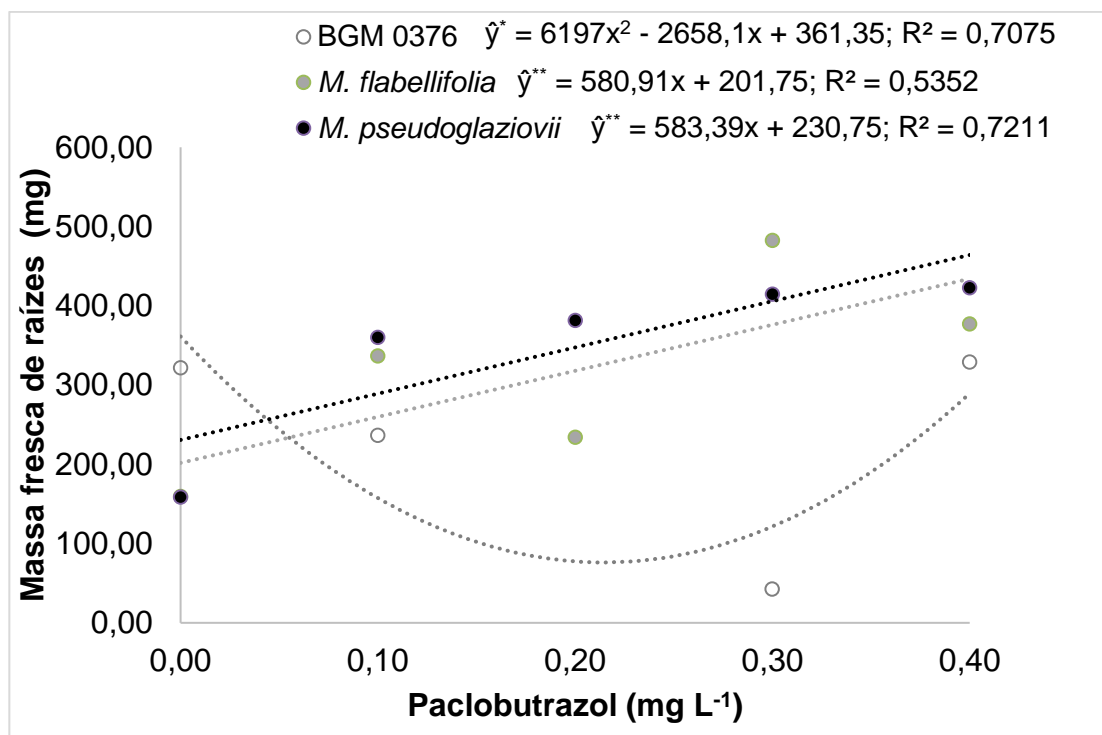


Figura 7. Massa fresca de raízes (mg) de plantas do BGM 0376 (Peri) e das espécies *Manihot flabellifolia* e *M. pseudoglaziovii* em função de cinco concentrações de PBZ (mg L⁻¹), após 150 dias de conservação *in vitro*.

Para a variável massa seca de raízes a interação entre os fatores não foi significativa, porém, a partir do valor estimado obtido através da equação polinomial para o fator isolado, a dose de 0,10 mg L⁻¹ de PBZ proporcionou um valor mínimo estimado de 21,11 mg (Figura 8). No entanto, pode-se observar que após a concentração de 0,10 mg L⁻¹ de PBZ, houve um aumento progressivo da massa seca de raízes até as doses mais altas do regulador PBZ. Novamente, esse fato pode ter ocorrido devido à ação do PBZ também estar associada ao espessamento radicular, o que pode ter aumentado consideravelmente o valor desta variável.

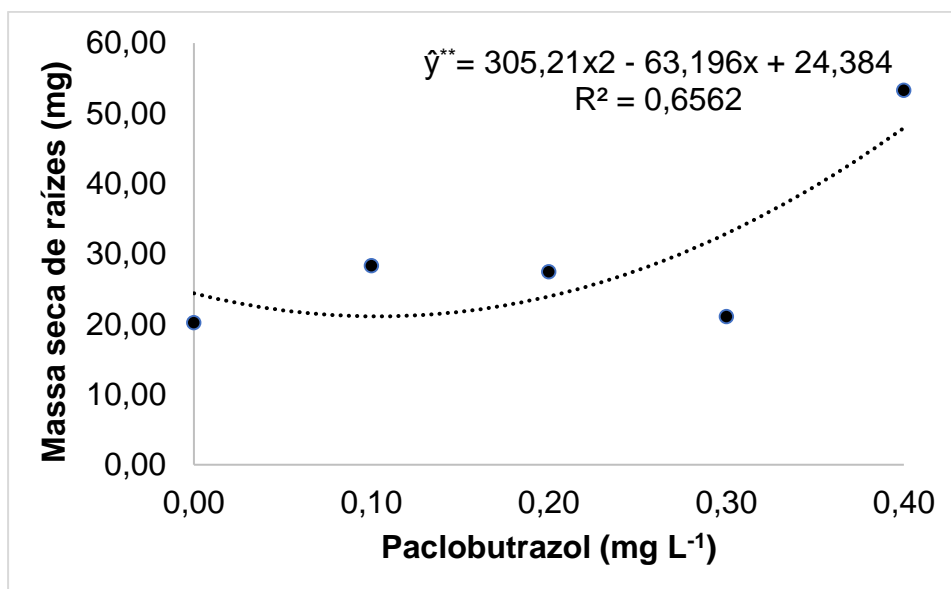


Figura 8. Massa seca de raízes (mg) dos acessos de *Manihot* em função de cinco concentrações de PBZ (mg L⁻¹), após 150 dias de conservação *in vitro*.

Na Tabela 2 pode-se observar o comportamento das espécies em cada concentração de PBZ para as variáveis que foram significativas. Os resultados gerados neste estudo apontam para o bom desenvolvimento e vigor das plantas. Para a altura de planta observa-se, considerando-se cada genótipo, que na concentração de 0,10 mg L⁻¹ o BGM 0376 (4,83 cm), *M. caerulescens* (8,63 cm) e *M. pseudoglaziovii* (7,50 cm) estatisticamente não diferem entre si, apresentando as menores médias. Na dose de 0,20 mg L⁻¹ as menores médias foram observadas nas espécies *M. pseudoglaziovii* e *M. tristis* (7,76 cm; 16,65 cm) e nas concentrações de 0,30 mg L⁻¹ e 0,40 mg L⁻¹ o BGM 0376, *M. caerulescens* e *M. tristis*. Esses resultados reforçam a afirmativa de D'Arêde et al. (2017), em que a redução de parte aérea pode estar relacionada com às alterações hormonais provocadas pelo PBZ, caracterizadas pela inibição da síntese de giberelinas, aumentando a quantidade de ácido abscísico e de citocininas nas células.

Tabela 2. Valores médios de altura de planta (cm), número de folhas vivas, número de folhas senescentes, número de miniestacas, massa seca de parte aérea (mg) e massas fresca e seca de raízes (mg) das plantas dos acessos BGM 0376 (Peri), *M. caerulescens*, *M. flabellifolia*, *M. pseudoglaziovii* e *M. tristis* em função das concentrações de PBZ (mg L⁻¹), após 150 dias de conservação *in vitro*.

Acesso	Paclobutrazol (mg L ⁻¹)				
	0,00	0,10	0,20	0,30	0,40
Altura de planta (cm)					
BGM 0376	6,73 ab	4,83 c	-	2,30 c	7,00 b
<i>M. caerulescens</i>	3,30 b	8,63 bc	18,68 a	3,84 c	12,24 ab
<i>M. flabellifolia</i>	11,67 ab	21,08 a	22,46 a	22,73 a	20,56 a
<i>M. pseudoglaziovii</i>	12,56 a	7,50 bc	7,76 b	11,85 b	20,49 a
<i>M. tristis</i>	8,74 ab	14,10 ab	16,65 ab	6,27 bc	17,12 ab
Número de folhas vivas					
BGM 0376	10,00 a	8,11 a	-	4,20 a	3,67 a
<i>M. caerulescens</i>	6,50 a	7,28 a	7,50 ab	3,14 a	4,00 a
<i>M. flabellifolia</i>	5,15 a	4,69 ab	9,00 ab	1,87 a	3,00 a
<i>M. pseudoglaziovii</i>	6,86 a	3,00 b	5,50 b	3,90 a	5,25 a
<i>M. tristis</i>	8,60 a	6,33 ab	14,50 a	4,67 a	4,20 a
Número de folhas senescentes					
BGM 0376	0,67 ab	5,89 a	-	2,60 a	7,33 a
<i>M. caerulescens</i>	0,50 a	9,57 ab	10,50 ab	2,71 a	8,80 a
<i>M. flabellifolia</i>	4,62 b	13,69 b	12,00 b	10,73 b	14,30 a
<i>M. pseudoglaziovii</i>	1,57 ab	8,00 ab	4,38 a	5,60 a	13,50 a
<i>M. tristis</i>	1,20 ab	11,33 ab	7,50 ab	2,83 a	10,40 a
Número de miniestacas					
BGM 0376	3,00 a	3,33 c	-	1,00 b	4,33 b
<i>M. caerulescens</i>	1,50 a	6,14 bc	11,25 a	1,71 b	7,40 ab
<i>M. flabellifolia</i>	6,15 a	13,69 a	13,43 a	9,93 a	11,90 a
<i>M. pseudoglaziovii</i>	5,28 a	5,62 c	4,00 b	4,30 b	10,75 a
<i>M. tristis</i>	4,00 a	11,67 ab	9,50 a	3,17 b	10,20 a
Massa fresca de parte aérea (mg)					
BGM 0376	230,40 a	302,18 b	-	94,32 b	146,00 a
<i>M. caerulescens</i>	160,82 a	414,08 ab	580,85 ab	157,31 b	258,30 a
<i>M. flabellifolia</i>	309,10 a	564,22 ab	758,53 a	539,27 a	391,07 a
<i>M. pseudoglaziovii</i>	244,20 a	264,14 b	287,75 b	331,80 ab	459,94 a
<i>M. tristis</i>	250,90 a	645,47 a	825,00 a	242,48 b	349,68 a
Massa seca de parte aérea (mg)					
BGM 0376	30,33 a	37,27 b	-	11,48 c	30,23 b

<i>M. caerulescens</i>	21,37 a	57,03 ab	74,50 ab	20,23 bc	55,24 ab
<i>M. flabellifolia</i>	43,93 a	61,01 ab	71,29 ab	62,11 a	75,15 a
<i>M. pseudoglaziovii</i>	35,30 a	27,61 b	49,16 b	46,78 ab	66,54 ab
<i>M. tristis</i>	35,22 a	77,87 a	96,95 a	53,52 a	71,94 a
Massa fresca de raízes (mg)					
BGM 0376	321,83 a	236,54 a	-	42,60 c	329,13 a
<i>M. caerulescens</i>	190,90 a	432,86 a	423,83 ab	104,64 c	498,92 a
<i>M. flabellifolia</i>	159,46 a	336,68 a	234,04 b	482,41 a	377,05 a
<i>M. pseudoglaziovii</i>	158,50 a	359,90 a	381,30 ab	414,59 ab	422,85 a
<i>M. tristis</i>	379,63 a	399,43 a	600,65 a	196,70 bc	487,74 a

- Não houve desenvolvimento de plantas. Médias seguidas por letras diferentes na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Em relação ao número de folhas vivas (Tabela 2), na ausência e nas concentrações de 0,30 mg L⁻¹ e 0,40 mg L⁻¹, não houve diferenças estatísticas entre os acessos. Entretanto, os acessos *M. tristis*, *M. flabellifolia*, *M. caerulescens* e o BGM 0376 apresentaram estatisticamente as maiores médias não diferindo entre si na concentração de 0,10 mg L⁻¹, com 0,20 mg L⁻¹ esses mesmos acessos, foram responsáveis pelas maiores médias, exceto o BGM 0376.

