



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E  
BIOCIÊNCIAS

Eduardo da Costa Nunes

**Caracterização físico-química do amido e cultura de células e tecidos vegetais como ferramentas biotecnológicas à seleção e conservação de germoplasma de mandioca de mesa (*Manihot esculenta* Crantz)**

Florianópolis  
2013



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E  
BIOCIÊNCIAS

Eduardo da Costa Nunes

**Caracterização físico-química do amido e cultura de células e tecidos vegetais como ferramentas biotecnológicas à seleção e conservação de germoplasma de mandioca de mesa (*Manihot esculenta* Crantz)**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências da Universidade Federal de Santa Catarina para obtenção do Grau de Doutor em Biotecnologia e Biociências.

Orientador: Professor Dr. Marcelo Maraschin.

Co-orientador: Dr. Gilmar Roberto Zaffari

Florianópolis  
2013

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Nunes, Eduardo da Costa

Caracterização físico-química do amido e cultura de células e tecidos vegetais como ferramentas biotecnológicas à seleção e conservação de germoplasma de mandioca de mesa (*Manihot esculenta* Crantz) / Eduardo da Costa Nunes ; orientador, Marcelo Maraschin ; co-orientador, Gilmar Roberto Zaffari. - Florianópolis, SC, 2013.

167 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências.

Inclui referências

1. Biotecnologia e Biociências. 2. Mandioca de mesa (*Manihot esculenta* Crantz). 3. Caracterização físico-química de amido (amilose e amilopectina). 4. Quimiometria . 5. Cultura e conservação in vitro. I. Maraschin, Marcelo. II. Zaffari, Gilmar Roberto. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências. IV. Título.

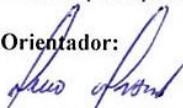
“Caracterização físico-química do amido e cultura de células e tecidos vegetais como ferramentas biotecnológicas à seleção e conservação de germoplasma de mandioca de mesa (Manihot esculenta Crantz)”

por

**Eduardo da Costa Nunes**

Tese julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (Port 19/PPGBTC/2013) do Programa de Pós Graduação em Biotecnologia e Biociências UFSC, composta pelos Professores Doutores:

**Orientador:**



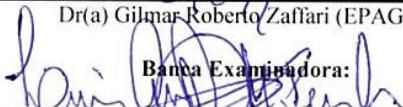
Dr(a) Marcelo Maraschin (FIT/CCB/UFSC)

**Coorientador:**

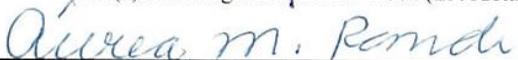


Dr(a) Gilmar Roberto Zaffari (EPAGRI)

**Banca Examinadora:**



Dr(a) Luiz Augusto Martins Peruch (EPAGRI/EEU)



Dr(a) Aúrea Maria Randi (BOT/CCB/UFSC)



Dr(a) Rosendo Augusto Yunes (QMC/CFM/UFSC)



Dr(a) Robson Marcelo Di Piéto (FIT/CCB/UFSC)



Dr(a) Cileide Maria Medeiros Coelho (CAV/UDESC)

**Coordenação:**



Dr(a). Marcelo Maraschin

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências.

Florianópolis, 10 de dezembro de 2013



Dedico este trabalho aos meus grandes amores: minha esposa Juliana e meu filho Artur, pelo carinho, compreensão e pelo amor incondicional.



## AGRADECIMENTOS

A Deus, por ser meu guia nos momentos mais difíceis. Pelo amparo e por me permitir ter forças para nunca desistir diante dos percalços. Pela vida e por sua proteção. Por me permitir a oportunidade de ter uma família maravilhosa e amigos verdadeiros que me aceitaram e me amam.

A minha mãe Bia (vovó Bi), minhas irmãs Ediléia e Heloisa, minha sobrinha Luísa, pelo amor, carinho, incentivo e pela alegria e descontração que me proporcionavam nos momentos de cansaço e desânimo. Amo a todas.

Aos meus grandes amores, minha esposa Juliana e meu filho Artur, por terem mudado o rumo de minha vida, acrescentando-a o amor incondicional, o carinho, respeito e o verdadeiro sentimento de felicidade.

Minha gratidão especial ao Professor orientador Dr. Marcelo Maraschin, pela sua grandiosidade em dividir conosco não somente seu conhecimento técnico-científico, acadêmico, mas principalmente por sua generosidade, humanidade e espiritualidade. Mostrando-nos que podemos ser melhores como pessoas, além da formação unicamente acadêmico-científica.

Ao meu co-orientador (conselheiro acadêmico) o pesquisador da Epagri Dr. Gilmar Roberto Zaffari, por sua cordialidade, amizade, visão crítica e inestimáveis contribuições.

