

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

**OTIMIZAÇÃO DE PROTOCOLOS PARA A MULTIPLICAÇÃO
E CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DE ESPÉCIES SILVESTRES
DE *Manihot***

Jucieny Ferreira de Sá

**CRUZ DAS ALMAS – BAHIA
2018**

OTIMIZAÇÃO DE PROTOCOLOS PARA A MULTIPLICAÇÃO E CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DE ESPÉCIES SILVESTRES DE *Manihot*

Jucieny Ferreira de Sá

Licenciatura em Ciências Biológicas
Universidade de Pernambuco, 2016

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

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

CRUZ DAS ALMAS – BAHIA
2018

FICHA CATALOGRÁFICA

S111o	<p>Sá, Jucieny Ferreira de. Otimização de protocolos para a multiplicação e conservação in vitro de espécies silvestres de <i>Manihot.</i> / Jucieny Ferreira de Sá. – Cruz das Almas, BA, 2018. 73f.; il.</p> <p>Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto da Silva Ledo. Co-Orientadora: Msc. Karen Cristina Fialho dos Santos</p> <p>Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrária, Ambientais e Biológicas, Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais.</p> <p>1.Mandioca. 2. Espécies Silvestres - Mandioca 3. Preservação in Vitro I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrária, Ambientais e Biológicas. II.Título.</p> <p>CDD: 633.682</p>
-------	--

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

**OTIMIZAÇÃO DE PROTOCOLOS PARA A MULTIPLICAÇÃO E
CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DE ESPÉCIES SILVESTRES DE *Manihot***

Comissão Examinadora da Defesa de Dissertação de
Jucieny Ferreira de Sá

Aprovado em: de de 2018

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

Prof.^a Dr.^a. Daniela Garcia Silveira
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Baiano – Campus Alagoinhas

Dr.^a. Viviane Peixoto Borges
PNPD CAPES/UFRB

DEDICATÓRIA

A 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.

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 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 desabaços que ouviu foram fundamentais para que eu “prosperasse” com liberdade, consciência e conhecimento.

A minha coorientadora Msc. Karen Cristina Fialho dos Santos, por todo apoio, preocupação e disponibilidade. 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: Honorato, Tânia, Maria Inês, Denise, Murilo, Marcelo, Emília, Ravena e Deyse, 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.

Aos meus colegas do mestrado em Recursos Genéticos Vegetais. Em especial meu amigo Alison Borges, que esteve comigo desde a graduação e me acompanhou até o mestrado, acredito que nossa amizade apenas se fortaleceu quando você veio morar em Cruz das Almas. As minhas melhores amigas e confidentes, Andreza Araújo e Cristiane Lima, que mesmo distantes souberam me dar apoio e foram compreensivas nos momentos em que estive ausente. A Julianna e Hilçana, por todos os bons momentos proporcionados durante os meses que convivemos juntas.

É com grande afeto que agradeço a Jailton Silva, pelo cuidado, paciência, carinho, companheirismo e apoio emocional, principalmente durante a finalização desta etapa. Você me fortaleceu nos momentos mais difíceis!

OTIMIZAÇÃO DE PROTOCOLOS PARA A MULTIPLICAÇÃO E CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DE ESPÉCIES SILVESTRES DE *Manihot*

RESUMO:

As espécies silvestres de *Manihot* possuem genes de interesse que podem ser utilizados em programas de melhoramento genético de *M. esculenta* Crantz para o desenvolvimento de variedades mais produtivas e menos suscetíveis a fatores como pragas e estresses abióticos. No entanto, diferentemente do que acontece com as variedades de *M. esculenta*, os acessos das espécies silvestres de mandioca apresentam sérios problemas de propagação, tanto via sexuada como vegetativa. Atualmente, poucos foram os estudos desenvolvidos para adequar um eficiente sistema de propagação de espécies silvestres de *Manihot*, seja por sementes ou de forma vegetativa. Nesse contexto, técnicas de cultura de tecidos, como a micropropagação, oferecem possibilidades de superar os problemas enfrentados na propagação de espécies silvestres de mandioca, sendo imprescindíveis para sua preservação *in vitro* em condições de crescimento mínimo. Portanto, este trabalho teve como objetivo contribuir na otimização de protocolos de multiplicação e conservação *in vitro* de germoplasma, de forma a auxiliar na micropropagação e preservação de espécies silvestres de *Manihot*. Para tal, foram realizados dois experimentos no Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Mandioca e Fruticultura, um de multiplicação e outro de conservação *in vitro*. No experimento de multiplicação *in vitro* foram estudadas cinco espécies, *Manihot flabellifolia* Pohl, *M. tristis* Müll.Arg, *M. caerulescens* Pohl, *M. chlorosticta* Standl. e *M. jacobinensis* Müll.Arg, utilizando-se seis meios de cultura (MS 0,01, 17N, 12A₃, 4E, 8S e WPM). Para o experimento de conservação *in vitro* também foram estudadas cinco espécies, *M. pseudoglaziovii* Pax & Hoffman, *M. caerulescens* Pohl, *M. chlorosticta* Standl, *M. alutacea* D.J.Rogers & Appan e *M. flabellifolia* Pohl, sendo o 8S o meio básico utilizado, modificando sua composição com o acréscimo de cinco concentrações 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). Com relação aos resultados do experimento de multiplicação, os meios MS 0,01 e WPM foram os que mais se destacaram no cultivo *in vitro* das espécies silvestres, enquanto que o meio 12A₃ não foi responsivo para nenhuma delas. No experimento de conservação *in vitro*, visando a redução da taxa de crescimento das plantas, a concentração de 0,20 mg.L⁻¹ de PBZ revelou-se mais eficiente para a maioria das variáveis analisadas. Existe uma dependência entre as espécies silvestres do gênero *Manihot* e os seus comportamentos quando multiplicadas e preservadas *in vitro*, expressando diferentes respostas morfogênicas, não sendo possível estabelecer um meio de cultura padrão para a micropropagação e conservação *in vitro* de todas as espécies.

Palavras chave: Mandioca; parentais silvestres; multiplicação *in vitro*; preservação *in vitro* de germoplasma; Paclobutrazol®

OPTIMIZATION OF PROTOCOLS FOR MULTIPLICATION AND *IN VITRO* CONSERVATION OF WILD SPECIES OF *Manihot*

ABSTRACT:

The wild species of *Manihot* have genes of interest that can be used in programs of genetic improvement of *M. esculenta* Crantz for the development of varieties more productive and less susceptible to factors such as plagues and abiotic stresses. However, unlike *M. esculenta* varieties, the accesses of wild cassava species present serious problems of propagation, both sexually and vegetatively. Currently, few studies have been developed to adapt an efficient system of propagation of wild species of *Manihot*, either by seeds or vegetatively. In this context, tissue culture techniques, such as micropropagation, offer possibilities to overcome the problems faced in the propagation of wild cassava species, being indispensable for their *in vitro* preservation in conditions of minimum growth. Therefore, this work aimed to contribute to the optimization of protocols for the *in vitro* multiplication and conservation of germplasm, in order to assist in the micropropagation and preservation of wild species of *Manihot*. For this, two experiments were carried out in the Laboratory of Tissue Culture of Embrapa Cassava and Fruits, one of multiplication and the other one of *in vitro* conservation. In the *in vitro* multiplication experiment, five species, *Manihot flabellifolia* Pohl, *M. tristis* Müll.Arg, *M. caerulescens* Pohl, *M. chlorosticta* Standl. and *M. jacobinensis* Müll.Arg using six culture media (MS 0,01, 17N, 12A₃, 4E, 8S and WPM). For the *in vitro* conservation experiment, five species were studied: *M. pseudoglaziovii* Pax & Hoffman, *M. caerulescens* Pohl, *M. chlorosticta* Standl, *M. alutacea* D.J.Rogers & Appan and *M. flabellifolia* Pohl, 8S being the basic medium used, modifying its composition with the addition of five concentrations 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). Regarding the results of the multiplication experiment, MS media 0.01 and WPM were the most prominent in the *in vitro* culture of the wild species, while the 12A₃ medium was not responsive to any of them. In the *in vitro* conservation experiment, aiming to reduce the growth rate of plants, the concentration of 0,20 mg.L⁻¹ of PBZ was more efficient for most of the analyzed variables. There is a dependence between the wild species of the *Manihot* genus and their behavior when multiplied and preserved *in vitro*, expressing different morphogenic responses, and it is not possible to establish a standard culture medium for *in vitro* micropropagation and conservation of all species.

Keywords: Cassava; wild parental; *in vitro* multiplication; *in vitro* preservation of germplasm; Paclobutrazol[®]

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	1
ARTIGO 1	
MEIOS DE CULTURA PARA A MULTIPLICAÇÃO DE ESPÉCIES SILVESTRES DE <i>Manihot</i>	20
ARTIGO 2	
PACLOBUTRAZOL NA CONSERVAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE ESPÉCIES SILVESTRES DE <i>Manihot</i>	45
CONSIDERAÇÕES FINAIS	65

INTRODUÇÃO GERAL

Importância da cultura da mandioca

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é uma dicotiledônea que pertence à família Euphorbiaceae, que é composta por 290 gêneros com cerca de 7.500 espécies distribuídas em regiões tropicais e subtropicais, especialmente na África e América (BARROSO et al., 1999). Esta cultura destaca-se pela sua produtividade e área plantada em diversos países em todo mundo, sendo Nigéria, Tailândia, Indonésia, Brasil e República Democrática do Congo os cinco principais países responsáveis pela produção (OTSUBO et al., 2001; FAO, 2014). Além disso, a mandioca é uma espécie de enorme significância econômica e alimentar, destacando-se como uma importante fonte de calorias para os países da América Latina, África, Sudeste da Ásia e Oceania (ROCA, 1989).

A produção nacional, em 2014, foi de 23.253.514 milhões de toneladas de raízes, com área colhida de 1.568.253 ha e produtividade média de 14,83 t.ha⁻¹ (FAO, 2014). As regiões Norte e Nordeste se destacam na produção de mandioca com 40,0% e 23,1% do total produzido no país, respectivamente (IBGE, 2017). Os estados do Pará, do Paraná e da Bahia se destacam como os maiores estados produtores de mandioca no Brasil, respondendo por 24,7%, 13,2% e 8,4%, respectivamente (IBGE, 2017).

O cultivo da mandioca é bastante difundido mundialmente, sendo amplamente utilizado na agricultura familiar. Além de ser destaque como via de energia alimentar em termos de consumo calórico, esta cultura é tolerante a seca e possui ampla adaptação as variadas condições de clima e solo. Para Njoku et al. (2015), a mandioca é uma planta que apresenta raízes tuberosas ricas em carboidratos que podem ser utilizadas tanto no consumo *in natura* (humano e animal), como também em atividades da indústria de processamento. A fécula é frequentemente empregada na composição de bolos, tortas, polvilhos, tapioca, pães, farinha de mesa e entre outras atividades gastronômicas. O amido é comumente utilizado em indústria têxtil de fogos de artifício, fósforos, papel, embalagens, creme dental e produtos de tinturaria.

Um dos aspectos a ser considerado para a utilização das raízes da mandioca é a concentração de ácido cianídrico (HCN), que varia de acordo com os diferentes

tipos de cultivares. Em consequência disto, as variedades que apresentam baixo teor deste ácido nas raízes são popularmente denominadas ‘mansas’, podendo ser consumida na forma *in natura* e utilizadas para outras finalidades. As que apresentam alto teor de HCN são denominadas mandiocas ‘bravas’, que só devem ser consumidas após submissão a algum processo de desintoxicação e frequentemente são utilizadas para produção de farinha e fécula (amido) (MEZETTE, 2007). As cultivares que apresentam valores inferiores a 50 mg.kg^{-1} de HCN, na matéria fresca da raiz, são consideradas inócuas, as que possuem valores de 50 mg.kg^{-1} a 100 mg.kg^{-1} são classificadas como moderadamente venenosas e as que possuem valores superiores de 100 mg.kg^{-1} de HCN, são consideradas venenosas (LORENZI et al., 1993).

É de grande notoriedade que o principal valor econômico da *M. esculenta* Crantz está associado principalmente às suas raízes, seja para atividades presentes na indústria e culinária de várias regiões do Brasil como também para alimentação animal. É importante considerar que, de acordo com Chicherchio (2013), as hastes e folhas também são utilizadas como matéria prima para a elaboração de feno e silagens, pois as mesmas são importantes fontes de proteínas, algumas vitaminas (A, C e complexo B) e minerais como o cálcio e o ferro (ALMEIDA; FERREIRA FILHO, 2005).

Em virtude da elevada concentração de amido presente nas raízes da mandioca, esta cultura também é considerada como potencial na produção de etanol. Além disto, por muito tempo algumas espécies silvestres conhecidas no Nordeste Brasileiro como ‘Maniçobas’, dentre algumas delas *M. dichotoma* Ule, *M. caerulescens* Pohl e *M. glaziovii* Mueller, constituíram uma fonte importante de látex, juntamente com a seringueira (CARVALHO, 2006), sendo também bastante utilizadas na elaboração de cercas por meio de estacas em pequenas propriedades rurais do semiárido.

Apesar do importante papel social desempenhando por esta cultura, alguns fatores podem ser considerados limitantes para a expansão do cultivo da mandioca, destacando-se 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), entre os demais estresses bióticos e/ou abióticos e fatores agrônômicos ocasionados, principalmente, pela pouca disponibilidade de novas

variedades mais resistentes, que visem sanar os principais problemas que acometem esta cultura.

Origem e diversidade genética

O principal centro de origem da mandioca é o continente americano, de acordo com Carvalho (2005), existem duas hipóteses em relação a origem da mandioca. Uma sugere que se trata de uma espécie híbrida que se fundamenta no complexo de espécies mexicanas e a outra de que ela é oriunda de uma única espécie ancestral que se fundamenta no complexo das espécies de *Manihot* que ocorrem no Brasil, sendo a *Manihot esculenta* subsp. *flabellifolia* essa espécie. Conforme Rogers e Appan (1973) o centro de diversidade do gênero *Manihot* situa-se no Brasil, com cerca de 80% de suas espécies apresentando polimorfismo vegetativo, o que retrata alto potencial para ser empregado em programas de melhoramento genético.

Em concordância com Nassar (2000), são reconhecidos quatro centros da diversidade genética de espécies do gênero *Manihot*, dentre eles: o primeiro Brasil central, compreendendo os estados de Goiás e Minas Gerais, o segundo sudoeste do México, o terceiro nordeste do Brasil e o quarto oeste do Mato Grosso do Sul e da Bolívia. A diversidade genética presente na cultura da mandioca é oriunda da seleção natural, durante a evolução da espécie e o processo de domesticação, em favor da facilidade de polinização cruzada, da elevada taxa heterozigótica e da deiscência precoce dos frutos (FUKUDA et al., 2002).

O Brasil possui ampla diversidade genética de espécies de *Manihot*, que está distribuída nos seus diferentes ecossistemas. De acordo com Ledo (2010), a maior representatividade de espécies silvestres de *Manihot* encontra-se no Cerrado. Logo, a diversidade de espécies de *Manihot* que ocorrem no Brasil salienta a teoria de que a origem e domesticação da mandioca podem ter ocorrido no País.

Na década de 1970, na América Latina, estabeleceu-se a primeira grande coleção internacional de mandioca, no CIAT, que, de acordo com Niño et al. (2016), contém mais de 6.000 acessos. Já a coleção do IITA possuía em torno de 3.500 acessos (dado disponível em <http://genebank.iita.org/index.php/collections/clonal-crops/cassava/>). Em âmbito nacional, o BAG de mandioca da Embrapa Mandioca e Fruticultura teve sua criação no ano de 1976, em Cruz das Almas, Bahia, e é a maior

coleção de mandioca do Brasil. Atualmente possui cerca de 1.600 acessos em campo e aproximadamente 580 mantidos *in vitro*, provenientes de várias regiões do País e também do exterior. Já a coleção das espécies silvestres foi estabelecida em 2005 e atualmente possui em torno de 200 acessos em campo e 40 mantidos *in vitro*.