De modo geral, para o número de folhas senescentes é possível constatar que na ausência e nas concentrações de 0,10 mg L⁻¹, 0,20 mg L⁻¹ e 0,30 mg L⁻¹, todos os acessos exceto *M. flabellifolia* apresentaram as menores médias, não diferindo entre si. Na dose de 0,40 mg L⁻¹ de PBZ não houve diferenças estatísticas entre os acessos (Tabela 2). É importante salientar que o estágio fisiológico da planta é um indicador que pode colaborar na determinação do momento exato da realização de um novo subcultivo.

Os dados apresentados anteriormente são contrastantes aos resultados encontrados por Silva et al. (2019), que ao utilizarem o PBZ na conservação *in vitro* de *Poincianella pyramidalis* não verificaram influência significativa no comprimento da parte aérea, no número de folhas senescentes e no tamanho da maior raiz. Além disso, Siqueira et al. (2008) não observaram alteração no número médio de folhas do limoeiro 'Volkameriano' (*Citrus volkameriana* Pasq.), com o uso de PBZ.

Considerando que o número de miniestacas está diretamente relacionado com a regeneração das plantas, a concentração de 0,20 mg L⁻¹ de PBZ é bastante promissora para *M. flabellifolia* (13,43), *M. caerulescens* (11,25), e *M. tristis* (9,50) que estatisticamente apresentaram as maiores médias, uma vez que estes acessos

também apresentaram bons resultados no número de folhas vivas na dose citada. Considerando as especificidades de cada genótipo é possível perceber a partir dos resultados alcançados a influência genética sobre o processo propagativo, o que resultou em diferenças significativas entre os acessos. Novamente, a concentração de 0,20 mg L⁻¹ de PBZ proporcionou os maiores valores de massa fresca de parte aérea (mg) para *M. caerulescens* (580,85), *M. flabellifolia* (758,53) e *M. tristis* (825,00), o mesmo observa-se na concentração de 0,10 mg L⁻¹.

Ainda em relação à Tabela 2, para a variável massa seca de parte aérea pode-se observar que as espécies *M. caerulescens*, *M. flabellifolia* e *M. tristis*, foram estatisticamente superiores e apresentaram as maiores médias nas concentrações de 0,10 mg L⁻¹ e 0,20 mg L⁻¹. Com relação a massa fresca de raízes, na ausência e nas concentrações de 0,10 mg L⁻¹ e 0,40 mg L⁻¹, não houve diferenças estatísticas entre os acessos. Entretanto, as espécies *M. caerulescens*, *M. pseudoglaziovii* e *M. tristis*, foram estatisticamente superiores aos demais acessos na concentração de 0,20 mg L⁻¹ de PBZ. Dessa forma, Righeto et al. (2012) afirmam que o meio MS suplementado com PBZ favoreceu o desenvolvimento e vigor do sistema radicular das espécies de orquídeas *Cattleya labiata* Lindley e *C. eldorado* Linden cultivadas *in vitro*.

Mesmo com a variação dos resultados referentes à concentração ideal de paclobutrazol, ao se analisar as variáveis em conjunto, pode-se observar que a concentrações de 0,10 e 0,20 mg L⁻¹ de paclobutrazol são bastante promissoras, pois, proporcionaram bons resultados. Dessa forma, Sá et al. (2021) também obteve resultados satisfatórios com as doses citadas anteriormente de PBZ, na conservação *in vitro* das espécies *M. pseudoglaziovii* e *M. violácea*. Apesar do BGM 0376 (Peri) não ter apresentado formação de plantas para a dose de 0,20 mg L⁻¹, esse resultado não compromete o objetivo principal do trabalho, uma vez que, por se tratar de um acesso de *M. esculenta*, o mesmo foi utilizado para um efeito comparativo.

CONCLUSÕES

Na conservação *in vitro* dos acessos silvestres, as doses entre 0,10 mg L⁻¹ e 0,26 mg L⁻¹ de PBZ foram as mais adequadas para a maioria dos acessos.

Os acessos estudados apresentaram comportamentos distintos, reforçando a hipótese da dependência genotípica em relação à resposta individual de cada um dos

materiais quando mantidos *in vitro*, dificultando o estabelecimento de um único protocolo para a conservação de todos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

CANTO, A. M. M. E.; SOUZA, F. V. D.; COSTA, M. A. C.; SOUZA, A. da S.; LEDO, C. A. da S.; CABRAL, J. R. S. Conservação *in vitro* de germoplasma de abacaxi tratado com paclobutrazol. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, n. 7, p. 717-720, 2004.

D'ARÊDE, L. O.; MATSUMOTO, S. N.; SANTOS, J. L.; VIANA, A. E. S.; SILVA, P. A. R. Morfofisiologia do crescimento vegetativo inicial de cafeeiros arabica submetidos a aplicação via foliar de paclobutrazol. **Coffee Science**, v. 12, n. 3, p. 451-462, 2017.

FAO, FAOSTAT, DATABASE, CROP PRIMARY. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>>. FAOSTAT, DATABASE, CROP. Acesso em: 07. mar. 2022.

HOKANSON, K. E.; ELLSTRAND, N. C.; DIXON, A. G.; KULEMBEKA, H. P.; OLSEN, K. M.; RAYBOULD, A. Risk assessment of gene flow from genetically engineered virus resistant cassava to wild relatives in Africa: an expert panel report. **Transgenic Research**, v. 25, n. 1, p. 71-81, 2016.

INDRAYANTI, R.; PUTRI, R. E.; SEDAYU, A.; ADISYAHPUTRA, A. Effect of paclobutrazol for *in vitro* medium-term storage of banana variant cv. Kepok (*Musa acuminata* x *balbisiana* Colla). **AIP Publishing LLC**, v. 2019, n. 1, p. 0200091-0200099, 2019.

KURIA, P.; ILYASC, M.; ATEKAA, E.; MIANOD, D.; ONGUSOA, J.; CARRINGTONC, J. C.; TAYLORC, N. J. Differential response of cassava genotypes to infection by cassava mosaic geminiviruses. **Journal Virus Research**, v. 227, p. 69-81, 2017.

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

NASSAR, N. M. A. Mandioca: Uma opção contra a fome. Estudos e lições no Brasil e no mundo. **Ciência Hoje**, v. 39, n. 231, p. 30-36. 2006.

NEGI, S. S.; LAL, S.; SAH, H. Influence of growth retardant on vegetative growth and leaf chlorophyll content of jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*). **International Journal of Pure and Applied Bioscience**, v. 5, n. 1, p. 142-146, 2017.

R DEVELOPMENT CORE TEAM (2021). R: A language and environment for statistical computing. R foundation for statistical computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0 <http://www.R-project.org>.

RADEMACHER, W. Chemical regulators of gibberellin status and their application in plant production. In: HEDDEN, P.; THOMAS, S. G. (ed.). **The gibberellins**. Oxford: Willey Black, 2016. p. 359-403. (Annual Plant Reviews, 49).

RAJASEKHARAN, P. E.; SAHIJRAM, L. *In vitro* conservation of plant germplasm. In: BAHADUR, B.; RAJAM, M. V.; SAHIJRAM, L.; KRISHNAMURTHY, K. V. (ed.). **Plant biology and biotechnology**. New Delhi: Springer, 2015. p. 417-443. v. 2: Plant genomics and biotechnology.

RIGHETO, M. V. L.; ALMEIDA, L. V.; BRONDANI, G. E.; AMARAL, A. F. C.; ALMEIDA, M. Morfofisiologia de plântulas de *Cattleya labiata* Lindley e *Cattleya eldorado* Linden cultivadas *in vitro* sob influência de paclobutrazol. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 10, n. 1, p. 20-25, 2012.

SÁ, J. F. de; SAMPAIO, E. dos S.; MENDES, M. I. de S.; SANTOS, K. C. F. dos; SOUZA, A. da S.; LEDO, C. A. da S. Culture media for the multiplication of wild *Manihot* species. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 42, n. 6, p. 598-607, 2018.

SÁ, J. F. de; SILVEIRA, D. M. de S.; SANTOS, K. C. F. dos; SOUZA, A. da S.; LEDO, C. A. da S.; CARVALHO, M. de J. da S. de. Effects of different doses of paclobutrazol and sucrose in the minimum *in vitro* growth of wild species of *Manihot*. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 16, n. 2, p. 1-8, 2021.

SANTOS, K. C. F. dos; SILVEIRA, D. M. de S.; SOUZA, A. da S.; SÁ, J. F. de; LEDO, C. A. da S.; CARVALHO, M. de J. da S. de. *In vitro* multiplication of wild *Manihot* species with different naphthaleneacetic acid and benzylaminopurine concentrations. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 43, p. e52866, 2021.

SILVA, T. dos S.; NEPOMUCENO, C. F.; SOARES, T. L.; SANTANA, J. R. F. de. *In vitro* conservation of *Poincianella pyramidalis* (Tul.) LP Queiroz under minimal growth conditions. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 43, 2019.

SILVA, D. de C. S. da; MARTINS, M. L. L.; SANTOS, A. S.; SANTOS, V. da S.; ALVES, A. A. C.; LEDO, C. A. da S. Obtaining hybrids of cultivars and wild subspecies of cassava. *Pesq. Agrop. Bras.*, Brasília, v. 53, n. 2, p. 182-188, Feb. 2018.

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

SIQUEIRA, D. L. de; CECON, P. R.; SALOMÃO, L. C. C. Desenvolvimento do limoeiro 'Volkameriano' (*Citrus volkameriana* Pasq.) submetido a doses de paclobutrazol e ácido giberélico. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, n. 3, p. 764-768, 2008.

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**. Cruz das Almas, BA: Embrapa Mandioca e

Fruticultura Tropical, 2008. 12 p. (Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical. Circular Técnica, 88).

TE-CHATO, S.; NUJEEN, P.; MUANGSORN, S. Paclobutrazol enhance budbreak and flowering of Friederick's *Dendrobium* orchid in vitro **Journal of Agricultural Technology**, v. 5, n. 1, p. 157-165, 2009.