A professora Dra. Ana Maria Viana pela colaboração na orientação de parte deste trabalho. Por sua dedicação, paciência e amizade.

A outros membros de minha família, minha sogra Maria, Núbia, Marquinhos, Tainá, Taciane, pelo carinho, momentos de descontração, respeito e compreensão.

Aos meus grandes amigos Beto e Regi (casal) e Roberta (Gram) pelo carinho, incentivo, amizade sincera e pelos momentos de descontração que aliviaram as tensões durante este período

À Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina pela confiança e apoio institucional. Aos pesquisadores Dr. Luiz Augusto Martins Peruch, Dr. Alexander Luís Moreto, MSc. Enlito de Oliveira Neubert e ao técnico agrícola Milton Zanela, pertencentes ao grupo de pesquisa de mandioca da Estação Experimental da Epagri de Urussanga pelo apoio, incentivo, disponibilidade e suporte fundamental dados a muitas das ações desenvolvidas neste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal (LMBV-UFSC), em especial aos amigos do Projeto Repensa-Mandioca: Rodolfo Moresco, Virgílio G. Uarrota e Bianca Coelho, bem como a Aline Pereira, Manuel de Prá, Fernanda Ramlov, Regina de O. Rodrigues, Simone Kobe, Amélia Somensi Zeggio e Beatriz Veleirinho, que compartilharam além de momentos de muito trabalho, de angústias, de troca de idéias, de descontração e risadas e de estabelecimento de novas amizades.

À Professora Edna Regina Amante e ao grupo do Laboratório de Frutas e Hortaliças, pelas orientações, pela receptividade, disponibilidade e apoio, principalmente em relação à caracterização amídica.

Ao Professor Carlos Eduardo Maduro Campos, (Laboratório de Difração de raios-X, Departamento de física – UFSC) pelo apoio e orientações na aquisição dos difratogramas e análise de dados. Agradeço pelo interesse, tempo dedicado, pelas sugestões e observações críticas aos resultados obtidos.

À equipe do Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME-UFSC), pelo apoio e orientações durante as análises realizadas de microscopia eletrônica de varredura.

Aos funcionários da UFSC, Maria Luisa Peixoto (técnica do LMBV-CCA), Luiz Gustavo (CCA) e Joice Ferrari da Costa (secretária do PPG em Biotecnologia e Biociências) pelo companheirismo, pela prestatividade, eficiência e qualidade dos serviços.

À Universidade Federal de Santa Catarina e todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências, bem como aos discentes, pessoal técnico e administrativo, pela amizade e pela oportunidade de realização desta pós-graduação.

À EMBRAPA pela concessão da bolsa e ao Governo Brasileiro (CNPq e MCT) pelo financiamento de parte das pesquisas desenvolvidas através do Edital 22/2010 – CNPq/Repensa - Desenvolvimento da Cadeia Produtiva da Mandioca na Região Centro-Sul do Brasil.

“[...] Quando tudo nos parece dar errado, acontecem coisas boas que não teriam acontecido se tudo tivesse dado certo. [...]”

Renato Russo



NUNES, EDUARDO da COSTA. **Caracterização físico-química do amido e cultura de células e tecidos vegetais como ferramentas biotecnológicas à seleção e conservação de germoplasma de mandioca de mesa (*Manihot esculenta* Crantz)**. Tese (Doutorado em Biotecnologia e Biociências) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013.

## RESUMO

A mandioca de mesa (*Manihot esculenta* Crantz) é nativa da América sendo produzida em condições adversas de solo e clima, com muitas aplicações para a alimentação humana e para extração de amido. É considerada a terceira maior fonte de carboidratos consumidos no mundo, com importância social significativa, especialmente em países tropicais. No Estado de Santa Catarina (Sul do Brasil), é produzida como cultura de subsistência por agricultores familiares que conservam em suas propriedades (*on farm*) inúmeros materiais genéticos. Muitos destes materiais estão depositados no banco de Germoplasma da Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural-Epagri, integrando a coleção de trabalho do seu programa de melhoramento genético. Estes acessos genéticos, bem como os obtidos através de cruzamentos estão sendo avaliados principalmente para características morfo- agrônômicas. Todavia existe necessidade de informações detalhadas sobre estes materiais genéticos para definir uma melhor aplicabilidade destes acessos de mandioca. Neste contexto os principais objetivos deste trabalho foram a caracterização físico-química do amido de 40 acessos de mandioca e de cultura de células e tecidos vegetais, buscando desenvolver ferramentas de auxílio à seleção e de conservação de germoplasma desses materiais. Para a caracterização físico-química o amido e suas frações (amilose e amilopectina) dos acessos genéticos foram analisados, por métodos analíticos típicos de uma plataforma metabolômica, i.e. ATR-FTIR, UV-vis e DRX, associados às ferramentas de quimiometria e bioinformática. Os principais resultados alcançados foram: Os acessos AO- 89, AO- 118, AR- 53, AO- 72, AO- 79 apresentaram alto teor de amilose. Os perfis espectrais ATR- FTIR obtidos associados a ferramentas quimiométricas agruparam os acessos AO- 13 , AO- 109, AO- 118 e AO- 121 por apresentaram uma composição química peculiar em relação aos demais. Em relação à cultura e conservação *in vitro*, o meio de cultura (MS semi-sólido + 4 % de sacarose e 0,01 mg/l de BAP) se mostrou adequado para a