Com o intuito de assegurar a preservação eficiente de um germoplasma é importante que o método de conservação a ser empregado garanta a viabilidade e a estabilidade genética dos acessos, como também a sanidade, para uma utilização e multiplicação dos mesmos de forma segura (CIAT, 1984). Existem dois sistemas que são mais utilizados na conservação de germoplasmas vegetais: *in situ* e *ex situ*. A conservação *in situ* constitui-se na preservação de espécies vegetais, principalmente aquelas que estão ameaçadas de extinção, sendo mantidas em seus habitats naturais (MEDEIROS, 2003). A conservação *ex situ* fundamenta-se na preservação de espécies vegetais em locais onde estão adaptadas, ou seja, fora do seu ambiente natural (EIRA, 2001).

Em relação a conservação *ex situ*, dependendo do material vegetativo, este pode ser conservado em diferentes condições, entre algumas delas: no campo, em casa de vegetação, em câmaras com temperatura e umidade controladas, no laboratório na forma *in vitro*, em meio de cultura adequado e em laboratório de criopreservação. Porém, segundo Vieira (2013), plantas que são mantidas em campo estão expostas a fatores bióticos e abióticos, ocasionando perdas das mesmas e também de parte da variabilidade genética.

Diante disto, a conservação *in vitro* tem se tornado bastante promissora, uma vez que, quando bem adaptada ao sistema de propagação da planta, favorece a estabilidade genética e assegura as características da planta após o período de armazenamento. Essa conservação, pode ser realizada a partir de mudanças no ambiente de cultivo visando desacelerar ou suprimir totalmente o crescimento de células, tecidos e órgãos (WITHERS; WILLIAMS, 1998), com a função de aumentar ao máximo o intervalo entre os subcultivos, ou estendê-los indefinidamente (ROCA et al., 1991), diminuindo, então, a mão-de-obra e o espaço necessário para a conservação, além de proporcionar acesso imediato a todo o germoplasma da coleção.

O crescimento lento das culturas tem sido empregado com sucesso e consiste em reduzir o metabolismo vegetal, sem afetar sua viabilidade, pela indução de

estresse osmótico, redução da intensidade de luz ou temperatura, acréscimo de retardantes de crescimento ou diminuindo a concentração dos componentes salinos e orgânicos do meio de cultura (WITHERS; WILLIAMS, 1998; ARRIGONI-BLANK et al., 2014).

De acordo com Seleguini (2007), os retardantes de crescimento vegetal são compostos sintéticos que reduzem o alongamento do caule, sem mudar os padrões de desenvolvimento ou causar fitotoxicidade. Esse processo ocorre com a redução do alongamento das células e da taxa de divisão celular. Entre diversos retardantes de crescimento, tem-se o paclobutrazol (PBZ), um triazol que pode ser absorvido pelas folhas, caules e raízes, sendo translocado através do xilema até os meristemas subapicais de crescimento, onde irá inibir a biossíntese das giberelinas e, desta forma irá modificar o metabolismo (SILVA, 2008). Quando utilizada na conservação *in vitro*, pode beneficiar o aumento do tempo entre os subcultivos das plantas e proporcionar menor custo para manutenção de bancos de germoplasma em laboratório.

Melhoramento genético e as espécies silvestres

Segundo Fukuda; Porto (1991), os trabalhos de pesquisa direcionados para os programas de melhoramento da mandioca no Brasil iniciaram-se na década de 1940, através de institutos de pesquisa que visavam atender os objetivos e necessidades de suas respectivas regiões. O programa de melhoramento genético de mandioca do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) é o mais antigo do Brasil. De acordo com Lara et al. (2008), os programas internacionais de melhoramento genético convencional de mandioca, como o do Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), na Colômbia, do Instituto Internacional para a Agricultura Tropical (IITA), na Nigéria, e os dois centros do Conselho de Pesquisa Agrícola Internacional (CGIAR), têm se destacado no desenvolvimento e na distribuição de variedades de mandioca resistentes a algumas doenças e pragas.

Devido a adaptação específica das variedades de mandioca em diferentes ecossistemas do Brasil, a partir de 1994, sob a liderança da Embrapa Mandioca e Fruticultura (CNPMPF) estabeleceu-se seis bancos regionais de mandioca [Embrapa Semiárido (CPATSA), Petrolina-PE; Embrapa Amazônia Oriental (CPATU), Belém-PA; Embrapa Amazônia Ocidental (CPAA), Manaus-AM; Embrapa Cerrados (CPAC),

Brasília-DF; Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (EPAGRI), Itajaí-SC] tendo como objetivo principal prevenir a erosão genética da espécie *M. esculenta* dentro dos diferentes ecossistemas que estão localizados, afim de auxiliar e dar suporte aos programas de melhoramento regionais desta cultura (FUKUDA et al., 1999).

Os principais métodos utilizados no melhoramento da mandioca são: introdução e seleção de cultivares, hibridação intraespecífica, hibridação interespecífica e a indução de poliplóides. Porém, a hibridação intraespecífica é o método mais utilizado no melhoramento da mandioca, onde os cruzamentos são feitos entre parentais de uma única espécie, que possuem características complementares, seguidos da seleção fenotípica dos clones, baseando-se em seu comportamento, durante alguns anos e em localidades diferentes. Contudo, para que este método seja satisfatório, é necessário uma seleção adequada dos parentais e dos híbridos mais eficazes dentro das progênies oriundas de cada cruzamento (FUKUDA; IGLESIAS, 2006).

A mandioca apresenta alta taxa heterozigótica, devido a cruzamentos naturais intraespecíficos e à propagação vegetativa, que favoreceram consideráveis números de variedades com diferentes características morfológicas, tornando-a, então, bastante adaptativa às diversas condições de clima e solo, assim como resistente e/ou tolerante a algumas pragas e doenças (LORENZI, 2003). Vale ressaltar que estas características são consideradas de extrema importância dentro dos programas de melhoramento genético desta cultura.

Em inúmeras culturas, as espécies silvestres vêm sendo empregadas por melhoristas como fonte de caracteres úteis, não encontrados nas variedades da espécie cultivada. Segundo Nassar (2006), as espécies silvestres de *Manihot* são importantes fontes de resistência a fatores bióticos e abióticos para a espécie comercializada, possibilitando, através da hibridação introgressiva, o desenvolvimento de variedades mais produtivas e menos susceptíveis a fatores variados, como pragas e estresses abióticos. Desta forma, o cruzamento de espécies silvestres de mandioca com espécies cultivadas tem sido frequentemente utilizado como método de aumentar a diversidade genética na cultura em programas de melhoramento.

Conforme Cordeiro et al. (2015), já foram identificadas 27 espécies silvestres na região Nordeste do Brasil, dentre elas: *Manihot 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. fortalezensis* Nassar, D. G. Ribeiro, Bonfim & P. T. C. Gomes, *M. gracilis* Pohl, *M. jacobinensis* Müll. Arg., *M. janiphoides* Müll. Arg., *M. leptophylla* Pax, *M. longiracemosa* P. Carvalho & M. Martins, *M. maracasensis* Ule, *M. pohliana* Müll. Arg., *M. pohlii* Wawra, *M. quinquefólia* Pohl, *M. quinquepartita* Huber ex D. J. Rogers & Appan, *M. reniformis* Pohl, *M. tripartita* (Spreng.) Müll. Arg., *M. triphylla* Pohl, *M. tristis* Müll. Arg., *M. weddelliana* Baill e *M. zehntneri* Ule.

Estudos realizados comprovam o potencial de algumas espécies silvestres, obtendo-se resultados satisfatórios a exemplo de: *M. glaziovii* como fonte de resistência ao vírus do mosaico africano e à cochonilha da mandioca (STOREY; NICHOLS, 1938; JENNINGS, 1976; CHAVARRIAGA et al., 2004); *M. flabellifolia* apresentando resistência moderada à ácaro, mosca branca e cochonilha (BURBANO et al., 2006; AKINBO et al., 2012); *M. pseudoglaziovii* Pax & Hoffman. com resistência à bacteriose e adaptação às condições de seca (CHÁVEZ et al., 1989; BELTRÃO et al., 2015); *M. dichotoma* para alta produção de raízes (NASSAR et al., 2004); *M. tristis* com expressiva resistência à mosca branca (CARABALÍ, 2010); *M. attenuata* Müll. Arg., *M. rubricaulis* I. M. Johnst e *M. grahamii* Hook mostrando boa adaptação a temperaturas mais baixas (CHÁVEZ, 1990).

Conseqüentemente, como as espécies silvestres do gênero *Manihot* e subespécies de *M. esculenta* integram fontes de genes que podem ser utilizados no desenvolvimento de novas variedades, vários pesquisadores (FUKUDA et al., 1999; NASSAR 2006; LEDO et al., 2011; NEVES et al., 2014) vêm ressaltando a importância do material genético destas espécies. Logo, é perceptível a necessidade e importância de conservar essas espécies em Bancos ativos de Germoplasma (BAG), uma vez que a eficiência de um programa de melhoramento fundamenta-se no conhecimento do germoplasma disponível, sobretudo de sua diversidade genética.

Multiplicação da mandioca e cultivo *in vitro*

A mandioca é uma espécie alógama que, de acordo com Graner (1942), possui reprodução sexuada, apresentando inflorescências masculinas e femininas

separadas, porém, presentes na mesma planta (monóica), além de uma protoginia expressiva, que contribui para a polinização cruzada. A semente é a via de reprodução sexual da planta, apesar de não ser a forma mais utilizada para sua propagação. Atualmente, a multiplicação de sementes botânicas tem sido realizada por instituições que desempenham pesquisas de melhoramento genético, pois possibilitam a produção de novas cultivares geneticamente superiores.

A propagação da mandioca é realizada pela forma vegetativa (via assexuada), a partir de fragmentos (estacas) da haste, também chamados de manivas, que são retiradas da planta mãe e plantadas em campo, originando novas plantas. Porém, alguns fatores são considerados limitantes para esse tipo de propagação, dentre eles: a baixa taxa de multiplicação das manivas, a redução da qualidade de manivas utilizadas em sucessivos plantios devido ao acúmulo de pragas e doenças, que são transmitidas nas gerações seguintes, implicando na redução da produtividade, e a facilidade de disseminação de pragas e doenças dentre e entre regiões (FUKUDA, 1993; OLIVEIRA et al., 2000, FUKUDA; CARVALHO 2006). Diante disso, a produção de manivas sadias, partindo de materiais gerados pela micropropagação, constitui um importante procedimento na produção de materiais de plantio com qualidade fitossanitária.

A propagação vegetativa é bastante desejável para a propagação de espécies silvestres de *Manihot*, uma vez que possibilita a manutenção das características genéticas da planta matriz, como também a produção de novas plantas de forma mais rápida. Entretanto, existem algumas limitações no estabelecimento dessas espécies fora do seu ambiente natural. A multiplicação vegetativa é mais laboriosa, devido à dificuldade de enraizamento e regeneração, além disso, algumas espécies produzem poucos frutos e apresentam uma taxa de germinação de sementes variável. Isso torna-se um obstáculo a ser superado nos programas de melhoramento dessa cultura, pois compromete o planejamento eficiente da conservação do germoplasma.

O uso da biotecnologia, mediante a cultura de tecidos, consiste na formação de novas plantas a partir de um pequeno explante inoculado em meio nutritivo artificial, sob condições assépticas e controladas. Essas condições devem ser adequadas ao sistema de propagação, a fim de obter um melhor desenvolvimento e garantir a estabilidade genética e as características da planta após o período de armazenamento, como também permitir a produção em larga escala em tempo e espaço reduzidos.

Segundo Carvalho et al. (2006), a micropropagação é uma das técnicas de cultura de tecidos que proporciona uma alternativa à propagação vegetativa convencional, permitindo a produção em larga escala de forma mais eficiente, disponibilizando diferentes métodos de propagação a partir do cultivo de pequenos propágulos (células, tecidos e órgãos), em um meio de crescimento adequado e em condições assépticas que possibilitem a regeneração da planta. Nessa técnica, procura-se a maximização da multiplicação de gemas, que está diretamente relacionada com o meio de crescimento e as funções de seus componentes.

Ademais, essa técnica se baseia, no aproveitamento da totipotência das células vegetais, isto é, na capacidade de gerar órgãos (organogênese) ou embriões (embriogênese somática) que darão origem a uma planta (PASQUAL et al., 1997). Em concordância com Grattapaglia; Machado (1998), na organogênese a formação das estruturas ocorre a partir de células ou tecidos que pode acontecer de duas formas: através da regeneração de plantas sem passar pela fase de calo (via direta), denotando alta fidelidade genética, ou no processo de regeneração anteposto pela formação de calo (via indireta).

A determinação do meio de cultura mais favorável é um fator relevante para a micropropagação, devido a importância que seus componentes desempenham no processo de regeneração. De acordo com Caldas et al. (1998), no crescimento *in vitro* o meio nutritivo deve ser composto por todas as fontes de micronutrientes e macronutrientes, vitaminas e reguladores de crescimento, como também fontes de carbono e oxigênio que permitam o desenvolvimento da planta como se estivesse em condições naturais, mesmo apresentando-se heterotrófica e com tamanho limitado. Entre as funções desempenhadas pelo meio, atribui-se a sustentação física do explante e o fornecimento de todos os nutrientes que compõem o crescimento e desenvolvimento do material vegetal.

Existem várias formulações dos meios de cultura. Entretanto o mais difundido é o meio formulado por Murashige; Skoog (1962), conhecido universalmente como meio MS, que tem sido abundantemente empregado em trabalhos de cultura de tecidos, a exemplo da multiplicação de segmentos nodais, da indução de embriogênese somática e do resgate e cultivo de embriões. De acordo com Villa et al., (2009), essencialmente o meio de cultura é constituído por água (destilada, deionizada de osmose reversa), macronutrientes inorgânicos (N; K; Ca; Mg; P; S; Si),

micronutrientes inorgânicos (Cl; Fe; B; Mn; Na; Zn; Cu; Ni; Mo), vitaminas (ácido nicotínico; piridoxina; tiamina), aminoácidos (tirosina; L-arginina; L-serina), fontes de nitrogênio orgânico (glicina; inositol), carboidratos (sacarose), agentes solidificantes e ou gelatinosos (ágar ou Phytigel®) quando o meio for utilizado na forma sólida, e fitorreguladores sintéticos (auxinas; citocininas; giberelinas).

Ocasionalmente, o meio também pode ser suplementado com outras substâncias: fungicidas e antibióticos para controle de contaminações, carvão ativado, empregado para retenção de impurezas e substâncias tóxicas (fenóis), diminuição dos efeitos residuais das citocininas, indução, enraizamento e maturação de embriões somáticos (QUISEN; ANGELO, 2008), além de aditivos orgânicos (hidrolisado de caseína; extrato de levedura). É importante considerar que a definição do meio de cultura mais compatível para cada espécie é indispensável para se obter resultados satisfatórios na propagação de culturas *in vitro*.

Diante do exposto, trabalhos relacionados aos métodos de propagação vegetativa e conservação de germoplasma são altamente relevantes. Logo, este estudo teve como objetivo colaborar na otimização dos métodos de micropropagação e conservação *in vitro*, de espécies silvestres de *Manihot*, de forma a auxiliar na sua multiplicação e preservação, tornando-as disponíveis para programas de melhoramento genético da mandioca.

REFERÊNCIAS

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.

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.

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

BARROSO, G. M.; MORIM, M. P.; PEIXOTO, A. L.; ICHASO, C. L. F. **Frutos e sementes**: morfologia aplicada à sistemática de dicotiledôneas. Viçosa: Editora UFV, 443p. 1999.

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, 2015.

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**, 2006 (Submitted).

CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios Nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética**. Brasília-DF: Embrapa-SPI: Embrapa-CNPq, 1998. v.1 p. 87-132.