THOMAS-SHARMA, S.; ANDRADE-PIEDRA, J.; CARVAJAL YEPES, M.; HERNANDEZ NOPSA, J. F.; JEGER, M. J.; JONES, R. C. A.; GARRETT, K. A.; KROMANN, P.; LEGG, J. P.; YUEN, J.; FORBES, G. A. A risk assessment framework for seed degeneration: informing an integrated seed health strategy for vegetatively propagated crops. **Phytopathology**, v.107, n.10, p. 1123-1135, 2017.

WERNER, E. T.; MOTTA, L. B.; MARTINS, M. Q.; LIMA, A. B. P.; SCHMILDT, E. R. Coeficiente de variação como medida da precisão em experimentos de cultura de tecidos de plantas. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, v. 8, n. 1/2, p. 27-36, 2013.

WITCHARD, M. Paclobutrazol is phloem mobile in castor oil plant (*Ricinus communis* L.). **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 16, p. 215-217, 1997.

WITHERS, L. A.; WILLIAMS, J. T. Conservação *in vitro* de recursos genéticos de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: Embrapa-SPI: Embrapa-CNPq, 1998. p. 297-330.

WU, Y.; SUN, M.; ZHANG, J.; ZHANG, L.; REN, Z.; MIN, R.; WANG, X.; XIA, Y. Differential effects of paclobutrazol on the bulblet growth of oriental lily cultured *in vitro*: growth behavior, carbohydrate metabolism, and antioxidant capacity. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 38, n. 2, p. 359-372, 2019.

ZHENG, R.; WU, Y.; XIA, Y. Chlorocholine chloride and paclobutrazol treatments promote carbohydrate accumulation in bulbs of *Lilium* Oriental hybrids 'Sorbonne'. **Journal of Zhejiang University SCIENCE B**, v. 13, n. 2, p. 136-144, 2012.

ARTIGO 3

NITRATO DE PRATA NA CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DE ESPÉCIES SILVESTRES DO GÊNERO *Manihot*¹

¹Artigo a ser ajustado e submetido após definição da escolha do periódico científico

NITRATO DE PRATA NA CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DE ESPÉCIES SILVESTRES DO GÊNERO *Manihot*

RESUMO: O emprego do nitrato de prata na conservação de germoplasma se faz importante devido ao seu efeito inibitório sobre a ação do gás etileno, que se forma nos recipientes utilizados durante o cultivo *in vitro* e que pode provocar respostas negativas no desenvolvimento dos explantes e das plantas em si. Diante disso, este trabalho teve como objetivo avaliar a ação de diferentes concentrações de nitrato de prata (AgNO_3) em quatro acessos silvestres de *Manihot* e um acesso de mandioca (*M. esculenta* Crantz), com o intuito de aperfeiçoar as metodologias para conservação *in vitro* dessas espécies. O experimento foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Mandioca e Fruticultura, em delineamento inteiramente ao acaso, em esquema fatorial 6 [doses de AgNO_3 ($0,0 \text{ mg L}^{-1}$; $2,5 \text{ mg L}^{-1}$; $5,0 \text{ mg L}^{-1}$; $7,5 \text{ mg L}^{-1}$, $10,0 \text{ mg L}^{-1}$ e $12,5 \text{ mg L}^{-1}$)] x 5 [acessos de *Manihot* (*M. pseudoglaziovii*, *M. flabellifolia*, *M. caerulescens*, *M. chlorosticta* e a cultivar BGM 540 de *M. esculenta*)], com 15 repetições. Utilizou-se, como explantes, miniestacas com 1 cm de tamanho, cada uma inoculada em 10 mL do meio MS 0,01 solidificado com Phytigel® ($2,4 \text{ g L}^{-1}$), contendo as doses de AgNO_3 . Os tubos com os explantes foram mantidos em sala de conservação de germoplasma sob irradiância de $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, temperatura de $22 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas. Após 180 dias, foram analisadas as variáveis altura de planta (cm), número de folhas vivas, número de folhas senescentes, número de miniestacas (com 1 cm), massas fresca e seca de parte aérea (mg) e massas fresca e seca de raízes (mg). As plantas suplementadas com nitrato de prata apresentaram menores médias para altura, sem causar prejuízos nas demais variáveis. Além disso, as doses entre $7,28 \text{ mg L}^{-1}$ e $8,86 \text{ mg L}^{-1}$ de AgNO_3 foram as mais adequadas para a maioria dos acessos por terem proporcionado os melhores resultados no período de 180 dias de conservação *in vitro*.

Palavras-chave: biotecnologia vegetal; AgNO_3 ; crescimento mínimo.

SILVER NITRATE IN THE *IN VITRO* CONSERVATION OF WILD SPECIES OF THE GENUS *Manihot*

ABSTRACT: The use of silver nitrate in germplasm conservation is important due to its inhibitory effect on the action of ethylene gas, which is formed in containers used during *in vitro* cultivation and which can cause negative responses in the development of explants and plants in yes. Therefore, this study aimed to evaluate the action of different concentrations of silver nitrate (AgNO_3) in four wild accessions of *Manihot* and one accession of cassava (*M. esculenta* Crantz), in order to improve the methodologies for *in vitro* conservation of these species. The experiment was carried out at the Laboratory of Tissue Culture of Embrapa Cassava and Fruits, in a completely randomized design, in a 6 factorial scheme [AgNO_3 doses (0.0 mg L^{-1} ; 2.5 mg L^{-1} ; 5.0 mg L^{-1} ; 7.5 mg L^{-1} , 10.0 mg L^{-1} and 12.5 mg L^{-1})] x 5 [*Manihot* accessions (*M. pseudoglaziovii*, *M. flabellifolia*, *M. caerulescens*, *M. chlorosticta* and the cultivar BGM 540 of *M. esculenta*)], with 15 replications. Minicuttings measuring 1 cm in size were used as explants, each one inoculated in 10 mL of 0.01 MS medium solidified with Phytigel® (2.4 g L^{-1}), containing the doses of AgNO_3 . The tubes with the explants were kept in a germplasm conservation room under an irradiance of $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, a temperature of $22 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ and a photoperiod of 12 hours. After 180 days, the variables plant height (cm), number of live leaves, number of senescent leaves, number of mini-cuttings (with 1 cm), fresh and dry mass of aerial part (mg) and fresh and dry mass of roots (mg). The plants supplemented with silver nitrate had lower averages for height, without causing damage to the other variables. In addition, doses between 7.28 mg L^{-1} and 8.86 mg L^{-1} of AgNO_3 were the most suitable for most accessions as they provided the best results in the period of 180 days of *in vitro* conservation.

Keywords: plant biotechnology; AgNO_3 ; minimal growth.

INTRODUÇÃO

O gênero *Manihot* é nativo das regiões tropicais e está entre os mais importantes dentro da família Euphorbiaceae. A diversidade genética das espécies silvestres desse gênero existentes no Brasil constitui uma ampla base para os programas de melhoramento da espécie cultivada (*M. esculenta* Crantz), por apresentar genes de resistência e tolerância a alguns fatores bióticos e abióticos (NASSAR, 2006; ALBUQUERQUE et al., 2009; SIQUEIRA et al., 2010). Segundo Cordeiro et al. (2015), são reconhecidas aproximadamente 80 espécies de *Manihot*, sendo 20 de ocorrência no estado da Bahia. Porém, alguns autores citam que pelo menos 20 espécies de aproximadamente 80 existentes no País, são consideradas ameaçadas devido a alguns fatores como a perda e fragmentação de habitats, intempéries climáticas, modificações ambientais e ações antrópicas (ALLEM, 2002; NASSAR et al., 2008; GIANNINI et al., 2012).

Essas ameaças crescentes salientam a necessidade de medidas que atentem para a conservação dessas espécies, que pode ser mediante Bancos Ativos de Germoplasma (BAG). A conservação de germoplasma em campo é amplamente utilizada, porém, alguns autores salientam que plantas mantidas em campo estão expostas a perdas por diversos fatores bióticos e abióticos, ocasionando também diminuição de parte da variabilidade existente, além de ser uma alternativa mais onerosa (BRISON et al., 1995; EIRA, 2001; VIEIRA, 2013).

Dessa forma, a conservação *in vitro* é bastante utilizada na preservação de espécies, principalmente de propagação vegetativa, sendo que no caso do germoplasma de *M. esculenta* essa técnica é fundamental, uma vez que o protocolo para sua conservação *in vitro* encontra-se bem definido. Além disso, esse tipo de conservação, quando bem adaptado ao sistema de propagação da planta, favorece a manutenção de uma cópia genética, assegurando suas características após o período de armazenamento e reduzindo a possibilidade de perdas de acessos, pois permite manter um maior número de indivíduos ocupando uma estreita área (SANTOS et al., 2011).

Entretanto, Barrueto Cid e Carvalho (2008) relatam que a manutenção de coleções de germoplasma de mandioca empregando técnicas convencionais *in vitro*

é bastante laboriosa devido à alta frequência de subcultivos realizados a cada 60 ou 70 dias, dependendo do acesso.

Nesse caso, a conservação *in vitro* pode ser efetuada por meio de alterações realizadas no ambiente e no meio de cultivo, com o intuito de reduzir ou suprimir totalmente o crescimento de células, tecidos e órgãos (WITHERS; WILLIAMS, 1998). Conseqüentemente, tais alterações irão favorecer o prolongamento do intervalo entre os subcultivos (ROCA et al., 1991), diminuindo, então, o espaço necessário para a manutenção das plantas, a mão de obra e os custos durante a conservação, além de permitir o acesso imediato a todo o germoplasma da coleção.

Nessas circunstâncias, a vedação do recipiente de cultivo utilizado durante o desenvolvimento das plantas *in vitro* estimula a formação e o acúmulo do etileno, gás que em grandes concentrações induz a abscisão foliar, afeta o crescimento, a diferenciação e provoca o envelhecimento das plantas *in vitro* (HA et al., 2020). Assim, ao provocar diferentes respostas de acordo com a espécie, o etileno se constitui no principal gás envolvido no sistema de cultivo.

Segundo Donini et al. (2011), a formação do etileno durante o cultivo *in vitro* afeta diretamente o explante, que responde de forma positiva ou negativa. Dessa forma, vários trabalhos demonstram a atuação desse gás sobre as plantas (ADKINS et al., 1993; AGARWAL; BHOJWANI, 1993; NISSEN, 1994). Segundo Pasqual et al. (2002), alguns estudos relacionados com a inibição do etileno têm sido realizados devido a ação negativa desse gás nas espécies cultivadas *in vitro*. Entre eles, pode-se destacar o uso do nitrato de prata (AgNO_3), que atua inibindo a ação do etileno e, além disso, pode promover a proliferação de calos e a embriogênese somática (AL-KHAYRI; AL-BAHRANY, 2001).