micropropagação de mandioca, enquanto o meio de cultura MS semi-sólido + 8 % de sacarose permitiu a manutenção de culturas viáveis durante um período de 12 meses, sem a necessidade de sub-cultura.

**Palavras-chave:** Mandioca de mesa (*Manihot esculenta*), amido, caracterização físico-química, quimiometria, micropropagação, conservação in vitro.

NUNES, EDUARDO da COSTA. **Physico-chemical characterization of starch and plant cell tissues culture as biotechnological tools for selection and conservation of germplasm of sweet cassava (*Manihot esculenta* Crantz).** Thesis (Ph.D.in Biotechnology and Biosciences) – Graduate Program in Biotechnology and Biosciences, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, 2013.

## ABSTRACT

The sweet cassava (*Manihot esculenta* Crantz) is native of South America. It is an important rustic root crop being produced in adverse conditions of soil and climate, with many applications for human food and starch extraction. It is considered the third largest source of carbohydrates consumed in the world, with significant social importance, especially in tropical countries. In the Santa Catarina state (southern of Brazil), cassava is produced by small farmers as subsistence crop and they have been conserving different genetic materials *on farm* during many years. Many of these materials were introduced in the Germplasm Bank of the official agriculture agency (Santa Catarina State Agricultural Research and Rural Extension Agency – EPAGRI, Urussanga), integrating the collection work of the breeding program. These accessions as well as those obtained by breeding are being evaluated mainly for morpho-agronomic characteristics. Other useful information of those genetic materials are lacking for EPAGRI and in the literature for a better application of cassava accessions. In this context the main objectives of this work were the physicochemical characterization of starch from 40 cassava accessions and culture of plant cells and tissues to develop tools to aid assisted selection and germplasm conservation of these materials. For physicochemical characterization starch and its fractions (amylose and amylopectin) through the use of analytical techniques such as LC, FTIR, UV-vis, XRD associated to bioinformatics tools. The main results were: Accessions AO-89, AO-118, AO-53, AO-72, AO-79 showed high amylose content. The ATR-FTIR spectral profiles obtained combined with chemometric tools grouped the accessions AO-13, AO-109, AO-118 and AO-121 as they presented a peculiar chemical composition in relation to others. Regarding the culture and maintenance in vitro culture medium (semi-solid MS + 4 % sucrose and 0.01 mg/L of BAP) was the most efficient for micropropagation of cassava, while the culture medium semi-solid MS + 8% sucrose medium enabled the maintenance

of viable cultures for a period of 12 months without the need for sub-culturing.