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

CARVALHO, J. M. F. C.; SILVA, M. M. de A.; MEDEIROS, M. J. L. e. **Fatores inerentes à micropropagação**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 28 p. 2006. (Embrapa Algodão. Documentos, 148). Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPA/18325/1/DOC148.pdf>>. Acesso em: 11 Set. 2017.

CARVALHO, L. J. C. B. Biodiversidade e biotecnologia em mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MANDIOCA, 11, 2005, anais. Campo Grande: MS. Ciência e tecnologia para raiz do Brasil: Governo do Estado de Mato Grosso do Sul; Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, 2005. Não paginado.

CARVALHO, P. C. L. Biosistemática de *Manihot*. In: SOUZA, L. da S.; FARIAS, A. R. N.; MATOS, P. L. P. de; FUKUDA, W. M. G. (Org.). Aspectos socioeconômicos e agronômicos da mandioca. 1. ed. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2006. v. 1, p. 112-125.

CHAVARRIAGA, P.; PRIETO, S.; HERRERA, C. J.; LÓPEZ, D.; BELLOTTI, A. C.; TOHME, J. (2004). Screening transgenics unveils apparent resistance to hornworm (*E. ello*) in the nontransgenic, African cassava clone 60444. In: International Scientific Meeting of the Cassava Biotechnology Network, 6th 2004, Cali, Colombia. Adding value to a small-farmer crop: proceedings. Cali: CIAT, 2004. p. 4. Edited by Alfredo Alves and Joe Tohme.

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**. Mexico, 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.

CIAT. **El cultivo de meristemas para la conservación de germoplasma de yuca *in vitro***; unidad audiotutorial. Cali, 1984. 44p. (CIAT. Guia de Estudio. Serie 045C-02.05).

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: 16 jan. 2018.

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, 3.; REUNIÃO LATINO AMERICANA DE ESPECIALISTAS EM *Arachis*, 3.; REUNIÃO LATINO AMERICANA DE ESPECIALISTAS EM RECURSOS GENÉTICOS FLORESTAIS, 3., 2001, Londrina. **Anais...** Londrina: IAPAR, p. 30-32, 2001.

FAO - Food and Agriculture Organization. **Fao stat Database Gateway**. 2014. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>>. Acesso em: 24 ago. 2016.

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

FUKUDA, C. Doenças da mandioca. In: EMBRAPA. Centro Nacional de Mandioca e Fruticultura. **Instruções práticas para o cultivo da mandioca**. Cruz das Almas, BA, 1993, p. 53-56.

FUKUDA, W. M. G.; CAVALCANTI, J.; FUKUDA, C.; COSTA, I. R. S. Variabilidade genética e melhoramento da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). In: QUEIROZ, M. A. de; GOEDERT, C. O.; RAMOS, S. R. R. (ed) Recursos Genéticos e melhoramento de plantas para o Nordeste brasileiro. Petrolina: Embrapa Semiárido; Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1999. Não paginado.

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

FUKUDA, W. M. G.; PORTO, M. C. M. A mandioca no Brasil. **Mejoramiento genético de la yuca en América Latina, Cali, Colombia**. CIAT, p. 15-42, 1991.

FUKUDA, W. M. G.; SILVA, S. O.; IGLESIAS, C. Cassava Breeding. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.2, p.617-638, 2002.

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

FUKUDA, W. M. G.; IGLESIAS, C. **Melhoramento Genético**. In: SOUZA, L. S.; FARIAS, A. R. N.; MATTOS, P. L. P.; FUKUDA, W. M. G. (Ed.). Aspectos Socioeconômicos e Agronômicos da Mandioca. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2006. P. 325-355.

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

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília-DF, Embrapa-SPI: Embrapa-CNPq, 1998. v.1, p.183- 260.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Levantamento Sistemático da Produção Agrícola-LSPA. Disponível em: <[ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Levantamento_Sistematico_da_Producao_Agricola\[mensal\]/Fasciculo/lspa_201701.pdf](ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Levantamento_Sistematico_da_Producao_Agricola[mensal]/Fasciculo/lspa_201701.pdf)> Acesso em: 6 mar. 2017.

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.

LARA, A. C. C.; BICUDO, S. J.; BRACHTVOGEL, E. L.; ABREU, M. L.; CURCELLI, F. Melhoramento genético da cultura da mandioca (*Manihot esculenta* crantz). **Revista Raízes e Amidos Tropicais**, v. 4, n. 1, p. 54-64, 2008.

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. Comunidade Técnico, 146).

LEDO, C. A. da S.; ALVES, A. A. da S.; SILVEIRA, T. C. da; OLIVEIRA, M. M. de; SANTOS, A.; TAVARES FILHO, L. D. Q. **Caracterização morfológica da coleção de espécies silvestres de Manihot (Euphorbiaceae-Magnoliophyta) da Embrapa Mandioca e Fruticultura**. Cruz das Almas, BA: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2011. 22 p. (Embrapa Mandioca e Fruticultura. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 53).

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.

LORENZI, J. O. **Mandioca**. 1. ed. Campinas: CATI, 2003. 116 p. (CATI. Boletim Técnico, 245).

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

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

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

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

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

NEVES, R. de J.; de CARVALHO, P. C. L.; ALVES, A. A. C.; LEDO, C. A. da S.; MARTINS, M. L. L. Espécies Silvestres de *Manihot* Mill. (Euphorbiaceae) da Coleção da Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, Bahia, Brasil. **Iheringia. Série Botânica**. v. 69, n. 2, p. 245-256, 2014.

NIÑO, D. P.; ARANZALES RONDÓN, E.; ERAZO, J. C.; LÓPEZ, J. J.; VÉLEZ, M. The Bonsai as an alternative safety duplication system of the world cassava collection preserved at CIAT. 2016

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.

OLIVEIRA, R. P. de; GOMES, T. S.; VILARINHOS, A. D. Avaliação de um sistema de micropropagação massal de variedades de mandioca. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v. 35, n. 12, p. 2329-2334. 2000.

OTSUBO, A. A.; BITENCOURT, P. H. F.; PEZARICO, C. R. **Mandioca de mesa**: aspectos de produção, comercialização e consumo em Dourados.MS. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, 2001. 36 p (Embrapa Agropecuária Oeste. Documentos, 36).

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

QUISEN, R. C.; ANGELO, P. C da S. Manual de procedimentos do Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Amazônia Ocidental. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental-Documentos, 2008. 44 p. (Embrapa Amazônia Ocidental. Documentos, 61).

REZENDE, J. C.; PASQUAL, M.; CARVALHO, S. P.; PEREIRA, A. R.; VILLA, F. V. Influência do meio de cultura e concentração de agar no crescimento e desenvolvimento de plântulas de café oriundas da embriogênese somática direta. **Scientia Agraria**, v.9, n.1, p.21-26, 2008.

ROCA, W. M.; CHAVEZ, R.; MARTIN, M. L.; ARIAS, D. I.; MAFLA, G.; REYES, R. In vitro methods of germ-plasm conservation. **Genome**, v.31, p. 813-817, 1989.

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.

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.

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.

SOUZA, C. C. Evolução da produção e suprimento mundial de mandioca. **Agrolink**, 2013. Disponível em: <http://www.agrolink.com.br/colunistas/ColunaDetalhe.aspx?CodColuna=4830>. Acesso em: 27 dez. 2017.

STOREY, H. H.; NICHOLS, F. W. Studies of mosaic of cassava. **Annals of Applied Biology**, v. 25, p. 790-806, 1938.

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

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

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 I
MEIOS DE CULTURA PARA A MULTIPLICAÇÃO DE ESPÉCIES SILVESTRES DE
***Manihot*¹**

¹ Artigo a ser submetido ao periódico Ciência Agronômica

MEIOS DE CULTURA PARA A MULTIPLICAÇÃO DE ESPÉCIES SILVESTRES DE *Manihot*

RESUMO:

A mandioca é propagada convencionalmente de forma vegetativa, a partir de estacas (manivas). Porém, esse sistema de propagação é muito lento e, além disso, permite que várias doenças possam ser transmitidas por sucessivas gerações. A utilização de técnicas da cultura de tecidos torna-se uma alternativa para superar essas limitações e, entre elas, a micropropagação constitui uma forma de disponibilizar plantas isentas de pragas e patógenos. Dessa maneira, o objetivo desse estudo foi verificar o efeito de meios de cultura na multiplicação *in vitro* de cinco espécies silvestres de *Manihot*. O experimento foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Mandioca e Fruticultura, empregando-se o delineamento experimental inteiramente ao acaso, em esquema fatorial 5 x 6, sendo cinco espécies silvestres de *Manihot* e seis meios de cultura, com 11 repetições. Os explantes consistiram de segmentos nodais das espécies *Manihot flabellifolia* Pohl, *M. tristis* Müll.Arg, *M. caerulescens* Pohl, *M. chlorosticta* Standl. e *M. jacobinensis* Müll.Arg, extraídos da coleção de espécies silvestres de mandioca mantidas *in vitro*, com aproximadamente 1 cm de tamanho e pelo menos uma gema lateral. Colocou-se apenas um segmento por tubo de ensaio (25 mm x 150 mm), contendo 10 mL dos meios de cultura MS 0,01, 17N, 12A₃, 4E, 8S e WPM, solidificados com Phytigel® (2,4 g.L⁻¹). Em seguida, os tubos que continham os explantes foram mantidos durante 90 dias em sala de crescimento com irradiância de 30 µmol.m⁻².s⁻¹, temperatura de 27± 1 °C e fotoperíodo de 16 horas. Após os 90 dias, foram analisadas as variáveis altura de planta (cm), número de folhas vivas, número de folhas mortas, número de brotos, número de microestacas (com 1 cm), massas fresca e seca de parte aérea (mg), massas fresca e seca de raízes (mg) e massa de calo (mg). Os meios MS 0,01 e WPM mostraram-se mais responsivos em relação aos demais meios utilizados, enquanto o meio 12A₃ não demonstrou eficiência durante a multiplicação. A utilização de diferentes meios de cultura influencia no comportamento durante a multiplicação *in vitro* das espécies silvestres de *Manihot*. Portanto, é provável que esses resultados possam também ser utilizados na micropropagação de outras espécies silvestres do gênero *Manihot*.

Palavras chave: Mandioca; parentais silvestres; meios nutritivos; cultura de tecidos; micropropagação

MEDIA OF CULTURE FOR THE MICROPROPAGATION OF WILD SPECIES OF *Manihot*

ABSTRACT:

Cassava is conventionally propagated vegetatively from stakes (cuttings). However, this system of propagation is very slow and, in addition, allows several diseases to be transmitted by successive generations. The use of tissue culture techniques becomes an alternative to overcome these limitations and, among them, micropropagation is a way of making plants free of pests and pathogens. In this way, the objective of this study was to verify the effect of culture media in the *in vitro* multiplication of five wild species of *Manihot*. The experiment was carried out in the Laboratory of Tissue Culture of Embrapa Cassava and Fruits, using a completely randomized experimental design, in a 5 x 6 factorial scheme, five wild *Manihot* species and six culture media, with 11 replicates. The explants consisted of nodal segments of the species *Manihot flabellifolia* Pohl, *M. tristis* Müll.Arg, *M. caerulescens* Pohl, *M. chlorosticta* Standl. and *M. jacobinensis* Müll.Arg, extracted from the collection of wild cassava species maintained *in vitro*, approximately 1 cm in size and at least one lateral bud. Only one segment was placed per test tube (25 mm x 150 mm), containing 10 mL of the MS media 0,01, 17N, 12A₃, 4E, 8S and WPM, solidified with Phytigel® (2,4 g.L⁻¹). Then the tubes containing the explants were maintained for 90 days in a growth room with irradiance of 30 µmol.m⁻².s⁻¹, temperature of 27 ± 1 °C and photoperiod of 16 hours. After 90 days, the following variables were analyzed: plant height (cm), number of live leaves, number of dead leaves, number of shoots, number of microcuttings (1 cm), fresh and dry shoot mass fresh and dry root mass (mg) and callus mass (mg). The MS 0,01 media and WPM were more responsive to the other media used, whereas the 12A₃ medium did not demonstrate efficiency during multiplication. The use of different culture media influences the behavior during the *in vitro* multiplication of the wild species of *Manihot*. Therefore, it is likely that these results can also be used in the micropropagation of other wild species of the genus *Manihot*.

Keywords: Cassava; wild parental; nutritional media; tissue culture; micropropagation

INTRODUÇÃO

A micropropagação é um método de propagação vegetativa bastante estudado em muitas espécies vegetais, sendo a modalidade dentro da cultura de tecidos mais difundida, obtendo-se resultados práticos e eficientes no desenvolvimento e multiplicação de novas plantas a partir de pequenas partes (células, tecidos ou órgãos) inoculadas em meio de crescimento artificial sob condições assépticas (PIZA; PINHO, 2002) e ambientais (iluminação e temperatura) controladas. Também possibilita a limpeza clonal dos materiais cultivados denotando alta qualidade fitossanitária e permitindo a produção de mudas em larga escala em curto espaço de tempo e reduzido espaço físico, além de adequar para as condições *in vitro* de alguns métodos de propagação vegetativa convencionais (estaquia, enxertia) e desenvolver populações com plantas mais homogêneas.

A escolha do meio de cultura mais adequado é um fator pertinente durante a multiplicação, devido a importância que seus componentes desempenham no processo de regeneração. De acordo com Caldas et al. (1998), no crescimento *in vitro* o meio nutritivo deve ser composto por todas as fontes de micronutrientes e macronutrientes, vitaminas e reguladores de crescimento, como também fontes de carbono e oxigênio que permitam o desenvolvimento da planta como se estivesse em condições naturais, mesmo apresentando-se heterotrófica e com tamanho limitado. Entre as funções desempenhadas pelo meio, atribui-se a sustentação física do explante e o fornecimento de todos os nutrientes que compõem o crescimento e desenvolvimento do material vegetal.

Existem várias formulações dos meios de cultura. Entretanto o mais difundido é o meio formulado por Murashige; Skoog (1962), conhecido universalmente como meio MS, que tem sido abundantemente empregado em trabalhos de cultura de tecidos, a exemplo da multiplicação de segmentos nodais, da indução de embriogênese somática e do resgate e cultivo de embriões. De acordo com Villa et al., (2009), essencialmente o meio de cultura é constituído por água (destilada, deionizada de osmose reversa), macronutrientes inorgânicos (N; K; Ca; Mg; P; S; Si), micronutrientes inorgânicos (Cl; Fe; B; Mn; Na; Zn; Cu; Ni; Mo), vitaminas (ácido nicotínico; piridoxina; tiamina), aminoácidos (tirosina; L-arginina; L-serina), fontes de nitrogênio orgânico (glicina; inositol), carboidratos (sacarose), agentes solidificantes

e ou gelatinosos (ágar ou Phytigel®) quando o meio for utilizado na forma sólida, e fitorreguladores sintéticos (auxinas; citocininas; giberelinas).

Habitualmente, estratégias de cultura de tecidos são aplicadas quando os sistemas convencionais de propagação sexuada e vegetativa não são satisfatórios. Na cultura da mandioca, a propagação pode acontecer via reprodução sexuada. Entretanto, segundo Cerqueira et al. (2016), o método de propagação mais utilizado é mediante estacas ou manivas oriundas de partes da planta mãe. Contudo, esse sistema contribui para a transmissão de pragas e doenças (destacando-se as sistêmicas) nas gerações seguintes, podendo afetar a produtividade da cultura.

Dessa forma, a micropropagação torna-se uma alternativa vantajosa em relação ao método de propagação convencional da mandioca, haja vista que, entre outras vantagens, propiciará a produção de plantas com qualidade fitossanitária. Para a *M. esculenta* o meio de cultura 4E (ROCA et al., 1991) é utilizado na fase de estabelecimento, já os meios 17N (CIAT, 1982) e MS 0,01 são empregados durante a multiplicação, o meio de cultura 12A₃ (MAFLA et al., 2010) é recomendado pelo CIAT apenas para multiplicação *in vitro* das espécies silvestres de *Manihot* e o meio de cultura 8S é manipulado durante a conservação *in vitro*. Diversos trabalhos tem sido realizados mostrando a eficiência dessa técnica para a mandioca (DEMEKE et al., 2014; SHIJI et al., 2014; KABIR et al., 2015; MONGOMAKE et al., 2015; ANJUM; SHAZIA, 2015).