Apesar dos métodos de conservação *in vitro* para *M. esculenta* serem bem estabelecidos, as espécies silvestres desse mesmo gênero apresentam diferentes respostas morfofisiológicas *in vitro*, que variam a depender da espécie. Assim, justifica-se a necessidade de estudos direcionados ao aperfeiçoamento de protocolos apropriados para um maior número de espécies silvestres do gênero. Nesse sentido, considerando à ação negativa que o etileno pode causar no cultivo *in vitro* e a capacidade que o nitrato de prata possui em atuar como um inibidor desse gás, o objetivo deste trabalho foi avaliar a ação de diferentes concentrações de nitrato de prata (AgNO_3) em quatro acessos silvestres de *Manihot* e um acesso de mandioca (*M.*

esculenta Crantz), com o intuito de aperfeiçoar as metodologias para conservação *in vitro* dessas espécies.

MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento foi instalado no Laboratório de Cultura de Tecidos (LCT) do Núcleo de Biologia Avançada (NBA), situado a Embrapa Mandioca e Fruticultura (CNPMPF), localizada em Cruz das Almas, Bahia. Nesse estudo, foram utilizados os seguintes acessos: *Manihot pseudoglaziovii* Pax & Hoffman, *M. flabellifolia* Pohl, *M. tristis* Müll. Arg. e *M. chlorosticta* Standl, e o acesso BGM 0540 (Guatiru) de *M. esculenta*, pertencentes a coleção *in vitro* da Embrapa Mandioca e Fruticultura.

Para o estabelecimento do protocolo de conservação *in vitro* dos acessos silvestres de *Manihot*, foram utilizadas plantas previamente micropropagadas. Em câmara de fluxo laminar, essas plantas foram seccionadas para obtenção de miniestacas com aproximadamente 1 cm de comprimento, contendo pelo menos uma gema. Em seguida, as miniestacas foram inoculadas em tubos de ensaio (2,5 cm x 15 cm) contendo 10 mL do meio de cultura Murashige & Skoog (1962) modificado por SOUZA et al. (2008), acrescentado das seguintes concentrações de AgNO_3 : 0,0 mg L^{-1} , 2,5 mg L^{-1} , 5,0 mg L^{-1} , 7,5 mg L^{-1} , 10,0 mg L^{-1} e 12,5 mg L^{-1} , solidificado com Phytigel® (2,4 g L^{-1}), pH ajustado para 5,8 e autoclavado por 20 min a 120 °C. Os tubos de ensaio com os explantes foram mantidos durante 180 dias em sala de conservação com irradiância de 20 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, temperatura de 22±1 °C e fotoperíodo de 12 horas.

Após o período de manutenção, as plantas foram submetidas à avaliação das seguintes variáveis: altura de planta (AP; cm), número de folhas vivas (NFV), número de folhas senescentes (NFS), número de miniestacas com tamanho de 1 cm (NME), massas frescas de parte aérea (MFPA; mg) e de raízes (MFR; mg). Depois disso, todo o material vegetal foi identificado e mantido em estufa com circulação de ar forçada e temperatura de 70 °C até alcançar peso constante para, então, determinar as massas secas de parte aérea (MSPA; mg) e de raízes (MSR; mg).

Empregou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado no esquema fatorial 5 x 6, sendo 5 acessos (1 acesso de mandioca e 4 acessos silvestres de *Manihot*) e 6 concentrações de AgNO_3 , contendo 15 repetições por tratamento,

sendo cada repetição constituída por um explante (miniestaca) cultivado em um tubo de ensaio.

Após a realização da avaliação, os dados obtidos foram submetidos ao teste F da análise de variância. As médias dos acessos foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade e para as médias das concentrações de AgNO₃ foram ajustados modelos de regressão polinomial. Os valores das variáveis altura de planta, número de folhas vivas, número de folhas senescentes, e número de miniestacas foram transformados em $\sqrt{(x+0,5)}$, visando o atendimento das pressuposições da análise de variância. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o software R (R Development Core Team, 2021).

RESULTADOS E DISCUSSÕES

De acordo com a Tabela 1, aos 180 dias de cultivo *in vitro* dos diferentes acessos de *Manihot*, houve variação altamente significativa ($p < 0,01$) dentro do fator AgNO₃ para todas as variáveis analisadas. Porém, para o número de folhas vivas, não foi possível um ajuste de equação com significado biológico. Observou-se que em relação aos acessos e na interação entre os fatores analisados as respostas também foram altamente significativas ($p < 0,01$) para todas as variáveis, com exceção do número de folhas vivas.

Tabela 1. Resumo da análise de variância para as variáveis: altura de planta (AP; cm), número de folhas vivas (NFV), número de folhas senescentes (NFS), número de miniestacas (NME), massas fresca (MFPA; mg) e seca de parte aérea (MSPA; mg), massas fresca (MFR; mg) e seca de raízes (MSR; mg) dos acessos *Manihot pseudoglaziovii*, *M. flabellifolia*, *M. tristis*, *M. chlorosticta*, e a cultivar BGM 0540 de *M. esculenta*, em função de cinco concentrações de nitrato de prata (AgNO₃; mg L⁻¹), após 180 dias de conservação *in vitro*.

FV	GL	AP	NFV	NFS	NME	MFPA	MSPA	MFR	MSR
AgNO₃	4	21,06**	0,94**	6,08**	6,83**	627,96**	87,04**	378,25**	30,31**
Acessos	4	1,47**	0,12 ^{ns}	5,55**	0,84**	63,31**	5,05**	206,94**	21,49**
AgNO₃*Acessos	20	0,55**	0,24 ^{ns}	0,77**	0,27**	13,50**	1,97**	26,46**	3,01**
Resíduo	395	0,11	0,16	0,18	0,07	4,24	0,69	6,97	0,65
CV%		18,02	23,31	27,19	17,53	24,94	26,6	31,01	27,68
Média		3,27	2,58	2,34	2,06	80,3	11,11	87,68	9,44

^{ns} não significativo, ** e * significativo ao nível de 1% e 5 % de probabilidade, respectivamente, pelo teste F da ANAVA.

Verificou-se que os coeficientes de variação (CVs) variaram de 17,53% a 31,01% para as variáveis número de miniestacas e massa fresca de raízes, respectivamente (Tabela 1). Essa variação pode ser explicada devido a grande variabilidade genética existente dentro do gênero *Manihot* e, além disso, nos trabalhos realizados em cultura de tecidos os coeficientes costumam ser elevados. Dessa forma, Sá et al. (2021) encontrou valores de CV's variando entre 10,54% e 36,96% na conservação *in vitro* de espécies silvestres de *Manihot*, resultados semelhantes aos obtidos por Santos et al. (2021), que encontraram valores de CV's oscilando entre 12,70% e 30,06% na multiplicação *in vitro* de espécies do mesmo gênero.

Levando-se em consideração que a interação acessos x AgNO₃ foi significativa para quase todas as variáveis, para a variável altura de planta, observa-se que todos os acessos apresentaram comportamentos semelhantes, sendo possível obter um ajuste de modelo de 2º grau com significado biológico (Figura 1). Dessa forma, valores estimados de 0,92, 0,73, 1,39, 1,34 e 1,19 cm foram obtidos nas doses de 8,40, 8,18, 7,83, 8,23 e 8,17 mg L⁻¹ de AgNO₃ para os acessos *M. pseudoglaziovii*, *M. flabellifolia*, *M. tristis*, *M. chlorosticta* e BGM 0540, respectivamente, indicando que houve redução do crescimento das plantas para todos os acessos. Esses resultados, para a conservação *in vitro*, se constituem em um aspecto bastante viável, pois mantém as plantas por mais tempo com crescimento reduzido. No entanto, eles diferem dos encontrados por Ravi et al. (2019), que ao adicionarem AgNO₃ no meio de cultura, obtiveram um melhor crescimento *in vitro* em plantas de *Moringa oleifera* Lam.

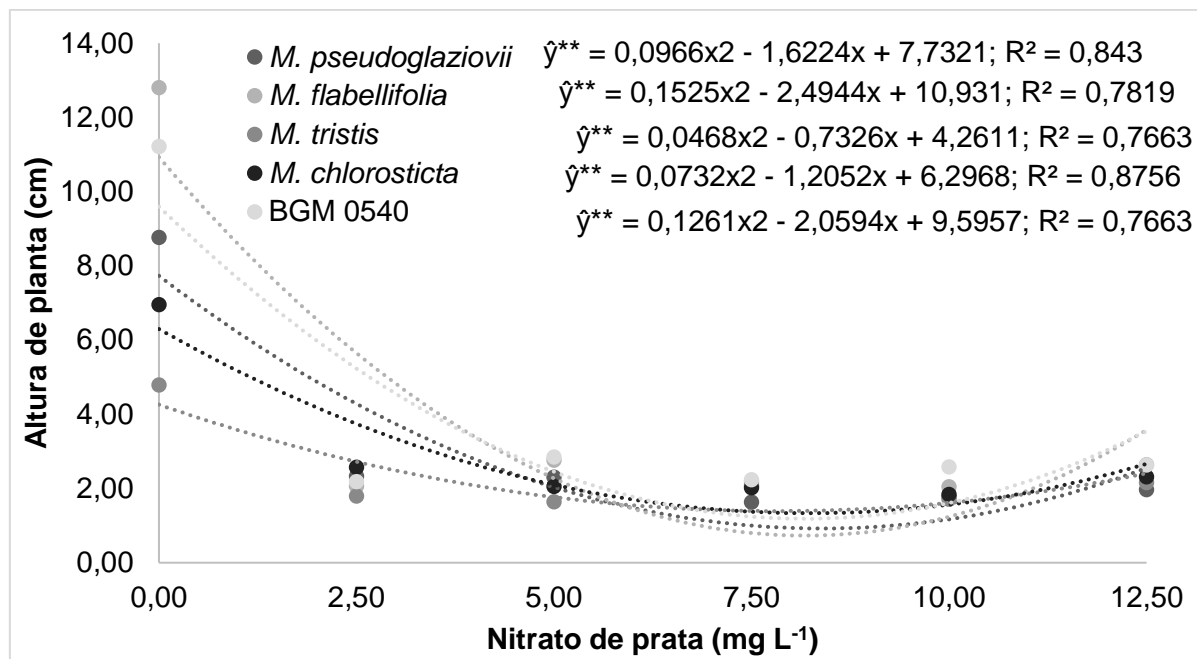


Figura 1. Altura de planta (cm) para os acessos *Manihot pseudoglaziovii*, *M. flabellifolia*, *M. tristis*, *M. chlorosticta* e BGM 0540 em função de seis concentrações de AgNO_3 (mg L^{-1}), após 180 dias de conservação *in vitro*.

A senescência foliar é um processo de envelhecimento que induz à morte celular e que faz parte do desenvolvimento da planta. Em relação à Figura 2, nota-se que para a variável número de folhas senescentes houve uma relação quadrática para os acessos *M. flabellifolia*, *M. chlorosticta* e BGM 0540, onde os menores valores estimados de 1,26, 1,25 e 1,54 foram obtidos nas doses de 8,82, 8,14 e 7,30 mg L^{-1} de AgNO_3 , respectivamente (Figura 2). Por outro lado, a relação linear para o acesso *M. pseudoglaziovii* demonstrou que o menor valor de 1,37 ocorreu na dose de 12,50 mg L^{-1} de AgNO_3 .