Por consequência, o cultivo *in vitro* também é uma estratégia viável para a propagação das espécies silvestres de mandioca, que são de grande importância dentro de programas de melhoramento genético da mandioca. Entretanto, estudos direcionados aos métodos de multiplicação dessas espécies têm sido insuficientes. O comportamento bastante heterogêneo que cada uma das espécies apresenta, quando micropropagadas, tem sido um dos principais obstáculos, tornando-se indispensável o estudo de adequação de metodologias que permitam uma multiplicação eficiente. Portanto, o objetivo desse trabalho foi verificar o efeito de meios de cultura na multiplicação *in vitro* de cinco espécies silvestres de *Manihot*.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi desenvolvido no período de novembro de 2016 a fevereiro de 2017 no Laboratório de Cultura de Tecidos (LCT) do Núcleo de Biologia Avançada

(NBIO), pertencente a Embrapa Mandioca e Fruticultura (CNPMPF), localizada em Cruz das Almas, Bahia. Nesse estudo utilizou-se os acessos caracterizados de *Manihot flabellifolia* Pohl; *M. tristis* Müll.Arg; *M. caerulescens* Pohl; *M. chlorosticta* Standl. e *M. jacobinensis* Müll.Arg, oriundos da coleção *in vitro* da Embrapa Mandioca e Fruticultura.

As plantas das espécies silvestres citadas anteriormente foram previamente cultivadas *in vitro*. Após o cultivo, em câmara de fluxo, as plantas foram seccionadas para obtenção dos explantes, considerou-se microestacas (Figura 1A) com aproximadamente 1 cm de comprimento, contendo pelo menos uma gema. Em seguida, as microestacas foram inoculadas (Figura 1B) em tubos de ensaio de 2,5 cm x 15 cm contendo 10 mL dos meios de cultura estudados. Posteriormente, os tubos de ensaio que continham os explantes foram mantidos durante 90 dias em sala de crescimento (Figura 1C) com irradiância de $30 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, temperatura de $27 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 16 horas.

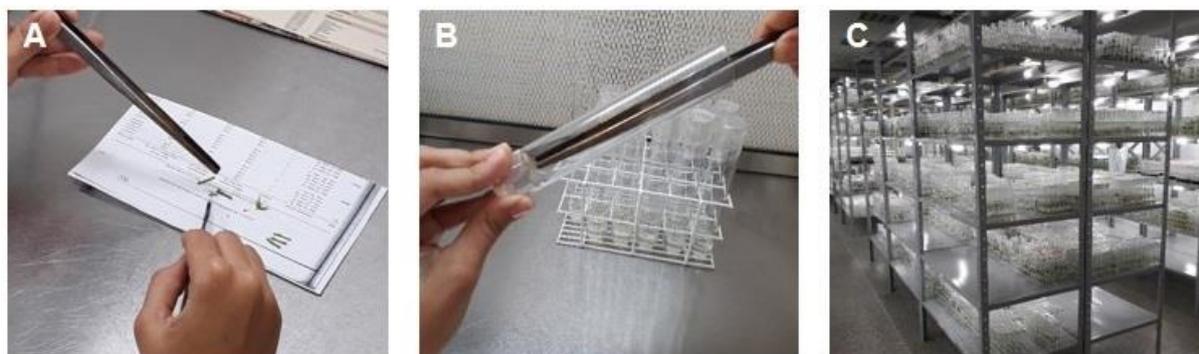


Figura 1. Etapas do processo de multiplicação de *Manihot spp*: Obtenção de microestacas em câmara de fluxo (A); inoculação do explante em meio nutritivo (B) e cultivo em sala de crescimento (C). Fotos: Jucieny Ferreira de Sá.

O meios de cultura MS 0,01 (SOUZA et al., 2008), 17N (CIAT, 1982), 12A₃ (MAFLA et al., 2010), 4E (ROCA et al., 1991), 8S (CIAT, 1984) e WPM (LLOYD; McCOWN, 1980)], que foram autoclavados por 20 min a $120 \text{ }^\circ\text{C}$, estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Composição dos meios de cultura 4E, 17N, 8S, MS0,01, 12A₃ e WPM, utilizados na multiplicação de cinco espécies silvestres de *Manihot*.

Componentes (mg/L)	Meios de cultura					
	4E	17N	8S	MS 0,01	12A ₃	WPM
Macronutrientes						
NH ₄ NO ₃	1.650	577,5	1.650	1.650	1.650	400
KNO ₃	1.900	665	1.900	1.900	1.900	556
CaCl ₂ .2H ₂ O	450	154	450	450	450	96
MgSO ₄ .7H ₂ O	370	129,5	370	370	370	370
KH ₂ PO ₄	170	59,5	170	170	170	170
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8	9,73	27,8	27,8	27,8	27,8
K ₂ SO ₄	-	-	-	-	-	990
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	37,3	13,055	37,3	37,3	37,3	37,3
Micronutrientes						
KI	0,83	0,291	0,83	0,83	0,83	-
H ₃ BO ₃	6,2	2,17	6,2	6,2	6,2	6,2
MnSO ₄ .4H ₂ O	22,3	7,805	22,3	22,3	22,3	22,3
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6	3,01	8,6	8,6	8,6	8,6
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25	0,09	0,25	0,25	0,25	0,25
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025	0,009	0,025	0,025	0,025	0,25
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025	0,009	0,025	0,025	0,025	-
Vitamina + Hexitol						
Tiamina-HCl	1	1	1	0,1	1	1
Piridoxina-HCl	-	-	-	0,5	-	0,5
Ácido nicotínico	-	-	-	0,5	-	0,5
Glicina	-	-	-	2	-	2
Inositol	100	100	100	100	100	100
Reguladores de crescimento						
ANA	0,02	0,01	0,01	0,01	-	-
BAP	0,04	-	0,02	0,01	-	-
AG ₃	0,05	0,01	0,1	0,01	-	-
Cinetina	-	-	-	-	0,2	-
Outros suplementos						
Carvão ativado	-	-	-	-	1.000	-
CuSO ₄ .5H ₂ O	-	-	-	-	500	-
Sacarose	20.000	20.000	20.000	20.000	20.000	20.000
Phytigel®	2.400	2.400	2.400	2.400	2.400	2.400
pH	5,8	5,8	5,8	5,8	5,8	5,8

Após esse período, as plantas foram submetidas a avaliação (Figura 2A e 2C) das seguintes características: altura de planta (AP; cm), número de folhas vivas (NFV), número de folhas mortas (NFM), número de brotos (NB), número de microestacas com tamanho de 1 cm (NME), massa fresca de parte aérea (MFPA; mg), massa fresca de raízes (MFR; mg) e massa de calo (MC; mg). Todo o material vegetal foi identificado e mantido em estufa com circulação de ar forçada e temperatura de 70 °C por 48 horas (Figura 2 B). Depois desse período, determinou-se a massa seca de parte aérea (MSPA; mg) e a massa seca de raízes (MSR; mg).



Figura 2. Fases do procedimento da avaliação de *Manihot spp*: Determinação do peso da massa fresca (A); acondicionamento dos materiais vegetais em estufa a 70 °C (B) e pesagem da massa seca (C) Fotos: Jucieny Ferreira de Sá.

Aplicou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado no esquema fatorial 5 x 6, sendo 5 espécies silvestres de *Manihot* e 6 meios de cultura, com 11 repetições, sendo cada repetição constituída por um explante (microestaca) em um tubo de ensaio. Os dados obtidos após a avaliação foram submetidos ao teste F da análise de variância. As médias dos tratamentos foram agrupadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Os valores do número de folhas vivas, número de folhas mortas, número de brotos e número de microestacas, foram transformados em $\sqrt{x + 0,5}$, visando o atendimento das pressuposições da análise de variância. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o pacote 'ExpDes.pl' implementado no software R versão 3.4.2. (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2017).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para o desenvolvimento eficiente de um cultivo *in vitro* deve-se considerar a interação de alguns fatores, a exemplo do estado fisiológico da planta, das condições de cultivo e do genótipo/espécie, pois irão contribuir no resultado desse cultivo. O gênero *Manihot* possui ampla variabilidade genética (NASSAR; GRATTAPAGLIA, 1986), o que é corroborado por Mühlen (1999), quando comprovou que algumas espécies silvestres de mandioca apresentam igual ou maior variabilidade que a espécie cultivada.

Dessa maneira, pôde-se observar comportamentos bastante distintos das espécies analisadas neste estudo. De acordo com a análise de variância apresentada na Tabela 2, observa-se que as espécies, da mesma maneira que os meios de cultura, como fatores isolados, influenciaram de forma altamente significativa ($p < 0,01$) para a maioria das variáveis analisadas, à exceção da variável número de brotos que apresentou efeito altamente significativo ($p < 0,01$) apenas no fator espécies.

Tabela 2. Resumo da análise de variância para as variáveis altura de planta (AP; cm), número de folhas vivas (NFV), número de folhas mortas (NFM), número de brotos (NB), número de microestacas (NME), massa fresca de parte aérea (MFPA; mg), massa seca de parte aérea (MSPA; mg), massa fresca de raízes (MFR; mg), massa seca de raízes (MSR; mg) e massa de calo (MC) de espécies de *Manihot* (*M. flabellifolia*; *M. tristis*; *M. caerulescens*; *M. chlorosticta* e *M. jacobinensis*) em função de seis meios de cultura aos 90 dias de cultivo *in vitro*.

FV	GL	QM									
		AP	NFV	NFM	NB	NME	MFPA	MSPA	MFR ¹	MSR ¹	MC ²
Espécies	4	153,63**	20,87**	4,12**	0,49**	1,01**	89,01**	1,09**	77,14**	0,60**	9,56**
Meios	5	211,27**	7,17**	2,37**	0,06 ^{NS}	4,67**	133,81**	1,55**	25,28**	0,43**	6,04**
Espécies * Meios	20 (18 ¹ , 15 ²)	43,53**	1,04**	0,59*	0,01 ^{NS}	0,53**	29,49**	0,42**	29,00**	0,15**	1,97**
Erro	201 (135 ¹ , 140 ²)	13,51	0,37	0,29	0,03	0,22	6,98	0,11	6,67	0,04	0,79
CV (%)		49,2	27,45	36,12	12,88	25,37	51,99	47,84	72,46	68,83	54,78
Média		7,47	5,36	2,23	1,28	3,25	160,65	21,52	112,74	9,47	51,36

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

De outro modo, vale ressaltar a interação altamente significativa entre espécies x meios para quase todas as variáveis, ainda que, também para a variável número de brotos, não houve interação, não influenciando, portanto, nos resultados obtidos. Nota-se que somente a variável número de folhas senescentes apresentou interação significativa ($p < 0,05$) entre genótipos x meios.

O cultivo *in vitro* das plantas das diferentes espécies silvestres apresentou crescimento bastante heterogêneo, como demonstram os respectivos coeficientes de variação (CV), que variaram entre 12,88% e 72,46% (Tabela 2) para as variáveis número de brotos e massa fresca de raízes, na devida ordem.

Esses resultados são semelhantes quando comparados com outros estudos. Silveira (2017) encontrou valores de CVs que variaram entre 12,70% e 109,52% na multiplicação *in vitro* de espécies silvestres de *Manihot*, enquanto Vidal et al. (2013) obtiveram valores de CVs que oscilaram entre 18,99% e 63,51% na micropropagação de *Manihot esculenta* Crantz. Na propagação *in vitro* de *Handroanthus impetiginosus* (Mart. ex Dc.) Mattos Mamedes (2013) encontrou valores de CV que variaram entre 15,17% e 52,40% enquanto Miranda et al. (2016) obtiveram CVs entre 12,25% e 99,53% na multiplicação *in vitro* de *Eremanthus incanus* Less.

De acordo com Werner et al. (2013), ainda existem poucos estudos relacionados aos valores adequados do CV para variáveis de experimentos na área de cultura de tecidos vegetais. Esses mesmos autores afirmam que a precisão de experimentos realizados mediante cultura de tecidos pode se apresentar baixa, devido a interferência de alguns fatores, como a variabilidade do material genético, o estágio fisiológico da planta que originou o tipo de explante, as características químicas e físicas do meio de cultura, a intensidade luminosa e a temperatura do cultivo.

Na Tabela 3, observa-se os resultados referentes ao desdobramento da interação para a variável altura de planta, sendo possível verificar que os meios de cultura MS 0,01, 8S e WPM contribuíram na obtenção dos maiores valores para o cultivo *in vitro* das espécies em estudo. O maior valor de AP (15,31 cm) foi obtido pela espécie *M. chlorosticta* quando cultivada no meio de cultura MS 0,01, não diferindo estatisticamente do valor encontrado no meio WPM (14,49).

Tabela 3. Valores médios da altura de planta (AP; cm) de cinco espécies de *Manihot* em função de seis meios de cultura aos 90 dias de cultivo *in vitro*.

Espécies	Meios de cultura					
	17N	12A ₃	MS 0,01	4E	8S	WPM
<i>M. flabellifolia</i>	5,16 bB	3,54 aB	6,85 bA	7,56 aA	8,28 bA	9,65 bA
<i>M. tristis</i>	9,41 aA	1,75 aB	6,96 bA	7,33 aA	7,30 bA	8,97 bA
<i>M. caerulescens</i>	3,24 bC	1,05 aC	10,31 bB	6,48 aC	13,75 aA	7,81 bB
<i>M. chlorosticta</i>	7,92 aB	4,40 aC	15,31 aA	8,77 aB	9,71 bB	14,49 aA
<i>M. jacobinensis</i>	2,80 bB	1,45 aB	7,09 bA	6,29 aA	5,89 bA	4,92 cA
Média	5,70	2,43	9,30	7,28	8,98	9,16

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas pertencem ao mesmo grupo pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância.

De acordo com Dezan et al. (2012) devido ao meio MS ser bastante concentrado em macronutrientes, micronutrientes, vitaminas e aminoácidos, o desenvolvimento de plantas é influenciado de maneira favorável. Alguns trabalhos realizados na micropropagação de *M. esculenta* Crantz (MAPAYI et al., 2013), *Dioscorea rotundata* (SIMÕES et al., 2017), *Solanum betaceum* (COPATTI et al., 2016) e pessegueiro (REIS et al., 2012), utilizando-se o meio de cultura MS, constataram a eficiência desse meio para o desenvolvimento *in vitro* em diferentes espécies. Vale ressaltar que as composições dos meios MS 0,01 e 8S são derivadas do MS. Por outro lado, segundo Moradkhani (2012), o meio de cultura WPM possui uma concentração inferior de nitrogênio total em comparação com o meio MS, podendo ocasionar crescimento mais tardio nos explantes.

Os valores apresentados na Tabela 4 referem-se ao desdobramento da interação entre os fatores espécies e meios de cultura para a variável número de folhas vivas. Nota-se que os meios de cultura MS 0,01, 4E, 8S e WPM foram estatisticamente superiores aos meios 17N e 12A₃ em relação às espécies *M. flabellifolia* e *M. jacobinensis*.

Tabela 4. Valores médios do número de folhas verdes (NFV) das plantas de cinco espécies de *Manihot* em função de seis meios de cultura aos 90 dias de cultivo *in vitro*.

Espécies	Meios de cultura					
	17N	12A ₃	MS 0,01	4E	8S	WPM
<i>M. flabellifolia</i>	3,25 bB	1,86 aB	4,50 bA	5,20 bA	4,89 bA	5,00 bA
<i>M. tristis</i>	6,00 aA	0,00 aB	3,00 bA	5,16 bA	5,33 bA	6,00 bA
<i>M. caerulescens</i>	1,54 bA	0,00 aB	2,25 bA	1,43 cA	3,62 bA	2,82 bA
<i>M. chlorosticta</i>	3,50 bA	2,33 aA	3,14 bA	3,75 bA	3,25 bA	4,50 bA
<i>M. jacobinensis</i>	6,00 aB	0,75 aC	15,22 aA	13,40 aA	15,20 aA	14,37 aA
Média	4,05	0,99	5,62	5,78	6,46	6,54

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas pertencem ao mesmo grupo pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância.

Observa-se que, de modo geral, a espécie *M. jacobinensis* foi estatisticamente superior às demais espécies analisadas, evidenciando os maiores valores de NFV (15,22; 15,20; 14,37 e 13,40), que foram proporcionados pelos meios MS 0,01; 8S; WPM e 4E, respectivamente. Em concordância com Ribeiro et al. (2014), o maior número de folhas proporciona a formação de mais gemas axilares e internódios em *Zantedeschia aethiopica* (L.) Spreng., refletindo no aumento do número de segmentos nodais e, por consequência, elevando-se a taxa de multiplicação durante o procedimento do subcultivo.

Para Taiz e Zeiger (2008), a senescência foliar é uma das explicações fisiológicas que possibilita a sobrevivência das plantas. Em relação a variável número de folhas mortas, observa-se que o meio de cultura WPM apresentou valores mais baixos, destacando-se as espécies *M. flabellifolia* e *M. tristis* (Tabela 5).

Tabela 5. Valores médios do número de folhas mortas (NFM) das plantas de cinco espécies de *Manihot* em função de seis meios de cultura aos 90 dias de cultivo *in vitro*.

Espécies	Meios de cultura					
	17N	12A ₃	MS 0,01	4E	8S	WPM
<i>M. flabellifolia</i>	1,50 aA	0,71 aA	0,25 bA	1,50 aA	1,44 cA	0,00 bA
<i>M. tristis</i>	1,25 aA	1,50 aA	1,80 bA	2,16 aA	1,16 cA	0,00 bA
<i>M. caerulescens</i>	2,63 aA	1,00 aA	2,62 aA	2,86 aA	2,62 cA	1,63 aA
<i>M. chlorosticta</i>	1,90 aB	2,55 aB	5,00 aA	2,75 aB	3,50 bA	2,30 aB
<i>M. jacobinensis</i>	1,66 aC	1,25 aC	3,33 aB	4,10 aB	6,60 aA	0,75 bC
Média	1,79	1,40	2,60	2,67	3,06	0,93

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas pertencem ao mesmo grupo pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância.

Esse resultado indica, portanto, que o meio WPM foi mais responsivo para a redução da senescência foliar. Consoante Flores et al. (2015), dados sobre senescência é imprescindível para a determinação de um maior intervalo possível entre os subcultivos que culmine na produção de um maior número de mudas sem, contudo, prejudicar a qualidade fisiológica das plantas.

A produção de segmentos nodais é um fator relevante na micropropagação, pois reflete na geração de novas plantas a cada subcultivo (FLORES et al., 2009). Considerando os valores apresentados na Tabela 6, para a variável número de microestacas, todas as espécies avaliadas apresentaram comportamento semelhante quando cultivadas nos meios de cultura 12A₃, 4E, 8S e WPM não diferindo estatisticamente entre si.

Tabela 6. Valores médios do número de microestacas (NME) das plantas de cinco espécies de *Manihot* em função de seis meios de cultura aos 90 dias de cultivo *in vitro*.

Espécies	Meios de cultura					
	17N	12A ₃	MS 0,01	4E	8S	WPM
<i>M. flabellifolia</i>	2,50 aA	1,43 aB	2,50 bA	3,60 aA	3,89 aA	3,11 aA
<i>M. tristis</i>	4,12 aA	0,00 aB	2,40 bA	2,50 aA	3,33 aA	3,83 aA
<i>M. caerulescens</i>	1,00 bB	0,00 aB	3,62 bA	2,86 aA	4,62 aA	2,54 aA
<i>M. chlorosticta</i>	2,90 aB	1,00 aC	5,14 aA	3,62 aB	3,50 aB	4,90 aA
<i>M. jacobinensis</i>	1,66 bB	1,00 aB	6,11 aA	4,70 aA	5,10 aA	4,12 aA
Média	2,43	0,68	3,95	3,45	4,09	3,70

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas pertencem ao mesmo grupo pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância.

No entanto, o comportamento das espécies *M. jacobinensis* e *M. chlorosticta* foi estatisticamente superior ao das demais espécies no meio MS 0,01 apresentando os maiores valores de NME (6,11 e 5,14) de modo respectivo. Esse resultado é semelhante quando comparado ao de Freitas et al. (2016), que ao desenvolver um protocolo de micropropagação de *Justicia pectoralis* constatou que entre os meios estudados o MS foi o mais responsivo na multiplicação de segmentos nodais.

Na Tabela 7 verifica-se os resultados relacionados ao desdobramento da interação para a variável massa fresca de parte aérea, na qual pode-se perceber que somente a espécie *M. tristis* não diferiu estatisticamente para os meios de cultura em estudo.

Tabela 7. Valores médios da massa fresca de parte aérea (MFPA; mg) das plantas de cinco espécies de *Manihot* em função de seis meios de cultura aos 90 dias de cultivo *in vitro*.

Espécies	Meios de cultura					
	17N	12A ₃	MS 0,01	4E	8S	WPM
<i>M. flabellifolia</i>	80,00 aB	64,29 aB	147,50 bA	157,00 bA	182,22 cA	140,00 bA
<i>M. tristis</i>	107,50 aA	37,50 aA	80,00 bA	100,00 bA	90,00 dA	106,67 bA
<i>M. caerulescens</i>	82,72 aC	10,00 aC	170,00 bB	122,86 bB	400,00 aA	141,82 bB
<i>M. chlorosticta</i>	117,00 aB	113,33 aB	312,86 aA	137,50 bB	170,00 cB	250,00 aA
<i>M. jacobinensis</i>	100,00 aB	112,50 aB	297,78 aA	255,00 aA	275,00 bA	148,75 bB
Média	97,44	67,52	201,63	154,472	223,44	157,44

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas pertencem ao mesmo grupo pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância.

O contrário se observa na espécie *M. caerulescens*, que revelou maior valor de MFPA (400,00 mg) no meio 8S seguido das espécies *M. chlorosticta* e *M. jacobinensis* com os respectivos valores de 312,86 mg e 297,78 mg no meio MS 0,01.

Analisando os valores demonstrados na Tabela 8 para a variável massa seca de parte aérea, evidenciou-se que apenas as espécies *M. flabellifolia* e *M. tristis* não diferiram estatisticamente para o fator meios de cultura. Por outro lado, nota-se que os maiores valores de MSPA (52,28 mg; 34,61 mg e 34,32 mg) foram obtidos pelas espécies *M. caerulescens*, *M. jacobinensis* e *M. chlorosticta* nos meios 8S e WPM.

Tabela 8. Valores médios da massa seca de parte aérea (MSPA; mg) das plantas de cinco espécies de *Manihot* em função de seis meios de cultura aos 90 dias de cultivo *in vitro*.

Espécies	Meios de cultura					
	17N	12A ₃	MS 0,01	4E	8S	WPM
<i>M. flabellifolia</i>	13,52 aA	10,97 aA	19,15 bA	19,15 bA	24,76 cA	19,30 bA
<i>M. tristis</i>	16,16 aA	6,45 aA	13,24 bA	16,88 bA	12,46 dA	14,21 bA
<i>M. caerulescens</i>	14,49 aB	1,55 aC	23,77 bB	16,01 bB	52,28 aA	24,71 bB
<i>M. chlorosticta</i>	14,75 aB	15,62 aB	31,07 aA	16,53 bB	22,06 cB	34,32 aA
<i>M. jacobinensis</i>	18,83 aB	16,97 aB	33,11 aA	30,72 aA	34,61 bA	17,23 bB
Média	15,55	10,31	24,06	19,85	29,23	21,95

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas pertencem ao mesmo grupo pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância.

De acordo com o desdobramento da interação entre os fatores espécies e meios de cultura para a variável massa fresca de raízes (Tabela 9), a espécie *M.*

chlorosticta obteve o maior valor de MFR (285,11 mg) no meio MS 0,01 sendo estatisticamente superior as demais espécies para esse mesmo meio de cultura. No entanto, esse valor não diferiu estatisticamente do resultado encontrado quando essa espécie foi cultivada no meio WPM (258,22 mg).

Tabela 9. Valores médios da massa fresca de raízes (MFR; mg) das plantas de cinco espécies de *Manihot* em função de seis meios de cultura aos 90 dias de cultivo *in vitro*.

Espécies	Meios de cultura					
	17N	12A ₃	MS 0,01	4E	8S	WPM
<i>M. flabellifolia</i>	67,61 aB	181,6 aA	77,23 bB	125,22 aB	197,70 aA	93,00 bB
<i>M. tristis</i>	77,82 aA	26,23 bA	53,75 bA	68,80 aA	66,46 bA	51,61 bA
<i>M. caerulescens</i>	8,00 aA	-	42,25 bA	32,60 aA	43,40 bA	82,90 bA
<i>M. chlorosticta</i>	105,17 aB	146,55 aB	285,11 aA	75,58 aB	130,68 aB	258,22 aA
<i>M. jacobinensis</i>	84,05 aB	-	13,76 bB	45,50 aB	60,18 aB	270,20 aA
Média	68,53	118,12	94,42	69,54	99,68	151,18

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas pertencem ao mesmo grupo pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância.

Para Miyata et al. (2014), a eficiência no processo de crescimento de raízes está relacionada as altas concentrações de nitrogênio, cálcio, manganês e zinco presentes na composição do meio MS. A interação espécie x meio de cultura pode ser observada nas espécies *M. jacobinensis* e *M. chlorosticta*, que foram estatisticamente superiores às demais espécies analisadas no meio WPM, apresentando valores de MRF de 270,20 mg e 258,22 mg, respectivamente.

Os valores exibidos na Tabela 10 para a variável massa seca de raízes demonstraram que o maior valor de 24,64 mg foi obtido pela espécie *M. chlorosticta* no meio WPM, contudo, esse resultado não apresentou diferença estatística na resposta obtida pela espécie *M. jacobinensis* para este mesmo meio. Por outro lado, nas espécies *M. caerulescens* e *M. jacobinensis* não houve formação de raízes no meio de cultura 12A₃, que contém carvão ativado na sua composição. Esse resultado não está de acordo com a afirmativa de Chapla et al. (2009), de que essa substância simula uma condição de escuro que pode favorecer o desenvolvimento *in vitro* do sistema radicular.

Tabela 10. Valores médios da massa seca de raízes (MSR; mg) das plantas de cinco espécies de *Manihot* em função de seis meios de cultura aos 90 dias de cultivo *in vitro*.

Espécies	Meios de cultura					
	17N	12A ₃	MS 0,01	4E	8S	WPM
<i>M. flabellifolia</i>	4,91 aB	21,10 aA	5,76 bB	9,44 aB	10,62 aB	8,73 bB
<i>M. tristis</i>	5,32 aA	2,50 bA	4,55 bA	4,03 aA	2,53 bA	5,11 bA
<i>M. caerulescens</i>	0,70 aA	-	9,40 bA	2,56 aA	3,83 bA	7,50 bA
<i>M. chlorosticta</i>	6,81 aC	17,99 aB	18,28 aB	5,93 aC	10,62 aC	24,64 aA
<i>M. jacobinensis</i>	11,80 aA	-	1,10 bA	3,45 aB	4,42 bB	20,06 aA
Média	5,90	13,86	7,82	5,08	6,40	13,21

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas pertencem ao mesmo grupo pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância.

Porém, Erig et al. (2004), ao observarem o enraizamento *in vitro* de *Pyrus communis* L., constataram que a adição de carvão ativado no meio de cultivo pode ser desfavorável. Além disso, Oliveira-Cauduro et al. (2014) sugerem que a presença dessa substância pode absorver outros compostos presentes no meio de cultura, dentre eles os fitorreguladores, comprometendo, assim a formação do sistema radicular.

Conforme a Tabela 11, observa-se os resultados obtidos do desdobramento da interação para a variável massa de calo, podendo-se constatar que os meios de cultura 4E e 8S apresentaram os maiores valores para a variável em questão, destacando-se as espécies *M. chlorosticta*, com 84,76 mg e *M. flabellifolia*, com 83,40 mg, para os respectivos meios citados anteriormente. Resultado contrastante foi encontrado na regeneração *in vitro* de *Eucalyptus camaldulensis* (DIBAX et al., 2010), onde os meios de cultura MS e WPM indicaram superioridade para a indução de calo.

Tabela 11. Valores médios da massa de calo (MC; mg) das plantas de cinco espécies de *Manihot spp.* em função de seis meios de cultura aos 90 dias de cultivo *in vitro*.

Espécies	Meios de cultura					
	17N	12A ₃	MS 0,01	4E	8S	WPM
<i>M. flabellifolia</i>	64,05 aA	-	30,00 bB	74,69 aA	83,40 aA	4,80 aB
<i>M. tristis</i>	34,02 aA	-	26,75 bA	39,58 bA	13,70 bA	11,86 aA
<i>M. caerulescens</i>	24,80 aA	-	-	24,50 bA	32,45 bA	61,75 aA
<i>M. chlorosticta</i>	50,54 aA	22,50 aB	72,72 aA	84,76 aA	67,91 aA	11,75 aB
<i>M. jacobinensis</i>	30,73 aB	-	82,93 aA	69,98 aA	53,79 aA	30,62 aB
Média	40,83	-	53,10	58,70	50,25	24,15

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas pertencem ao mesmo grupo pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância.

Em geral, nota-se que as espécies estudadas apresentaram comportamentos bastante distintos, o que possivelmente está relacionado com a variabilidade das espécies presentes no gênero *Manihot*. O meio de cultura tem importante função nas respostas de crescimento de células e tecidos, e sua composição pode ser modificada de acordo com a necessidade de cada tipo de explante e a espécie com a qual se esteja trabalhando (TORRES et al., 2001). As alterações no meio de cultura podem ser feitas tanto na composição básica (sais minerais e vitaminas) como nos tipos e concentrações dos reguladores de crescimento. Nesse sentido, ao utilizar diferentes fitorreguladores na organogênese *in vitro* de cinco variedades de mandioca, Faye et al. (2015) puderam constatar que as respostas das variáveis estudadas variaram de acordo com o tipo e a concentração do regulador de crescimento.

As variáveis altura de planta e número de microestacas são de alta discriminação para determinação do meio de cultura de cada uma das espécies no processo de micropropagação. De acordo com os resultados obtidos, e considerando-se, portanto, as variáveis mencionadas, pode-se constatar que as espécies *M. chlorosticta* e *M. jacobinensis* obtiveram melhor desempenho quando cultivadas no meio de cultura MS 0,01 enquanto que as espécies *M. caerulescens* e *M. tristis* foram mais responsivas nos meios 8S e 17N, respectivamente. Para a espécie *M. flabellifolia* os meios mais efetivos foram o WPM e o 8S, respectivamente para altura de planta e número de microestacas.

Dessa forma, as diferenças entre esses dados e de outros experimentos da mesma natureza também podem ser ocasionadas em virtude da especificação dos meios de cultura para cada espécie, visto que diferentes combinações de carboidratos, sais minerais, vitaminas e reguladores de crescimento podem estimular ou não o crescimento de órgãos, tecidos ou células e o desenvolvimento da planta (GEORGE et al., 2008).

Esses resultados contrastantes reforçam a hipótese de que não se pode generalizar um único meio de cultura para cada espécie silvestre do gênero *Manihot*, tornando-se evidente a importância de se adequar um meio nutritivo para cada uma delas.

CONCLUSÕES

No cultivo *in vitro* das espécies silvestres de *Manihot* estudadas, os meios de cultura que mais se destacaram foram o MS 0,01 e WPM.

O meio de cultura 12A₃ não foi responsivo para nenhuma das espécies estudadas.

Diferentes meios de cultura influenciam na multiplicação *in vitro* das espécies silvestres de *Manihot*.