De acordo com Gao et al. (2017), o etileno é um hormônio vegetal que pode desencadear vários processos no desenvolvimento das plantas, sendo seu acúmulo prejudicial ao cultivo *in vitro*, pois pode provocar reações de oxidação, hiperidricidade e senescência na planta. Nesse contexto, considerando-se os resultados obtidos para número de folhas senescentes, o AgNO_3 pode ter inibido a ação do etileno, uma vez que os valores foram relativamente mais baixos na presença desse inibidor.

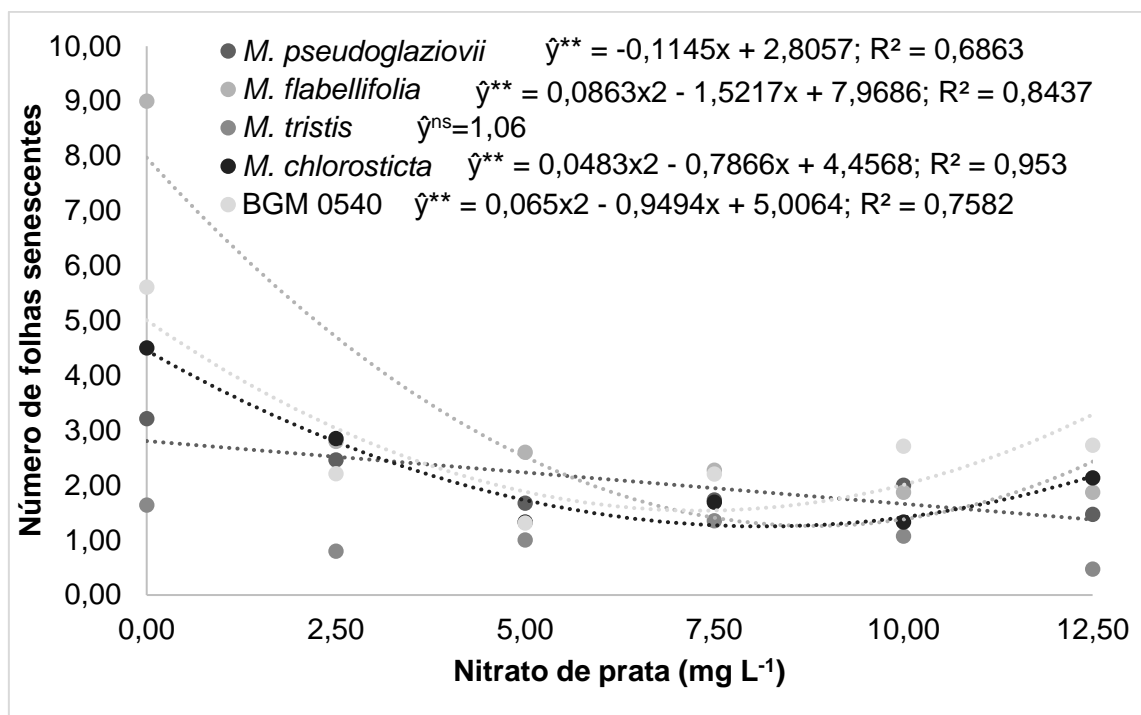


Figura 2. Número de folhas senescentes para os acessos *Manihot pseudoglaziovii*, *M. flabellifolia*, *M. tristis*, *M. chlorosticta* e BGM 0540 em função de seis concentrações de AgNO₃ (mg L⁻¹), após 180 dias de conservação *in vitro*.

De acordo com as equações apresentadas na Figura 3 para a variável número de miniestacas, os acessos *M. pseudoglaziovii*, *M. flabellifolia*, *M. chlorosticta* e BGM 0540 apresentaram os menores valores estimados de 0,75, 1,03, 1,13 e 1,26 nas doses de 7,93, 7,95, 7,80 e 7,82 mg L⁻¹ de AgNO₃, respectivamente. Dessa forma, é importante considerar que essa variável está relacionada com a altura de planta e que, apesar da redução do crescimento das plantas na presença do AgNO₃, foi possível obter números médios de miniestacas que permitirão a multiplicação *in vitro* dos acessos estudados após o período de conservação.

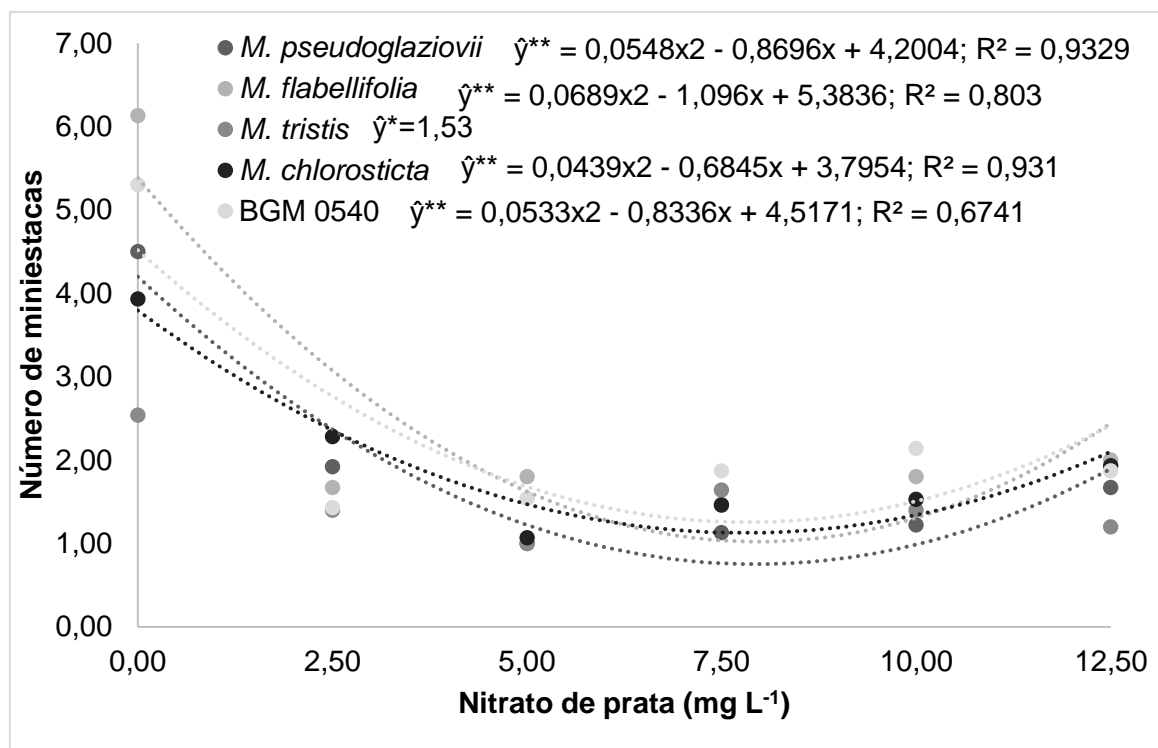


Figura 3. Número de miniestacas para os acessos *Manihot pseudoglaziovii*, *M. flabellifolia*, *M. tristis*, *M. chlorosticta* e BGM 0540 em função de seis concentrações de AgNO₃ (mg L⁻¹), após 180 dias de conservação *in vitro*.

Para a variável massa fresca de parte aérea, observa-se que todos os acessos apresentaram comportamentos semelhantes com relação ao ajuste de modelo de 2º grau e com significado biológico para todos (Figura 4). Dessa forma, os acessos *M. pseudoglaziovii*, *M. flabellifolia*, *M. tristis*, *M. chlorosticta* e BGM 0540 apresentaram os menores valores estimados de 39,11, 26,63, 29,20, 21,95 e 26,08 mg nas doses de 8,50, 8,14, 8,02, 8,41 e 8,58 mg L⁻¹ de AgNO₃, respectivamente.

Além disso, esses resultados estão relacionados com os valores de altura de planta, uma vez que houve redução do crescimento das plantas, implicando na diminuição dos valores também para a variável massa fresca de parte aérea.

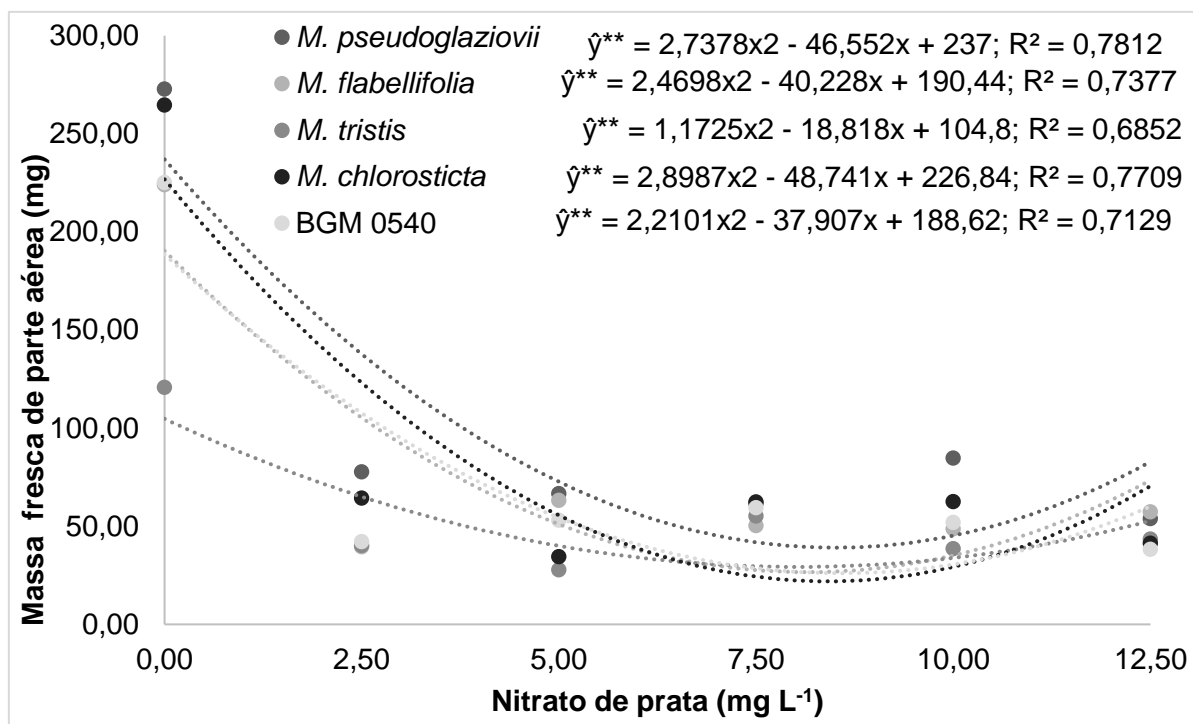


Figura 4. Massa fresca de parte aérea (mg) para para os acessos *Manihot pseudoglaziovii*, *M. flabellifolia*, *M. tristis*, *M. chlorosticta* e BGM 0540 em função de seis concentrações de AgNO_3 (mg L^{-1}), após 180 dias de conservação *in vitro*.