REFERÊNCIAS

ANJUM, P.; SHAZIA, M. Rapid propagation of a biodiesel plant cassava (*Manihot esculenta* Crantz) through tissue culture. **International Journal of Biology and Biotechnology**, v. 12, n. 3, p. 369-372, 2015.

CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios Nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética**. Brasília-DF: Embrapa-SPI: Embrapa-CNPH, 1998. v.1 p. 87-132.

CERQUEIRA, F. B.; FARIA A. J. G. de; SANTOS, P. F. dos. Desenvolvimento inicial da mandioca 'Cacau' sob diferentes posições da maniva. *Tecnologia & Ciência Agropecuária*, João Pessoa, v.10, p. 16-21, 2016.

CHAPLA, P. I.; BESSON, J. C. F.; OLIVEIRA, L. K.; SILVA, J. M. da; ROCHA, A. C. de S.; STEFANELLO, S. pH, carvão ativado e agentes geleificantes do meio de cultura no crescimento *in vitro* de *Miltonia flavescens* Lindl. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, v. 5, n. 2, p. 87-93, 2009.

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

CIAT. **El cultivo de meristemas para el saneamiento de clones de yuca**; unidad audiotutorial. Cali, 1982. 45 p. (CIAT. Guia de Estudio. Serie 045C-02.05).

COPATTI, A.; LOY, F.; CRUZ, J. G.; DIAS, C. S.; MELLO-FARIAS, P. Reguladores vegetais na multiplicação *in vitro* de Tamarilo (*Solanum betaceum*). **Revista da Jornada da Pós-Graduação e Pesquisa Congrega Urcamp**, v. 13, p. 89, 2016.

DEMEKE, Y.; TEFERA, W.; DECHASSA, N.; ABEBIE, B. Effects of plant growth regulators on *in vitro* cultured nodal explants of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) clones. **African Journal of Biotechnology**, v. 13, n. 28, p. 2830-2839, 2014.

DEZAN, L. F.; CANASSA, F.; SOUZA-LEAL, T.; DIOGO, J. A.; MASSARO, R.; CORDEIRO, G. M.; PEDROSO-DE-MORAES, C. Crescimento *in vitro* de *Schomburgkia gloriosa* Lindl. em meio de cultivo simplificados. **Idesia**, v. 30, n. 2, p. 53-58, 2012.

DIBAX, R.; QUISEN, R. C.; BONA, C.; QUOIRIN, M. Plant regeneration from cotyledonary explants of *Eucalyptus camaldulensis* Dehn and histological study of organogenesis *in vitro*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, n. 2, p. 311-318, 2010.

ERIG, A. C.; SCHUCH, M. W.; BRAGA, E. J. B. Enraizamento *in vitro* de pereira (*Pyrus communis* L.) cv. Carrick. **Ciência Rural**, v. 34, p. 275-277, 2004.

FAYE, A.; SAGNA, M.; KANE, P. D.; SANE, D. Effects of different hormones on organogenesis *in vitro* of some varieties of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) grown in Senegal. **African Journal of Plant Science**, v. 9, n. 8, p. 305-312, 2015.

FLORES, R.; NICOLOSO, F. T.; MALDANER, J.; GARLET, T. M. B. Benzilaminopurina (BAP) e thidiazuron (TDZ) na propagação *in vitro* de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.11, n. 3, p.292-299, 2009.

FLORES, R.; MAGGIO, L. P.; FLÔRES, P. Z.; BEMPCK, G. S.; AULER, N. M. F.; CARVALHO, J. F. C.; GODOI, R. S.; FRANZIN, S. M.; BECKER, L.; SILVEIRA, T. M. Otimização da produção de plantas *in vitro* de cultivares de *Ipomoea batatas*. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 38, n. 3, p. 429-437, 2015.

FREITAS, R. M. O.; NOGUEIRA, N. W.; PRAXEDES, S. C. Multiplicação de anador (*Justicia pectoralis*) *in vitro*. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 11, n. 3, p. 159-163, 2016.

GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; KLERK, G. J. de. **Plant propagation by tissue culture**. 3. ed. Dordrecht: Springer, 2008. 501p.

KABIR, M. H.; MAMUN, A. N. K.; ROY, P. K.; ISLAM, M. R.; JAHAN, M. T.; TALUKDER, S. U. *In vitro* propagation of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Nuclear Science and Applications**, v. 24, n. 1 e 2, 2015.

LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. **International Plant Propagators Society Proceedings**, n. 30, p. 421-427, 1980.

MAFLA, G.; ROA, J. C.; ARANZALES, E.; DEBOUCK, D. G. **Manual de procedimientos para la conservación *in vitro* del germoplasma del género *Manihot***. Cali: CIAT, 2010. 54p.

MAMEDES, T. C. Estabelecimento *in vitro* de *Handroanthus impetiginosus* (Mart. ex Dc.) Mattos (Bignoniaceae) e estudo da incidência de oídio (*Oidium* sp.) em plântulas obtidas *in vitro*. 2013.

MAPAYI, E. F.; OJO, D. K.; ODUWAYE, O. A.; PORBENI, J. B. O. Optimization of *in vitro* propagation of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) genotypes. **Journal of Agricultural Science**, v. 5, n. 3, p. 261, 2013.

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

MIYATA, L. Y.; VILLA, F.; PASQUAL, M. Culture media used in the micropropagation of orchids hybrids. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 35, n. 4, p. 1731-1738, 2014.

MONGOMAKE, K.; DOUNGOUS, O.; KHATABI, B.; FONDONG, V. N. Somatic

embryogenesis and plant regeneration of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) landraces from Cameroon. **Springer Plus**, v. 4, n. 1, p. 477, 2015.

MORADKHANI, H. Investigation of adventitious shoot regeneration from *in vitro* stem explants of *Melissa officinalis* L. **Journal of Medicinal Plants Research**, v.6, n. 16, p.3217- 3221, 2012.

MÜHLEN, G. S. **Avaliação da diversidade genética de etnovarietades de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) com marcadores de DNA: RAPD, AFLP e MICROSSATÉLITES**. Piracicaba, 1999. 176p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

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

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.

OLIVEIRA-CAUDURO, Y. D.; ADAMUCHIO, L. G.; DEGENHARDT-GOLDBACH, J.; BESPALHOK FILHO, J. C.; DIBAX, R.; QUOIRIN, M. Organogênese indireta a partir de explantes foliares e multiplicação *in vitro* de brotações de *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunnii*. **Ciência Florestal**, v. 24, n. 2, p. 347-355, 2014.

PIZA, I. M. de T.; PINHO, R. S. Protocolo de micropropagação da mandioca. In: CEREDA, M. P. (Ed.). **Agricultura: tuberosas amiláceas Latino Americanas**. 1. ed. São Paulo: Fundação Cargill, 2002. p. 178-187. (Série Culturas de Tuberosas Amiláceas Latino Americanas, v. 2).

R DEVELOPMENT CORE TEAM (2017). R: A language and environment for statistical computing, reference index version 3.4.2. R foundation for statistical computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0 <http://www.R-project.org>.

REIS, L.; CITADIN, I.; PENSO, G. A.; SCARIOTTO, S.; WAGNER JÚNIOR, A. Estratificação *in vitro* de embriões zigóticos de pessegueiro em diferentes meios de cultura e concentrações de sacarose. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 34, n. 3, p. 653-660, 2012.

RIBEIRO, M. D. N. O.; PASQUAL, M.; SILVA, A. B.; RODRIGUES, V. A. *In vitro* propagation of *Calla lily*: adenine sulphate and 6-benzilaminopurine. **Ornamental Horticulture**, v. 20, n. 1, p. 21-26, 2014.

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.

SHIJI, R.; GEORGE, J.; SUNITHA, S.; VANDHANAAND, A.; MUTHURAJ, R. Effect of NAA and IBA on *in vitro* regeneration and hardening in cassava (*Manihot esculenta* Crantz.). **Journal of Root Crops**, v. 40, n. 2, p. 12-20, 2014.

SILVEIRA, D. M. de S. Multiplicação e conservação *in vitro* de espécies silvestres de *Manihot*. 2017. **Dissertação** (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas. Disponível em: <https://www.ufrb.edu.br/pgrecvegetais/images/deyse_maria.pdf>. Acesso em: 06 de jan. 2017.

SIMÕES, K. da S.; LINO, L. S. M.; SOUZA, A. da S.; SILVA, S. de O. e; LEDO, C. A. da S. Micropropagação de Inhame da Costa sob concentrações de BAP em distintos meios de cultura. **Magistra**, v. 28, n. 3/4, p. 342-351, 2017.

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**. Porto Alegre: Artmed, 2008. 819p.

TORRES, A. C.; BARBOSA, N. V. dos R.; WILLADINO, L.; GUERRA, M. P.; FERREIRA, C. F.; PAIVA, S. A. V. de. **Meio e condições de incubação para a cultura de tecidos de plantas**: formulações de meios de cultura de tecidos de plantas. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2001. 19 p. (Embrapa Hortaliças. Circular Técnica, 24).

VIDAL, A. M.; SOUZA, A. da S.; MENEZES, M. C.; SILVEIRA, D. M. de S.; SILVA NETO, H. P. da S.; SANTOS, E. B. **Micropropagação da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) em meio suplementado com um fertilizante solúvel**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MANDIOCA, 15., 2013, Salvador. **Anais...** Salvador: Sociedade Brasileira de Mandioca, 2013. Não paginado. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/95634/1/MICROPROPAGACA-O-DA-MANDIOCA-084-melhoram-21611-ANTONIO-SOUZA.pdf>>. Acesso em: 22 de nov. 2017.

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

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.

ARTIGO II
PACLOBUTRAZOL NA CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DE ESPÉCIES SILVESTRES
DE *Manihot*²

² Artigo a ser submetido ao periódico Ciência Agronômica

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

RESUMO:

A conservação *in vitro* mediante condições de crescimento mínimo é realizada a partir de mudanças no meio de cultura e no ambiente de cultivo, com o objetivo de desacelerar o crescimento das plantas, sem afetar sua viabilidade. Dessa forma, aumenta-se o intervalo entre os subcultivos, otimizando a mão de obra e reduzindo os custos operacionais e os riscos de contaminação, facilitando, assim, o acesso a todo o germoplasma da coleção. Este trabalho teve como objetivo avaliar a ação de diferentes concentrações de Paclobutrazol® (PBZ) em cinco espécies silvestres de *Manihot*, com o propósito de aprimorar o estabelecimento de protocolos para conservação *in vitro* dessas espécies sob crescimento mínimo. O experimento foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Mandioca e Fruticultura, em delineamento inteiramente ao acaso e esquema fatorial 5 [doses de 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)] x 5 [acessos de *Manihot* (*M. pseudoglaziovii* Pax & Hoffman; *M. caerulescens* Pohl; *M. chlorosticta* Standl; *M. alutacea* D.J.Rogers & Appan e *M. flabellifolia* Pohl)], com 12 repetições. Utilizou-se, como explantes, microestacas com 1 cm de tamanho, cada uma inoculada em 10 mL do meio 8S solidificado com Phytigel® (2,4 g.L⁻¹), contendo as diferentes doses de PBZ. Em seguida, os tubos que continham os explantes foram mantidos durante 120 dias em sala de crescimento com irradiância de 20 μmol.m⁻².s⁻¹, temperatura de 22±1 °C e fotoperíodo de 12 horas. Após os 120 dias, foram analisadas as variáveis altura de planta (cm), número de folhas vivas, número de folhas mortas, número de brotos, número de microestacas (com 1 cm), massas fresca e seca de parte aérea (mg) e massas fresca e seca de raízes (mg). Os resultados permitiram confirmar que as espécies silvestres quando preservadas *in vitro* apresentaram comportamentos diferenciados, não sendo possível determinar um meio de cultura padrão para a conservação *in vitro*. Entretanto, para a redução do metabolismo das plantas a dose de 0,20 mg.L⁻¹ de PBZ mostrou-se mais eficiente.

Palavras chave: Mandioca; parentais silvestres; PBZ; preservação *in vitro* de germoplasma; crescimento mínimo

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

ABSTRACT:

The conservation *In vitro* under minimal growth condition is carried out from changes in the culture medium and in the growing environment, with the purpose of slowing the growth of the plants, without affecting its viability. In this way, the interval between the subcultures is increased, optimizing the workforce and reducing the operational costs and risks of contamination, thus facilitating access to all the germplasm of the collection. The objective of this work was to evaluate the action of different concentrations of Paclobutrazol® (PBZ) on five wild species of *Manihot*, in order to improve the establishment of protocols for *in vitro* conservation of these species under minimal growth. The experiment was carried out at the Laboratory of Tissue Culture of Embrapa Cassava and Fruits, in a completely randomized design and factorial scheme 5 [doses of 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)] x 5 [*Manihot* accessions (*M. pseudoglaziovii* Pax & Hoffman; *M. caerulescens* Pohl; *M. chlorosticta* Standl; *M. pseudoglaziovii* Pax & Hoffman; *M. alutacea* DJRogers & Appan and *M. flabellifolia* Pohl)], with 12 replicates. Microcuttings with 1 cm in size were each inoculated into 10 mL of the 8S medium solidified with Phytigel (2,4 g.L⁻¹) containing the different doses of PBZ. Then the tubes containing the explants were maintained for 120 days in a growth room with irradiance of 20 µmol.m⁻².s⁻¹, temperature of 22 ± 1 °C and photoperiod of 12 hours. After 120 days, the following variables were analyzed: plant height (cm), number of live leaves, number of dead leaves, number of shoots, number of microcuttings (with 1 cm), fresh and dry shoot mass fresh and fresh and dry roots (mg). The results allowed to confirm that the wild species when preserved *in vitro* presented different behaviors, and it is not possible to determine a standard culture medium for *in vitro* conservation. However, for the reduction of plant metabolism, the dose of 0,20 mg.L⁻¹ of PBZ was shown to be more efficient.

Keywords: Cassava; parental wild; PBZ; *in vitro* preservation of germplasm; minimal growth

INTRODUÇÃO

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é uma planta dicotiledônea, pertencente à família Euphorbiaceae e que está inserida no gênero *Manihot* (BARROSO et al., 1999; FUKUDA, 1999). Essa espécie é cultivada em todo o Brasil e de acordo com Albuquerque et al. (2014), sua produção está relacionada com a agricultura familiar, sobretudo nas regiões Norte e Nordeste, constituindo um relevante papel social e econômico. O Pará, o Paraná e a Bahia se destacam como os maiores estados produtores de mandioca no Brasil, respondendo por 24,7%, 13,2% e 8,4%, respectivamente (IBGE, 2017).

Porém, alguns fatores podem ser considerados limitantes para o aumento do cultivo da mandioca, dentre eles: ataque de pragas e doenças, competição de plantas espontâneas, baixa produtividade de raízes, quando comparada com o potencial da cultura (FELIPE et al., 2013), estresses bióticos e/ou abióticos, e fatores agrônômicos ocasionados principalmente pela pouca disponibilidade de novas variedades. De acordo com Nassar (2006), as espécies silvestres de *Manihot* são importantes fontes de resistência a fatores bióticos e abióticos, possibilitando, através da hibridação introgressiva, o desenvolvimento de variedades mais produtivas e menos susceptíveis a fatores variados, como pragas e estresses abióticos.

Cruzamentos entre espécies silvestres e a espécie cultivada podem ser utilizados como método de aumentar a diversidade genética na cultura da mandioca em programas de melhoramento. Dessa maneira, é perceptível a necessidade e a importância de conservar essas espécies em Bancos Ativos de Germoplasma (BAGs), uma vez que a eficiência de um programa de melhoramento fundamenta-se no conhecimento do germoplasma disponível, sobretudo em relação à diversidade genética que representa.

A conservação de germoplasma *in vitro* representa uma das formas mais amplamente utilizadas de preservação do germoplasma de mandioca, porém existem poucos estudos dedicados ao aperfeiçoamento dos métodos de conservação *in vitro* para as espécies silvestres de *Manihot*. Essa conservação, pode ser realizada a partir de mudanças no ambiente de cultivo visando desacelerar ou suprimir totalmente o crescimento de células, tecidos e órgãos (WITHERS; WILLIAMS, 1998), com a função de aumentar ao máximo o intervalo entre os subcultivos, ou estendê-los indefinidamente (ROCA et al., 1991), diminuindo, então, a mão-de-obra e o espaço

necessário para a conservação, além de proporcionar acesso imediato a todo o germoplasma da coleção e reduzir os custos durante a manutenção. Além disso, esse tipo de conservação quando bem adaptada ao sistema de propagação da planta, favorece a estabilidade genética, assegura suas características após o período de armazenamento e reduz a probabilidade de perdas de acessos, permitindo manter um maior número de indivíduos ocupando uma pequena área. Além do mais, o intercâmbio de espécies que são propagadas de forma vegetativa é realizado por meio de plantas mantidas *in vitro*.

Conforme Seleguini (2007), os retardantes de crescimento vegetal são compostos sintéticos que reduzem o alongamento do caule, sem mudar os padrões de desenvolvimento ou causar fitotoxicidade. Esse processo ocorre com a redução do alongamento das células e da taxa de divisão celular. Entre diversos retardantes de crescimento, tem-se o paclobutrazol (PBZ), um triazol que pode ser absorvido pelas folhas, caules e raízes, sendo translocado através do xilema até os meristemas subapicais de crescimento, onde irá inibir a biossíntese das giberelinas e, desta forma irá modificar o metabolismo (SILVA, 2008).

Diante da necessidade da conservação da diversidade genética, tendo em vista a importância da preservação das espécies silvestres de mandioca e a insuficiência de estudos que envolvem esse processo, torna-se necessário a adequação de estratégias para sua conservação *in vitro*, mediante o ajuste de técnicas de crescimento mínimo. Em vista disso, esse trabalho teve como objetivo avaliar a ação de diferentes concentrações de Paclobutrazol (PBZ) em cinco espécies silvestres de *Manihot*, com o propósito de aprimorar o estabelecimento de protocolos para conservação *in vitro* dessas espécies sob crescimento mínimo.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi desenvolvido no período de junho de 2017 a outubro de 2017 no Laboratório de Cultura de Tecidos (LCT) do Núcleo de Biologia Avançada (NBIO), pertencente a Embrapa Mandioca e Fruticultura (CNPMPF), localizada em Cruz das Almas, Bahia. Nesse estudo, utilizou-se os acessos silvestres caracterizados de *Manihot pseudoglaziovii* Pax & Hoffman; *M. caerulescens* Pohl; *M. chlorosticta* Standl; *M. alutacea* D.J.Rogers & Appan e *M. flabellifolia* Pohl, pertencentes a coleção *in vitro* da Embrapa Mandioca e Fruticultura.

Foram utilizadas plantas previamente micropropagadas para o estabelecimento do protocolo de conservação *in vitro* das espécies silvestres de mandioca. Em câmara de fluxo laminar, as plantas foram seccionadas para obtenção de microestacas com aproximadamente 1 cm de comprimento, contendo pelo menos uma gema. Posteriormente, as microestacas foram inoculadas em tubos de ensaio (2,5 cm x 15 cm) contendo 10 mL do meio de cultura 8S (CIAT, 1984), acrescentado das seguintes concentrações de 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, solidificado com Phytigel® (2,4 g.L⁻¹), com pH previamente ajustado para 5,8 e autoclavado por 20 min a 120 °C. Posteriormente, os tubos de ensaio que continham os explantes foram mantidos durante 120 dias em sala de crescimento 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 a avaliação das seguintes características: altura de planta (AP; cm), número de folhas vivas (NFV), número de folhas mortas (NFM), número de brotações (NB), número de microestacas com tamanho de 1 cm (NME), massa fresca de parte aérea (MFPA; mg) e massa fresca de raízes (MFR; mg). Todo o material vegetal foi identificado e mantido em estufa com circulação de ar forçada e temperatura de 70 °C por 48 horas. Depois desse período, determinou-se a massa seca de parte aérea (MSPA; mg) e a massa seca de raízes (MSR; mg).

Empregou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado no esquema fatorial 5 x 5, sendo 5 espécies silvestres de *Manihot* e 5 concentrações de PBZ, com 12 repetições, sendo cada repetição constituída por um explante (microestaca) cultivado em um tubo de ensaio. Os dados obtidos após a avaliação foram submetidos ao teste F da análise de variância. As médias do fator qualitativo foram agrupadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade e para as médias das concentrações de PBZ foram ajustados modelos de regressão polinomial. Os valores do número de folhas vivas, número de folhas mortas, número de brotos e número de microestacas, 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' implementado no software R versão 3.4.2. (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2017).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As plantas de *Manihot*, conservadas *in vitro* nas diferentes concentrações de Paclobutrazol, manifestaram comportamentos diferenciados, dependendo da variável a ser observada.

A análise de variância apresentada na Tabela 1 mostrou que a interação espécies x PBZ foi significativa apenas para as variáveis número de folhas mortas e número de brotações. Por outro lado, o fator isolado espécies apresentou efeito altamente significativo ($p < 0,01$) para todas as variáveis analisadas.

A magnitude dos coeficientes de variação (CV) oscilou de 18,31% à 104,91% para as variáveis número de microestacas e massa seca de raízes, respectivamente. Ainda que, experimentos realizados na cultura tecidos demandem de grande controle das condições de cultivo (temperatura, luz e fotoperíodo), normalmente, os CVs apresentam-se elevados. Em decorrência disso, Werner et al. (2013), afirmam que cada variável é influenciada por diferentes fatores desconhecidos e não controlados para trabalhos dessa natureza. Sá et al. (2011), encontraram coeficientes de variação alternando de 35,65% a 112,44% na conservação *in vitro* de *Hancornia speciosa* Gomes.

Tabela 1. Resumo da análise de variância para as variáveis altura de planta (AP; cm), número de folhas vivas (NFV), número de folhas mortas (NM), número de brotações (NB), número de microestacas (NME), massa fresca de parte aérea (MFPA; mg), massa seca de parte aérea (MSPA; mg), massa fresca de raízes (MFR; mg), massa seca de raízes (MSR; mg) de espécies de *Manihot* (*M. pseudoglaziovii*; *M. caerulescens*; *M. chlorosticta*; *M. alutacea* e *M. flabellifolia*) em função de cinco concentrações de paclobutrazol (PBZ; mg.L⁻¹) após 120 dias de conservação *in vitro*.

FV	GL	QM								
		AP	NFV	NFM	NB	NME	MFPA	MSPA	MFR	MSR
Espécies	4	500,30**	7,15**	12,16**	0,69**	8,66**	154,37**	1,32**	32,32**	0,03**
PBZ	4	53,28**	0,40 ^{NS}	0,44 ^{NS}	0,20 ^{NS}	0,55*	6,47 ^{NS}	0,04 ^{NS}	4,29 ^{NS}	0,11**
Espécies * PBZ	16	19,00 ^{NS}	0,44 ^{NS}	0,48**	0,15*	0,23 ^{NS}	3,59 ^{NS}	0,05 ^{NS}	0,68 ^{NS}	0,001 ^{NS}
Erro	202	13,22	0,28	0,20	0,08	0,17	2,89	0,06	1,92	0,002
CV (%)		47,69	22,72	32,20	30,43	18,31	35,49	50,90	61,97	104,91
Média		7,62	2,33	1,42	0,95	2,25	151,36	15,15	70,66	5,20

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

Na Tabela 2 são apresentados os valores médios das variáveis que foram significativas para o fator espécies.

Tabela 2. Valores médios de altura de planta (AP; cm), número de folhas vivas (NFV), número de microestacas (NME), massa fresca de parte aérea (MFPA; mg), massa seca de parte aérea (MSPA; mg), massa fresca de raízes (MFR; mg) e massa seca de raízes (MSR; mg) para cinco espécies silvestres de *Manihot* após 120 dias de conservação *in vitro*.

Espécies	AP	NFV	NME	MFPA	MSPA	MFR	MSR
<i>M. pseudoglaziovii</i>	6,49 b	7,41 a	6,45 a	170,39 b	14,90 b	75,71 a	5,92 a
<i>M. caerulescens</i>	10,95 a	3,41 b	5,84 a	221,70 a	22,45 a	17,83 b	0,00 a
<i>M. chlorosticta</i>	10,37 a	5,65 a	5,53 a	147,76 b	15,31 b	101,84 a	7,96 a
<i>M. alutacea</i>	2,41 c	3,37 b	1,41 b	49,17 d	6,25 d	27,14 b	2,86 a
<i>M. flabellifolia</i>	5,06 b	6,02 a	3,40 b	110,00 c	11,80 c	59,09 a	3,64 a

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

Com relação a variável altura de planta, a espécie *M. alutacea* apresentou a média mais baixa (2,41 cm), que foi significativamente inferior às médias das espécies *M. pseudoglaziovii* e *M. flabellifolia* que não diferiram estatisticamente entre si, apresentando médias de 6,49 cm e 5,06 cm respectivamente. É necessário destacar que a altura de planta é uma variável considerada importante quando o objetivo é a conservação *in vitro* de germoplasma, sendo determinante para indicar o momento aproximado de se realizar um subcultivo, uma vez que, em um certo momento, a planta atinge a extremidade superior do tubo de ensaio.

Por consequência, na conservação *in vitro* a menor taxa de crescimento nas plantas é bastante desejável, desde que seja mantida a viabilidade das plantas após expressada a redução do metabolismo durante o período de incubação. Dessa forma, busca-se plantas menores e com maior número de folhas vivas. Na variável número de folhas vivas as espécies *M. pseudoglaziovii*, *M. chlorosticta* e *M. flabellifolia* obtiveram as médias mais altas (7,41; 5,65; 6,02), sendo superiores aos demais genótipos.

Comportamento similar pode ser observado para a variável massa fresca de raízes, em que as mesmas espécies obtiveram valores de 75,71 mg, 101,84 mg e 59,09 mg. Por outro lado, na variável massa seca de raízes todas as espécies

obtiveram comportamentos semelhantes, não diferindo entre si. Conforme Canto et al. (2004), um sistema radicular desenvolvido durante a conservação pode ser considerado benéfico, uma vez que favorecerá a posterior aclimatização das plantas caso seja necessário transferi-las para campo.

De outro modo, as espécies *M. pseudoglaziovii*, *M. caerulescens* e *M. chlorosticta* foram estatisticamente superiores as demais espécies para a variável número de microestacas, com valores de 6,45; 5,84 e 5,53, respectivamente. Logo, possivelmente, pode-se garantir uma multiplicação eficiente e a manutenção adequada dessas espécies após o período de preservação.

Para as variáveis massa fresca de parte aérea e massa seca de parte aérea apenas a *M. caerulescens* foi estatisticamente superior às demais espécies, com valores de 221,70 mg e 22,45 mg, respectivamente. O contrário é observado para a espécie *M. alutacea*, que apresentou os menores valores, 49,17 mg e 6,25 mg para as variáveis mencionadas anteriormente.

Na Tabela 3 são demonstrados os modelos de regressão polinomial, onde pode ser observado os ajustes de modelos de 1º e 2º graus, com coeficiente de determinação (R^2) variando de 33,05% para a espécie *M. chlorosticta* à 85,07% para *M. caerulescens* ambos os coeficientes observados para a variável número de folhas mortas.

Tabela 3. Equações de regressão, coeficientes de determinação, dose ótima e valores estimados para altura de planta (cm), número de folhas vivas, número de folhas mortas, número de brotações, número de microestacas e massa seca de raízes de espécies de *Manihot spp.* (*M. pseudoglaziovii*; *M. caerulescens*; *M. chlorosticta*; *M. alutacea* e *M. flabellifolia*) em função das concentrações de Paclobutrazol (PBZ; mg.L⁻¹) após 120 dias de conservação *in vitro*.

Interações	Espécies	Equações	R ² (%)	Dose ótima	Valor estimado
Altura de planta (cm)					
PBZ		$\hat{y}+$	-	0,20	6,55 ²
Número de folhas vivas					
PBZ		$\hat{y}^{ns}=5,36$	-	0,00	5,36 ¹
Número de folhas mortas					
PBZ (Esp.)	<i>M. psd.</i>	$\hat{y}^{ns}=1,29$	-	0,00	1,29 ¹
PBZ (Esp.)	<i>M. chl.</i>	$\hat{y}^{**}=59,571x^2 - 29,909x + 7,3454$	85,07	0,25	3,56
PBZ (Esp.)	<i>M. chl.</i>	$\hat{y}^*=24,714x^2 - 10,826x + 2,2703$	33,05	0,22	1,09
PBZ (Esp.)	<i>M. alut.</i>	$\hat{y}^{ns}=0,94$	-	0,00	0,94 ¹
PBZ (Esp.)	<i>M. flab.</i>	$\hat{y}^{ns}=0,49$	-	0,00	0,49 ¹
Número de brotações					
PBZ (Esp.)	<i>M. psd.</i>	$\hat{y}+$	-	0,30	0,72 ²
PBZ (Esp.)	<i>M. chl.</i>	$\hat{y}^{**}=15,214x^2 - 7,4357x + 1,4223$	54,43	0,25	0,51
PBZ (Esp.)	<i>M. chl.</i>	$\hat{y}^{ns}=0,12$	-	0,00	0,12 ¹
PBZ (Esp.)	<i>M. alut.</i>	$\hat{y}^{ns}=0,28$	-	0,00	0,28 ¹
PBZ (Esp.)	<i>M. flab.</i>	$\hat{y}^{ns}=0,58$	-	0,00	0,58 ¹
Número de microestacas					
PBZ		$\hat{y}+$	-	0,20	4,29 ²
Massa fresca de parte aérea (mg)					
PBZ		$\hat{y}^{ns}=151,29$	-	0,00	151,29 ¹
Massa seca de parte aérea (mg)					
PBZ		$\hat{y}^{ns}=15,13$	-	0,00	15,13 ¹
Massa fresca de raízes (mg)					
PBZ		$\hat{y}^{ns}=69,79$	-	0,00	69,79 ¹
Massa seca de raízes (mg)					
PBZ		$\hat{y}^{**}=8,08x + 3,462$	57,83	0,40	6,06

** e * significativo a 1% e 5% de probabilidade, respectivamente, pelo teste F da ANAVA. ¹ baseado na média dos valores observados e ² baseado no valor observado; + significativo e sem significado biológico. *M. psd.* = *M. pseudoglaziovii*; *M. chl.* = *M. caerulescens*; *M. chl.* = *M. chlorosticta*; *M. alut.* = *M. alutacea*; *M. flab.* = *M. flabellifolia*.

Considerando-se a análise da variável altura de planta, não foi possível obter um ajuste de modelo com significado biológico (Tabela 3), apesar da significância observada na análise de variância (Tabela 1). Desta forma, o menor valor estimado (6,55) foi proporcionado pela dose de 0,20 mg.L⁻¹ de PBZ. Essa redução pode estar associada à inibição da síntese de giberelina, fitohormônio que atua na extensão da parede e no alongamento celular (TAIZ; ZAIGER, 2009). Ademais, Te-chato et al. (2009) afirmam que o modo de atuação do Paclobutrazol também tem sido associado com a diminuição na transpiração, altura da planta, biomassa e área foliar.

Comportamento semelhante ao da altura de planta também pode ser observado na análise da variável número de microestacas, onde a dose de 0,20 mg.L⁻¹ de PBZ possibilitou um valor estimado de 4,29. As variáveis número de folhas vivas, massa fresca de parte aérea, massa seca de parte aérea e massa fresca de raízes não apresentaram efeito significativo para PBZ, da mesma forma que não houve na interação espécies*PBZ. Indicando que as médias estimadas de 5,36; 151,29 mg; 15,13 mg e 69,79 mg podem ser obtidas na ausência das concentrações de PBZ utilizadas nesse estudo.