Na figura 5, observa-se que houve um efeito quadrático para todos os acessos, por apresentarem comportamentos semelhantes na variável massa seca de parte aérea. Com isso, os menores valores estimados de 6,06, 3,18, 4,23, 2,06 e 3,44 mg foram obtidos nas doses de 8,70, 8,64, 7,36, 8,49 e 8,50 mg L^{-1} de AgNO_3 para os acessos *M. pseudoglaziovii*, *M. flabellifolia*, *M. tristis*, *M. chlorosticta* e BGM 0540, respectivamente.

De maneira geral, os resultados obtidos para essas duas últimas variáveis foram satisfatórios quando comparados com os resultados alcançados por Zhang et al. (2001), que apesar de trabalharem na organogênese da parte aérea de cotilédones somáticos de mandioca também obtiveram melhores resultados utilizando o AgNO_3 .

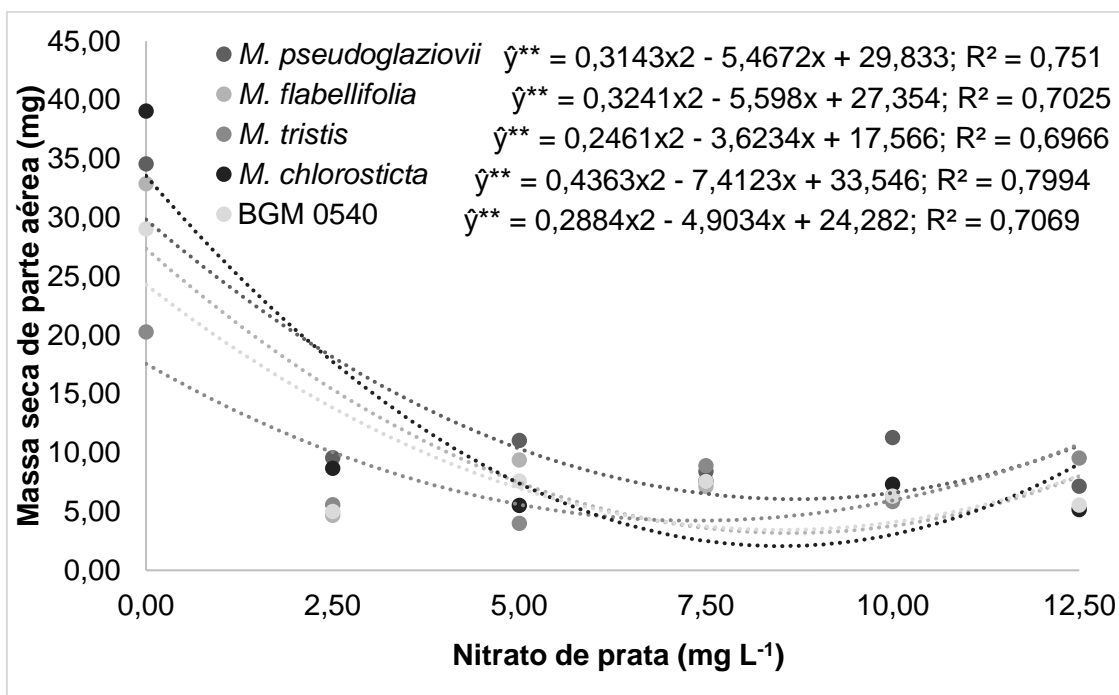


Figura 5. Massa seca de parte aérea (mg) para os acessos *Manihot pseudoglaziovii*, *M. flabellifolia*, *M. tristis*, *M. chlorosticta* e BGM 0540 em função de seis concentrações de AgNO₃ (mg L⁻¹), após 180 dias de conservação *in vitro*.

Na variável massa fresca de raízes (Figura 6), foram ajustados modelos de 2^o grau e com significado biológico para os acessos *M. pseudoglaziovii*, *M. flabellifolia*, *M. tristis* e *M. chlorosticta*, onde os menores valores estimados de 18,89, 60,98, 9,88 e 26,50 mg foram obtidos nas doses de 7,52, 8,86, 8,69 e 7,43 mg L⁻¹ de AgNO₃, respectivamente. Nesse contexto, Syahid; Wahyuni (2019) também obtiveram resultados satisfatórios ao utilizar o AgNO₃ no enraizamento *in vitro* de *Hypericum perforatum* L.

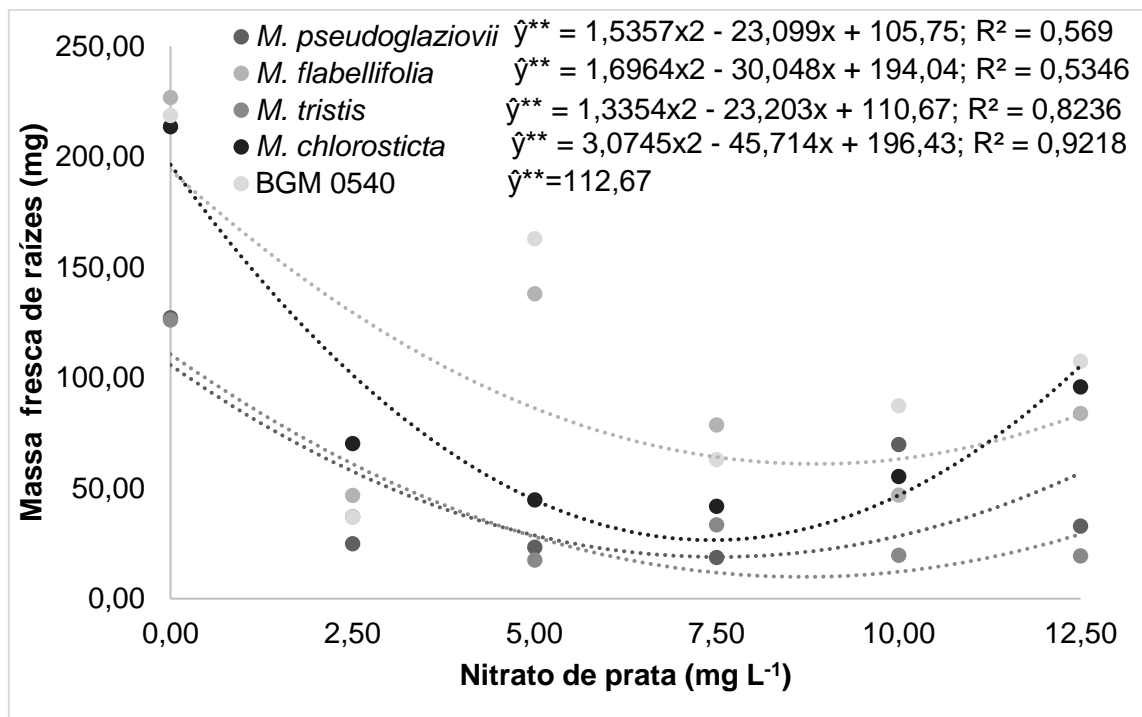


Figura 6. Massa fresca de raízes (mg) para os acessos *Manihot pseudoglaziovii*, *M. flabellifolia*, *M. tristis*, *M. chlorosticta* e BGM 0540 em função de seis concentrações de AgNO₃ (mg L⁻¹), após 180 dias de conservação *in vitro*.

Conforme as equações apresentadas na Figura 7 para a variável massa seca de raízes, as espécies *M. pseudoglaziovii*, *M. tristis* e *M. chlorosticta* apresentaram, respectivamente, os menores valores estimados de 2,56, 1,34 e 3,92 mg nas doses de 7,28, 8,76 e 7,57 mg L⁻¹ de AgNO₃. Esses resultados diferem dos encontrados por Petrova et al. (2011), que ao adicionarem 2 mg L⁻¹ de AgNO₃ ao meio de cultura observaram alterações no processo de risogênese, obtendo redução do número de raízes, apesar do aumento no comprimento de raízes nas plantas de *Gentiana lutea* L.

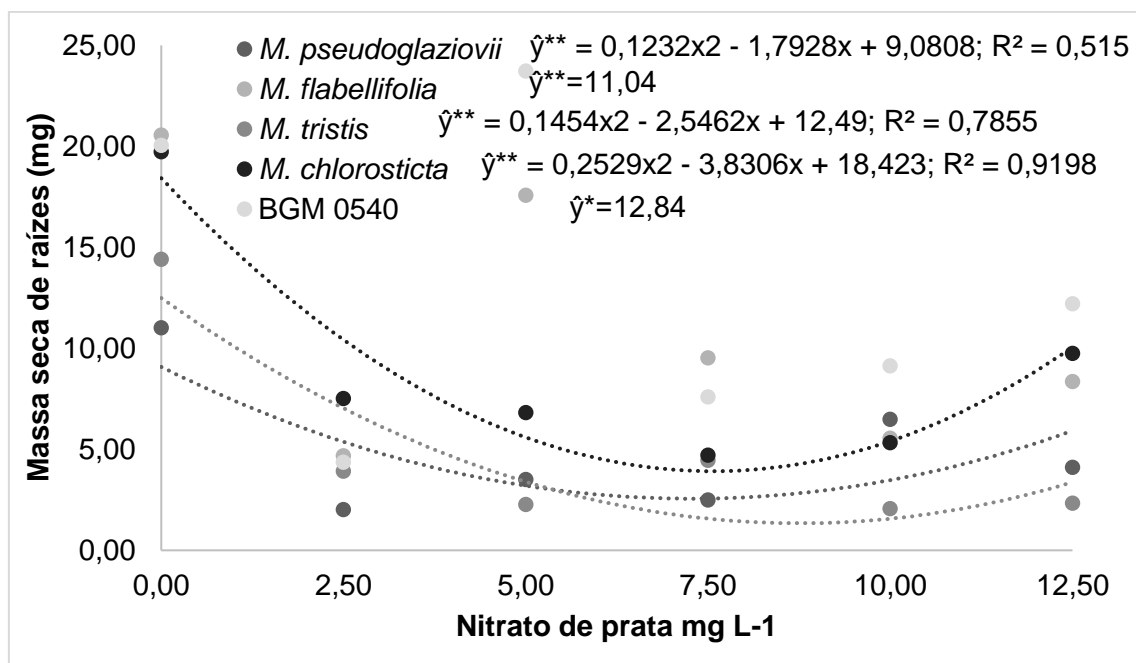


Figura 7. Massa seca de raízes (mg) para os acessos *Manihot pseudoglaziovii*, *M. flabellifolia*, *M. tristis*, *M. chlorosticta* e BGM 0540 em função de seis concentrações de AgNO₃ (mg L⁻¹), após 180 dias de conservação *in vitro*.

Na Tabela 2, são apresentados o desdobramento da interação entre os acessos em cada concentração de AgNO₃ para as variáveis que foram significativas. Nota-se que para a altura de planta os acessos apresentaram comportamentos diferentes apenas na ausência do nitrato, onde *M. flabellifolia* e o BGM 0540 apresentaram as maiores médias, fato já esperado, considerando a variabilidade existente no gênero *Manihot*. Entretanto, nas demais doses estudadas não houve diferenças significativas, mantendo-se um padrão de comportamento dos mesmos.