Para a variável massa seca de raízes a interação entre os fatores não foi significativa, porém ajustou-se um modelo de 1º grau crescente, mostrando que o incremento gradual das doses de PBZ favoreceu o aumento da massa seca de raízes das plantas. Logo, o valor máximo estimado de 6,06 foi obtido na dose de 0,40 mg.L⁻¹ de PBZ (Figura 1).

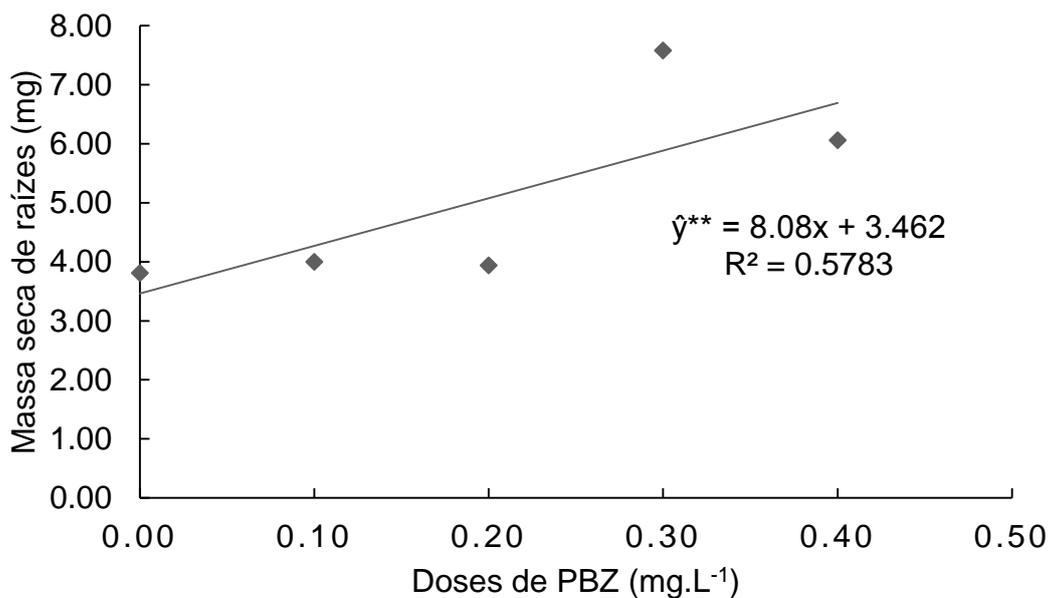


Figura 1. Massa seca de raízes (mg) das espécies silvestres de *Manihot* em função de cinco concentrações de PBZ (mg.L⁻¹) após 120 dias de conservação *in vitro*.

A interação entre as concentrações de PBZ e as espécies de *Manihot* foi significativa para a variável número de folhas mortas (Tabela 3; Figura 2). O maior valor estimado (3,56) para *M. caerulescens* revela que a dose aproximada de 0,25 de mg.L⁻¹ de PBZ pode ter favorecido um desenvolvimento mais acelerado para as plantas dessa espécie, que conseqüentemente, entraram em senescência antes das demais espécies.

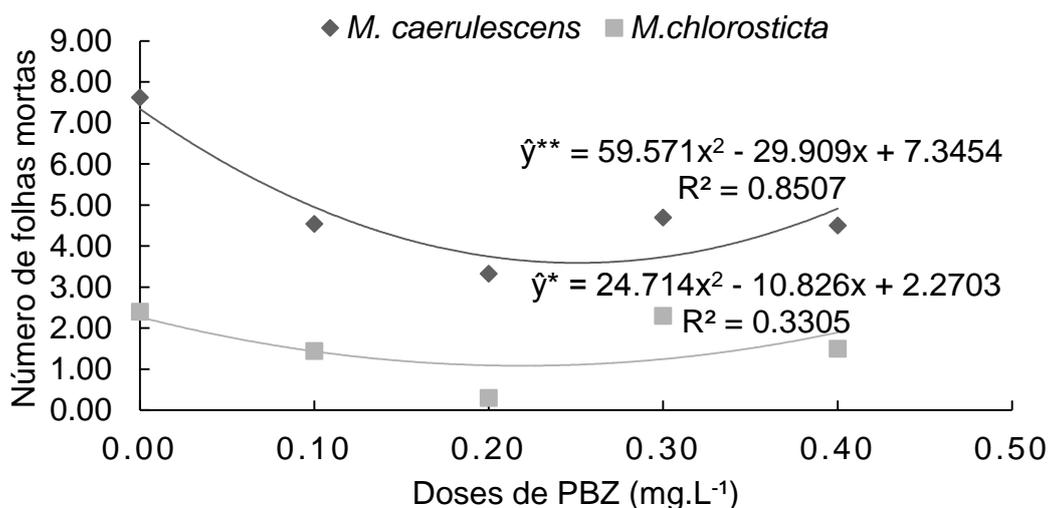


Figura 2. Número de folhas mortas das espécies *Manihot caeruleascens* e *M. chlorosticta* em função de cinco concentrações de PBZ (mg.L⁻¹) após 120 dias de conservação *in vitro*.

Esse processo natural de envelhecimento não é satisfatório, pois implica na realização de subcultivos com intervalos menores, para que possa ser mantida a capacidade do vigor da planta, não comprometendo sua regeneração. Similarmente, Fonseca et al. (2015), puderam constatar que o crescimento rápido das plantas de *Erythrina velutina* conservadas *in vitro* acelerou o processo de senescência.

De outro modo, a espécie *M. chlorosticta* proporcionou o valor estimado de 1,09 na dose de 0,22 mg.L⁻¹ de PBZ, enquanto que as demais espécies as médias foram mais baixas: 1,29 (*M. pseudoglaziovii*), 0,94 (*M. alutacea*) e 0,49 (*M. flabellifolia*).

Na variável número de brotações observa-se que a interação entre os fatores foi significativa. Contudo, ajustou-se um modelo de 2^o grau somente para a espécie *M. caeruleascens*, obtendo-se valor estimado de 0,51 na dose de 0,25 de mg.L⁻¹ de PBZ (Figura 3).

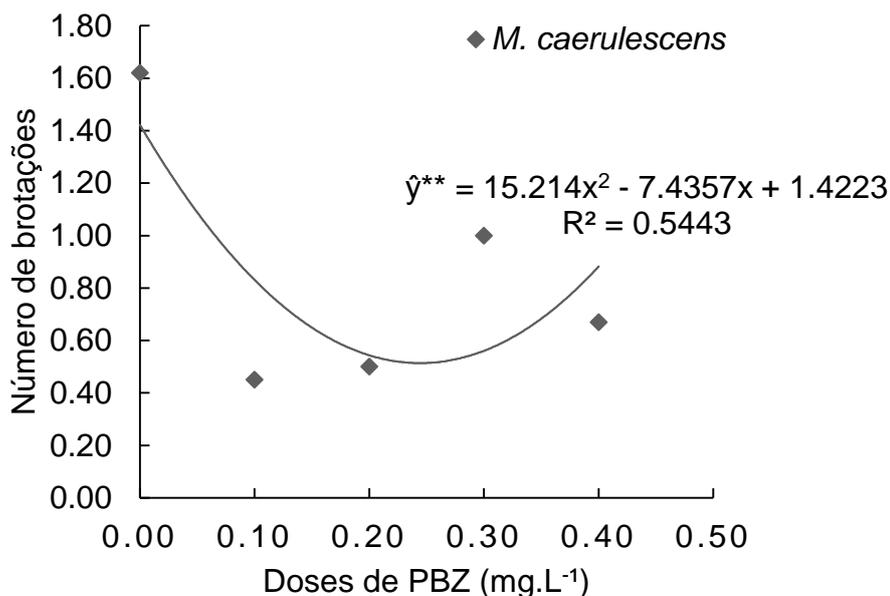


Figura 3. Número de brotações da espécie *Manihot caerulescens* em função de cinco concentrações de PBZ (mg.L⁻¹) após 120 dias de conservação *in vitro*.

De acordo com Souza et al. (2009), diante das condições de crescimento mínimo o número de brotos verdes é uma das características considerada importante e que deve ser avaliada durante o período de armazenamento, uma vez que está relacionada com uma posterior multiplicação da espécie.

Com relação ao comportamento das espécies em cada concentração de PBZ para a número de brotações (Tabela 4), pode-se observar que nas doses de 0,10 mg.L⁻¹; 0,20 mg.L⁻¹ e 0,40 mg.L⁻¹ não houveram diferenças significativas para todas as espécies. Os melhores resultados foram verificados nas espécies *M. caerulescens* (1,62), na ausência de PBZ, e *M. caerulescens* (1,00), *M. flabellifolia* (1,00) e *M. alutacea* (0,90) na dose 0,30 mg.L⁻¹.

Tabela 4. Valores médios do número de folhas mortas e do número de brotações das plantas de cinco espécies de *Manihot* em função de concentrações de PBZ (mg.L⁻¹) após 120 dias de conservação *in vitro*.

Espécies	Número de folhas mortas				
	0,00	0,10	0,20	0,30	0,40
<i>M. pseudoglaziovii</i>	0,33 c	0,75 b	1,60 b	1,00 b	1,00 b
<i>M. caerulescens</i>	7,62 a	4,54 a	3,33 a	4,70 a	4,50 a
<i>M. chlorosticta</i>	2,40 b	1,44 b	0,30 b	2,30 b	1,50 b
<i>M. alutacea</i>	0,30 c	0,63 b	0,33 b	0,63 b	0,55 b
<i>M. flabellifolia</i>	0,80 c	1,75 b	1,25 b	1,08 b	1,55 b

Espécies	Número de brotações				
	0,00	0,10	0,20	0,30	0,40
<i>M. pseudoglaziovii</i>	0,16 b	0,50 a	0,60 a	0,00 b	0,16 a
<i>M. caerulescens</i>	1,62 a	0,45 a	0,50 a	1,00 a	0,66 a
<i>M. chlorosticta</i>	0,00 b	0,11 a	0,40 a	0,10 b	0,00 a
<i>M. alutacea</i>	0,40 b	0,63 a	0,55 a	0,90 a	0,44 a
<i>M. flabellifolia</i>	0,70 b	0,16 a	0,50 a	1,00 a	0,44 a

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

Conforme constatado na análise de regressão (Tabela 3; Figura 2), para a variável número de folhas mortas (Tabela 4), nota-se que na espécie *M. caerulescens* as médias alcançadas em todas as doses de PBZ foram estatisticamente superiores às médias das demais espécies. Como já foi discutido anteriormente, a senescência foliar é um processo indesejável, que também provoca a degradação dos conteúdos celulares e a destruição de algumas organelas, ocasionando danos na energia potencial da planta (TAIZ; ZEIGER, 2013).

De maneira geral, os resultados encontrados evidenciam o pressuposto de que existe uma interdependência entre as espécies silvestres e entre os seus comportamentos *in vitro*. Do mesmo modo, na conservação *in vitro* de espécies silvestres de mandioca, Silveira (2017) constatou que a influência do genótipo sobre a resposta morfogênica das plantas proporcionou diferentes resultados, revelando a necessidade de se adequar metodologias que atinjam as especificidades de cada espécie. Portanto, torna-se indispensável a realização de outros estudos para que seja possível estabelecer protocolos mais eficientes, abrangendo um maior número de espécies e melhorando o processo de conservação *in vitro* de germoplasma.

CONCLUSÕES

Existe uma expressiva dependência genotípica em relação ao comportamento das espécies silvestres de mandioca quando preservadas *in vitro*, não sendo possível estabelecer um meio de cultura padrão para a conservação de todas as espécies.

Para a redução do crescimento das espécies silvestres, a dose de 0,20 mg.L⁻¹ de PBZ é a mais eficiente para a maioria das variáveis analisadas.

REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, J. A. A.; EVANGELISTA, M. O.; MATES, A. P. K.; ALVES, J. M. A.; OLIVEIRA, N. T.; SEDIYAMA, T.; SILVA, A. A. Occurrence of weeds in cassava savanna plantations in Roraima. **Planta Daninha**, v. 32, n. 1, p. 91-98, 2014.

BARROSO, G. M.; MORIM, M. P.; PEIXOTO, A. L.; ICHASO, C. L. F. **Frutos e sementes**: morfologia aplicada à sistemática de dicotiledôneas. Viçosa, MG: Editora UFV, 1999. 443 p.

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. In vitro conservation of pineapple germplasm treated with paclobutrazol. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, n. 7, p. 717-720, 2004.

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.

FONSECA, P. T.; NEPOMUCENO, C. F.; SILVA, T. dos S.; SANTANA, J. R. F. de. Conservação *in vitro* de *Erythrina velutina* a partir de embriões zigóticos. **Sitientibus série Ciências Biológicas**, v. 15, p. 1-8, 2015.

FUKUDA, W. M. G. Melhoramento da mandioca. In: BORÉM, A. (Ed.). Melhoramento de espécies cultivadas. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1999. p. 409-428.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Levantamento Sistemático da Produção Agrícola-LSPA. Disponível em: <[ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Levantamento_Sistematico_da_Producao_Agricola\[mensal\]/Fasciculo/lspa_201701.pdf](ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Levantamento_Sistematico_da_Producao_Agricola[mensal]/Fasciculo/lspa_201701.pdf)> Acesso em: 06 março 2017.

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. 31-34, 2006.

R DEVELOPMENT CORE TEAM (2017). R: A language and environment for statistical computing, reference index version 3.4.2. 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.

SÁ, A. 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.

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.

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.

SILVEIRA, D. M. S. Multiplicação e conservação *in vitro* de espécies silvestres de *Manihot*. 2017. **Dissertação** (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas. Disponível em: <https://www.ufrb.edu.br/pgrecvegetais/images/deyse_maria.pdf>. Acesso em: 06 de jan. 2017.

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).

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4.ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 819 p.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 918 p.

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.

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-CNPH, 1998. p. 297-330.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em algumas culturas, as espécies silvestres são utilizadas por melhoristas como fonte de caracteres úteis (resistência/tolerância a fatores bióticos e abióticos), não encontrados nas variedades da espécie cultivada. Como as espécies silvestres do gênero *Manihot* integram fontes de genes que podem ser utilizados no desenvolvimento de novas variedades, são perceptíveis a necessidade e a importância de conservar essas espécies em Bancos Ativos de Germoplasma (BAGs), levando em consideração que a eficiência de um programa de melhoramento fundamenta-se no conhecimento do germoplasma disponível, sobretudo em relação à diversidade genética que representa.

Entretanto, ao contrário da mandioca domesticada, estudos relacionados aos métodos de micropropagação e conservação *in vitro* das espécies silvestres de *Manihot* têm sido insuficientes. Nesse contexto, os experimentos executados nesse trabalho objetivaram o aprimoramento de protocolos *in vitro* de algumas espécies silvestres. Em geral, os genótipos estudados apresentaram comportamentos diferenciados, possivelmente devido a variabilidade presente nas espécies do gênero *Manihot*, bem como às especificidades de cada uma delas.

O primeiro capítulo abordou os efeitos de diferentes meios de cultura para a multiplicação de espécies silvestres de mandioca. Os resultados demonstraram que o MS 0,01 se destacou dos demais meios para a regeneração das espécies estudadas, proporcionando melhores respostas morfogênicas *in vitro*. No segundo capítulo, avaliou-se a aplicação de diferentes concentrações de Paclobutrazol® (PBZ) na conservação *in vitro* de espécies de *Manihot*, onde a dose de 0,20 mg.L⁻¹ mostrou-se mais eficiente para a redução do crescimento das plantas.

De modo geral, os resultados obtidos corroboram com o pressuposto de que existe uma dependência entre as espécies silvestres e os seus comportamentos *in vitro*. A influência do genótipo sobre a resposta morfogênica das plantas proporcionou diferentes resultados, revelando a necessidade de se adequar metodologias que atinjam as especificidades de cada espécie, implicando na realização de estudos adicionais para determinar protocolos que sejam abrangentes para um maior número de espécies, gerando melhorias para os processos de micropropagação e de conservação *in vitro* de germoplasma de mandioca silvestre.