Tabela 2. Valores médios de altura de planta (cm), número de folhas senescentes, número de miniestacas, massa fresca de parte aérea (mg), massa seca de parte aérea (mg), massa fresca de raízes (mg) e massa seca de raízes (mg) das plantas dos acessos *M. pseudoglaziovii*, *M. flabellifolia*, *M. tristis*, *M. chlorosticta* e BGM 0540 em função de seis concentrações de AgNO₃ (mg L⁻¹), após 180 dias de conservação *in vitro*.

Acesso	Nitrato de Prata (mg L ⁻¹)					
	0,00	2,50	5,00	7,50	10,00	12,50
Altura de planta (cm)						
<i>M. pseudoglaziovii</i>	8,76 bc	2,33 a	2,30 a	1,63 a	1,78 a	1,97 a
<i>M. flabellifolia</i>	12,80 a	2,06 a	2,76 a	2,17 a	2,04 a	2,64 a
<i>M. tristis</i>	4,79 d	1,79 a	1,64 a	2,08 a	1,71 a	2,16 a
<i>M. chlorosticta</i>	6,95 c	2,57 a	2,05 a	2,02 a	1,84 a	2,31 a
BGM 0540	11,21 ab	2,18 a	2,85 a	2,23 a	2,58 a	2,63 a
Número de folhas senescentes						
<i>M. pseudoglaziovii</i>	3,21 b	2,46 a	1,67 ab	1,73 a	2,00 ab	1,47 ab
<i>M. flabellifolia</i>	9,00 a	2,80 a	2,60 a	2,27 a	1,87 ab	1,87 a
<i>M. tristis</i>	1,64 c	0,80 b	1,00 b	1,35 a	1,07 b	0,47 b
<i>M. chlorosticta</i>	4,50 b	2,85 a	1,33 ab	1,69 a	1,33 b	2,13 a
BGM 0540	5,61 b	2,21 a	1,31 ab	2,20 a	2,71 a	2,73 a
Número de miniestacas						
<i>M. pseudoglaziovii</i>	4,50 b	1,92 ab	1,00 a	1,13 a	1,22 a	1,67 ab
<i>M. flabellifolia</i>	6,13 a	1,67 ab	1,80 a	1,47 a	1,80 a	2,00 a
<i>M. tristis</i>	2,54 c	1,40 b	1,00 a	1,64 a	1,40 a	1,20 b
<i>M. chlorosticta</i>	3,93 b	2,28 a	1,07 a	1,46 a	1,53 a	1,93 ab
BGM 0540	5,30 ab	1,43 ab	1,54 a	1,87 a	2,14 a	1,87 ab
Massa fresca de parte aérea (mg)						
<i>M. pseudoglaziovii</i>	272,86 a	77,68 a	66,65 a	61,61 a	84,74 a	53,88 a
<i>M. flabellifolia</i>	224,01 a	39,48 b	63,21 ab	50,38 a	48,63 b	57,37 a
<i>M. tristis</i>	120,83 b	40,21 b	27,80 c	55,25 a	38,63 b	43,45 a
<i>M. chlorosticta</i>	264,60 a	64,35 ab	34,57 bc	62,42 a	62,49 ab	41,27 a
BGM 0540	225,26 a	42,11 b	53,02 abc	59,42 a	51,89 ab	38,20 a
Massa seca de parte aérea (mg)						
<i>M. pseudoglaziovii</i>	34,57 ab	9,58 a	11,03 a	8,40 a	11,29 a	7,15 a
<i>M. flabellifolia</i>	32,86 ab	4,66 a	9,38 ab	7,13 a	6,33 ab	5,23 a
<i>M. tristis</i>	20,26 c	5,58 a	4,00 c	8,88 a	5,83 b	9,55 a
<i>M. chlorosticta</i>	39,04 a	8,68 a	5,51 bc	7,58 a	7,31 ab	5,17 a
BGM 0540	29,02 b	4,99 a	7,58 abc	7,55 a	6,29 b	5,53 a
Massa fresca de raízes (mg)						
<i>M. pseudoglaziovii</i>	127,09 c	24,81 a	23,22 b	18,54 b	69,80 a	32,74 b
<i>M. flabellifolia</i>	226,81 a	46,63 a	137,97 a	78,53 a	46,83 ab	83,83 a
<i>M. tristis</i>	126,11 bc	36,95 a	17,48 b	33,39 ab	19,64 b	19,38 b

<i>M. chlorosticta</i>	213,62 a	70,22 a	44,64 b	41,75 ab	55,18 ab	95,79 a
BGM 0540	218,69 ab	36,90 a	162,89 a	62,89 a	87,21 a	107,43 a
Massa seca de raízes (mg)						
<i>M. pseudoglaziovii</i>	11,01 b	2,01 b	3,51 b	2,49 b	6,48 ab	4,11 bc
<i>M. flabellifolia</i>	20,55 a	4,67 ab	17,57 a	9,52 a	5,54 ab	8,36 ab
<i>M. tristis</i>	14,41 ab	3,92 ab	2,26 b	4,45 ab	2,06 b	2,33 c
<i>M. chlorosticta</i>	19,73 a	7,51 a	6,81 b	4,70 ab	5,33 ab	9,75 a
BGM 0540	20,05 a	4,36 ab	23,72 a	7,59 a	9,14 a	12,21a

Médias seguidas por letras diferentes na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Em relação a variável número de folhas senescentes na dose de 7,50 mg L⁻¹ de AgNO₃ não foram observadas diferenças significativas entre os acessos. Na ausência e na concentração de 2,50 mg L⁻¹ do nitrato a espécie *M. tristis* se destacou apresentando as menores médias. Assim, é desejável obter menores valores para essa variável, pois a mesma indica que quanto maior o número de folhas senescentes mais acelerado será o processo de envelhecimento da planta. De acordo com Ha et al. (2020), a presença do etileno em grandes concentrações, pode provocar abscisão foliar, alterações no crescimento, diferenciação e envelhecimento das plantas *in vitro*, o que não foi observado nesse trabalho, com relação a essa variável.

Para a variável número de miniestacas observa-se que nas doses de 5,00; 7,50 e 10,00 mg L⁻¹ de AgNO₃ não houve diferenças estatísticas entre os acessos, já na ausência do nitrato de prata, *M. flabellifolia* e o BGM 0540 apresentaram as maiores médias. Com relação a variável massa fresca de parte aérea, nas concentrações de 7,50 e 12,50 mg L⁻¹ de AgNO₃ pode-se observar que não houve diferenças significativas entre os acessos. Na ausência do nitrato todos os acessos, exceto *M. tristis* foram responsáveis pelas maiores médias, já na concentração de 2,50 mg L⁻¹ *M. pseudoglaziovii* e *M. chlorosticta* apresentaram as médias superiores. Na concentração de 10 mg L⁻¹ esses mesmos acessos e o BGM 0540 apresentaram as maiores médias e com 5,00 mg L⁻¹ as médias superiores ocorreram com *M. pseudoglaziovii*, *M. flabellifolia* e o BGM 0540.

Por outro lado, na variável massa seca de parte aérea não foram observadas diferenças estatísticas entre os acessos nas doses de 2,50; 7,50 e 12,50 mg L⁻¹ de AgNO₃ para todos os acessos. Na ausência do nitrato de prata a espécie *M. tristis* foi inferior às demais. Na concentração de 5,00 mg L⁻¹, *M. pseudoglaziovii*, *M. flabellifolia* e o BGM 0540 foram responsáveis pelas maiores médias e com a concentração de

10,00 mg L⁻¹ os acessos *M. pseudoglaziovii*, *M. flabellifolia* e *M. chlorosticta* obtiveram médias superiores.

Na variável massa fresca de raízes não houve diferenças estatísticas entre os acessos na concentração de 2,50 mg L⁻¹ de AgNO₃. Com 5,00 e 7,50 mg L⁻¹ as espécies *M. pseudoglaziovii*, *M. tristis* e *M. chlorosticta* não diferiram estatisticamente entre si, sendo responsáveis pelas menores médias. Na ausência do reagente e na dose de 12,50 mg L⁻¹ as espécies *M. flabellifolia*, *M. chlorosticta* e o BGM 0540 não diferiram estatisticamente entre si, apresentando as maiores médias, essas mesmas espécies juntamente com *M. pseudoglaziovii* também apresentaram as maiores médias na dose 10,00 mg L⁻¹ de AgNO₃. Dessa forma, outros estudos (BAIS et al., 2000; REDDY et al., 2001; GIRIDHAR et al., 2003; CHITHRA et al., 2004) corroboram com a eficiência no processo de risogênese ao alcançarem resultados satisfatórios no enraizamento *in vitro* utilizando o nitrato de prata.

Por outro lado, para a massa seca de raízes, na ausência do nitrato e na dose de 12,50 mg L⁻¹ as espécies *M. pseudoglaziovii* e *M. tristis* apresentaram as menores médias, não diferindo estatisticamente entre si. Comportamento semelhante ocorreu com as espécies *M. pseudoglaziovii*, *M. tristis* e *M. chlorosticta* nas concentrações de 5,00 e 7,50 mg L⁻¹.

De maneira geral, nesse trabalho, a adição do nitrato de prata promoveu resultados satisfatórios quando comparados ao tratamento controle. Os autores Syahid; Wahyuni (2019), ao trabalharem com diferentes concentrações de AgNO₃ na conservação *in vitro* de *Passiflora gibertii* N. E. Brown também obtiveram resultados semelhantes, recomendando o uso nitrato. Rayas et al. (2013) conseguiram conservar plantas de *Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott *in vitro* por mais de 10 meses utilizando 4 mg L⁻¹ de nitrato de prata.

Na literatura existem poucos trabalhos direcionados a ação do nitrato de prata na conservação *in vitro* do germoplasma de *Manihot*, principalmente em relação às espécies silvestres desse gênero. Dessa forma, os dados desse estudo demonstram a potencialidade do uso do nitrato de prata para a redução do crescimento das plantas conservadas *in vitro* sem afetar seu desenvolvimento e viabilidade, aqui representada também pela redução do número de folhas senescentes.

CONCLUSÕES

As plantas suplementadas com nitrato de prata apresentaram menores médias para altura, sem causar prejuízos nas demais variáveis.

Para o crescimento mínimo *in vitro* dos acessos estudados, as doses entre 7,28 mg L⁻¹ e 8,86 mg L⁻¹ de nitrato de prata foram as mais adequadas para a maioria dos acessos por terem proporcionado a redução do crescimento das plantas no período de 180 dias de conservação *in vitro*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADKINS, S. W.; KUNANUVATCHAIDACH, R.; GRAY, S. J.; ADKINS, A. L. Effect of ethylene and culture environment on rice callus proliferation. **Journal of Experimental Botany**, v. 44, n. 269, p. 1829-1835, 1993.

AGARWAL, P. K.; BHOJWANI, S. S. Enhanced pollen grain embryogenesis and plant regeneration in anther cultures of *Brassica juncea* cv. PR-45. **Euphytica**, v. 70, p. 191-196, 1993.

ALBUQUERQUE, J. A. A.; SEDIYAMA, T.; SILVA, A. A. da; SEDIYAMA, C. S.; ALVES, J. M. A.; ASSIS NETO, F. de. Caracterização morfológica e agrônômica de clones de mandioca cultivados no Estado de Roraima. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 4, n. 4, p. 388-394, 2009.

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

ALLEM, A. C. The origins and taxonomy of cassava. In: HILLOCKS, R. J.; THRESH, J. M.; BELLOTTI, A. C. (ed). **Cassava: biology, production and utilization**. Wallingford: CAB International, 2002. p. 1-16.

BAIS, H. P.; SUDHA, G.; SURESH, B.; RAVISHANKAR, G. A. Silver nitrate influences *in vitro* root formation in *Decalepis hamiltonii* Wight. & Arn. **Current Science**, v. 79, n. 6, p. 894-898, 2000.

BARRUETO CID, L. P.; CARVALHO, L. L. C. B. Importance of abscisic acid (ABA) in the *in vitro* conservation of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Chilean Journal of Agricultural Research**, v. 68, n. 3, p. 304-308, 2008.

BRISON, M.; BOUCAUD, M. T.; DOSBA, F. Cryopreservation of *in vitro* grown shoot tips of two interespecific *Prunus* rootstocks. **Plant Science**, v. 105, n. 2, p. 235-242, 1995.

CHITHRA, M.; MARTIN, K. P.; SUNANDAKUMARI, C.; MADHUSOODANAN, P. V. Silver nitrate induced rooting and flowering *in vitro* on rare rheophytic woody medicinal plant, *Rotula aquatica* Lour. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 3, n. 3, p. 418-421, 2004.

CORDEIRO, I.; SECCO, R.; SILVA, M. J. da; SODRÉ, R. C.; MARTINS, M. L. L. **Manihot in lista de espécies da flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2015. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB17591>>. Acesso em: 17. jul. 2018.

DONINI, L. P.; FIGUEIREDO, G. S.; SCHUCH, M. W. Nitrato de prata e diferentes tipos de vedação na multiplicação *in vitro* de oliveira 'Arbequina'. **Ciência Rural**, v. 41, n. 9, p. 1532-1535, 2011.

EIRA, M. T. S. Conservação de germoplasma na forma de sementes, *in vitro* e criopreservação. In: SIRGEALC - Simpósio de Recursos Genéticos para a América Latina e Caribe; Reunião Latino Americana de Especialistas em *Arachis*; Reunião Latino Americana de Especialistas em Recursos Genéticos Florestais, 2001, Londrina. **Anais...** Londrina: IAPAR, 2001. p. 30-32.

GAO, H.; XIA, X.; AN, L.; XIN, X.; LIANG, Y. Reversão da hiperidricidade em plântulas rosadas (*Dianthus chinensis* L.) por AgNO₃ e seu mecanismo associado durante o cultivo *in vitro*. **Plant Science**, v. 254, p. 1-11 de 2017.

GIANNINI, T. C.; SIQUEIRA, M. F.; ACOSTA, A. L.; BARRETO, F. C. C.; SARAIVA, A. M.; ALVES-DO-SANTOS, I. Desafios atuais da modelagem preditiva de distribuição de espécies. **Rodriguésia**, v. 63, n. 3, p. 733-749, 2012.

GIRIDHAR, P.; INDU, E. P.; RAMU, D. V.; RAVISHANKAR, G. A. Effect of silver nitrate on *in vitro* shoot growth of Coffee. **Tropical Science**, v. 43, n. 3, pág. 144-146, 2003.

HA, N. T. M.; DO, C. M.; HOANG, T. T.; NGO, N. D.; BUI, L. V.; NHUT, D. T. The effect of cobalt and silver nanoparticles on overcoming leaf abscission and enhanced growth of rose (*Rosa hybrida* L. 'Baby Love') plantlets cultured *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 141, p. 393-405, 2020.

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

NASSAR, N. M. A.; HASHIMOTO, D. Y. C.; FERNANDES, S. D. C. Wild *Manihot* species: botanical aspects, geographic distribution and economic value. **Genetics and Molecular Research**, v. 7, n 1, p. 16-28, 2008.

NASSAR, N. M. A. Mandioca: Uma opção contra a fome. Estudos e lições no Brasil e no mundo. **Ciência Hoje**, v. 39, n. 231, p. 30-36. 2006.

NISSEN, P. Stimulation of somatic embryogenesis in carrot by ethylene: effects of modulators of ethylene biosynthesis and action. **Physiologia Plantarum**, v. 92, p. 397-403, 1994.

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

PETROVA, M.; ZAYOVA, E.; VITKOVA, A. Effect of silver nitrate on *in vitro* root formation of *Gentiana lutea*. **Cartas Biotecnológicas Romenas**, v. 16, n. 6, p. 53-58, 2011.

RAVI, R. S. D.; SIRIL, E. A.; NAIR, B. R. The effect of silver nitrate on micropropagation of *Moringa oleifera* Lam. an important vegetable crop of tropics with substantial

nutritional value. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, Switzerland, v. 25, n. 5, p. 1311-1322, 2019.

RAYAS, A.; CABRERA, M.; SANTOS, A.; BASAIL, M.; LÓPEZ, J.; MEDERO, V.; BEOVIDES, Y. Efecto del manitol y el nitrato de plata en la conservación *in vitro* de la malanga (*Xanthosoma* spp.). **Revista Colombiana de Biotecnología**, v. 15, n. 1, pág. 167-171, 2013.

REDDY, B. O.; GIRIDHAR, P.; RAVISHANKAR, G. A. *In vitro* rooting of *Decalepis hamiltonii* Wight & Arn., an endangered shrub, by auxins and root-promoting agents. **Current Science**, v. 81, n. 11, p.1479-1481, 2001.

R DEVELOPMENT CORE TEAM (2021). R: A language and environment for statistical computing, reference index version 3. 4. R foundation for statistical computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0 <http://www.R-project.org>.

ROCA, W. M.; NOLT, B; MAFLA, G.; ROA, J.; REYES, R. Eliminación de virus y propagación de clones en la yuca (*Manihot esculenta* Crantz). In: ROCA, W. M.; MROGINSKI, L. A. (ed.). **Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones**. Cali: CIAT, 1991. p. 403-420.

SA, J. F. de; SILVEIRA, D. M. de S.; SANTOS, K. C. F. dos; SOUZA, A. da S.; LEDO, C. A. da S.; CARVALHO, M. de J. da S. de. Effects of different doses of paclobutrazol and sucrose in the minimum *in vitro* growth of wild species of *Manihot*. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 16, n. 2, p. 1-8, 2021.

SANTOS, K. C. F. dos; SILVEIRA, D. M. de S.; SOUZA, A. da S.; SÁ, J. F. de; LEDO, C. A. da S. *In vitro* multiplication of wild *Manihot* species with different naphthaleneacetic acid and benzylaminopurine concentrations. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 43, p. e52866, 2021.

SANTOS, M. da C; LÉDO, A. da S; LÉDO, C. A. da S; SOUZA, F. V. D; SILVA JUNIOR, J. F da. Efeito da sacarose e do sorbitol na conservação *in vitro* de segmentos nodais de mangabeira. **Revista Ciência Agrônômica**, v. 42 n. 3, p. 735-741, 2011.

SIQUEIRA, M. V. B. M.; PINHEIRO, T. T.; BORGES, A.; VALLE, T. L.; ZATARIM, M.; VEASEY, E. A. Microsatellite polymorphisms in cassava landraces from the Cerrado biome, Mato Grosso do Sul, Brazil. **Biochemical Genetics**, v. 48, n. 9/10, p. 879-895, 2010.

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**. Cruz das Almas, BA: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2008. 12 p. (Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical. Circular Técnica, 88).

SYAHID, S. F; WAHYUNI, S. Effect of silver nitrate on shoot multiplication, rooting induction and plantlet characteristics of St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.) *in vitro* culture. **African Journal of Agricultural Research**, v. 14, n. 27, p. 1149 - 1153, 2019.

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

WITHERS, L. A.; WILLIAMS, J. T. Conservação *in vitro* de recursos genéticos de plantas In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: Embrapa-SPI: Embrapa-CNPH, 1998. p. 297-330.

ZHANG, P.; PHANSIRI, S.; PUONTI-KAERLAS, J. Improvement of cassava shoot organogenesis by the use of silver nitrate *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 67, n. 1, p. 47-54, 2001.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As espécies silvestres do gênero *Manihot* se destacam em razão de sua potencialidade por possuírem genes de resistência a diversas pragas e doenças, genes que também podem melhorar a qualidade nutricional, serem resistentes e tolerantes aos diferentes estresses bióticos e abióticos, e entre outros aspectos agronômicos comuns à cultura da *M. esculenta* Crantz (mandioca). Essa, por sua vez, se destaca por ser uma cultura que apresenta particularidades promissoras, principalmente no que se refere às propriedades nutricionais e facilidade de cultivo, além de sua importância econômica e social.

Considerando que as espécies de *Manihot* apresentam um caráter expressivo dentro dos programas de melhoramento genético da mandioca, diversos trabalhos de melhoramento genético foram e têm sido realizados envolvendo essas espécies. Nessa perspectiva, a conservação em Bancos Ativos de Germoplasma é indispensável, pois irá reunir genes com características de interesse agronômico, ampliando a diversidade genética, já que, ao serem incorporados nos programas de melhoramento genético da mandioca, irão possibilitar o desenvolvimento de variedades mais produtivas e menos susceptíveis aos problemas que acometem essa cultura.

Algumas instituições como a Embrapa Mandioca e Fruticultura atuam na preservação do germoplasma de *Manihot* em campo. Porém, esse tipo de conservação deixa as plantas expostas a diversos fatores ambientais e, assim, se faz necessário a associação desse tipo de conservação com outros métodos ou técnicas que minimizem esses fatores. Dessa forma, a conservação *in vitro* é uma técnica bastante promissora, pois auxilia na diminuição desses fatores considerados limitantes e, além disso, pode garantir a estabilidade genética e qualidade fitossanitária, e a manutenção da viabilidade das plantas conservadas *in vitro*.

Devido à necessidade de realizar subcultivos durante o período de armazenamento *in vitro*, é importante estabelecer protocolos que visem o crescimento mínimo, uma vez que diminuirá a manipulação excessiva do material cultivado. Assim, os resultados gerados neste estudo, utilizando o ácido abscísico, e destacando-se o paclobutrazol e o nitrato de prata para a redução do crescimento *in vitro* durante o período de conservação, foram satisfatórios e apontam para o bom desenvolvimento

e vigor das plantas. Com isso, é possível o estabelecimento de protocolos de conservação *in vitro* para as espécies silvestres estudadas, garantido a conservação das mesmas por um período de até 180 dias, sem a necessidade de sucessivos subcultivos, diminuindo os custos com a mão de obra e o próprio procedimento de manutenção. Além disso, esses protocolos podem ser aplicados ou adaptados para outras espécies do gênero *Manihot*.