**Keywords:** Sweet cassava (*Manihot esculenta*); starch, physico-chemical characterization, chemometrics, micropropagation, *in vitro* conservation.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Micrografias de grânulos de amido típicos de raízes de mandioca de mesa (acesso 07) (A) Magnificação de 500x evidenciando os detalhes morfológicos e distribuição típica dos grânulos de amido de mandiocas de mesa. (B) Micrografia (2000x) mostrando como foram realizadas as mensurações dos grânulos..... 60
- Figura 2:** Típico difratograma de raios-X de amostras de amidos dos acessos genéticos de mandioca de mesa. Os picos nos ângulos de difração  $2\theta$  no difratograma são característicos de polimorfismo tipo A..... 60
- Figura 3:** Perfil espectral (ATR-FTIR, 3000–300 ondas.cm<sup>-1</sup>) de amostras de amido dos 40 acessos genéticos de mandioca de mesa estudados. Onde: A-Região de *fingerprint* de lipídios (3000-2800 ondas.cm<sup>-1</sup>); B-Região de *fingerprint* de proteínas (1650-1550 ondas.cm<sup>-1</sup>) e C-Região de *fingerprint* de carboidratos (1200-950 ondas.cm<sup>-1</sup>). .. 64
- Figura 4:** Correlação linear de Pearson para os valores de cristalinidade calculados por ATR-FTIR e DRX e o conteúdo de amilose determinado por método enzimático (amostras de amido do ciclo 2010/2011)..... 65
- Figura 5:** Distribuição fatorial em PC1 e PC2 para as variáveis físico-químicas de amostras de amido das raízes dos acessos genéticos de mandioca de mesa. .... 66
- Figura 6:** Análise hierárquica (*cluster*) de amidos de acessos genéticos de mandioca de mesa em relação às suas características físico-químicas e funcionais. Similaridades de grupos (acessos genéticos) definidas com base na distância euclidiana (UPGMA). Correlação cofenética de 70,65%. .... 67
- Figura 7:** Distribuição fatorial de PC1 e PC2 dos dados espectrais de ATR-FTIR (3000-600 ondas.cm<sup>-1</sup>) de amostras de amidos de mandioca. PC1 e PC2 contribuíram para explicar em 98,78% a variação amostral.....68
- Figura 8:** Análise hierárquica (*cluster*) dos dados espectrais de ATR-FTIR (3000-600 ondas.cm<sup>-1</sup>) de amostras de amidos de acessos genéticos de mandioca de mesa. Similaridades de grupos (acessos genéticos) foram definidas com base na distância euclidiana (UPGMA). Correlação cofenética de 98,63%. .... 68
- Figura 9:** Análise hierárquica (*cluster*) dos dados espectrais de ATR-FTIR (1200-950 ondas.cm<sup>-1</sup>) de amostras de amidos de acessos genéticos de mandioca de mesa. Similaridades de grupos (acessos genéticos) definidas com base na distância euclidiana (UPGMA). Correlação cofenética de 97,74%. .... 69

**Figura 10:** Distribuição fatorial de PC1 e PC2 para os dados espectrais de ATR-FTIR (3000-2800 ondas.cm<sup>-1</sup>, *fingerprint* de lipídios) de amostras de amidos de mandioca de mesa. PC1 e PC2 contribuíram para explicar em 99,41% a variação amostral.....70

**Figura 11:** Distribuição fatorial de PC1 e PC2 dos dados espectrais de ATR-FTIR (1650-1500 ondas.cm<sup>-1</sup>, *fingerprint* de proteínas) de amostras de amidos de mandioca de mesa. PC1 e PC2 contribuíram para explicar em 99,49% a variação amostral.....70

**Figura 12:** Efeito de diferentes substratos (areia e papel toalha) na indução de brotamento das gemas de segmentos de manivas de mandioca de mesa contendo uma ou duas gemas mantidas durante dez dias em condições semi-assépticas. Percentagem obtida de três repetições contendo no mínimo 23 gemas pré-existentes por tratamento. Mesma letra sobre os gráficos no eixo “x” não diferem significativamente de acordo com o teste de Tukey (p≤ 0,05).....164

**Figura 13:** Brotamento *in vitro* de diferentes tipos de explantes, contendo uma única gema, obtidos a partir de brotações axênicas de mandioca de mesa (*M. esculenta* - acesso 52), após cultivo *in vitro* em meio de cultura MS, suplementado com 4% sacarose, 0,2% de Phytigel e isento de reguladores de crescimento. Os valores representam a média de no mínimo 3 repetições com 12 explantes por tratamento. ....164

**Figura 14:** Enraizamento *in vitro* de diferentes tipos de explantes, contendo uma única gema, obtidos a partir de brotações axênicas de mandioca de mesa (acesso 52), após cultivo *in vitro* em meio de cultura MS, suplementado com 4% sacarose, 0,2% de Phytigel e isento de reguladores de crescimento. Os valores representam a média de no mínimo 3 repetições com 12 explantes por tratamento.....165

**Figura 15:** Percentagens médias de brotamento de gemas de segmentos nodais de mandioca de mesa (*M. esculenta* - Acesso 52) cultivados *in vitro* em meio de cultura MS semi-sólido, suplementado com 4% de sacarose e diferentes concentrações de BAP, no decorrer de 16 dias, avaliados a partir do quinto dia após a inoculação. Foram utilizados no mínimo 3 repetições com 12 explantes cada, por tratamento.....165

**Figura 16:** Percentagens médias de enraizamento de segmentos nodais de mandioca de mesa (*M. esculenta* - Acesso 52) cultivados *in vitro* em meio de cultura MS semi-sólido, suplementado com 4% de sacarose e diferentes concentrações de BAP, no decorrer de 16 dias, avaliados a partir do quinto dia após a inoculação. Foram utilizados no mínimo 3 repetições com 12 explantes cada, por tratamento.....166

**Figura 17:** Crescimento *ex vitro* em altura (média) de plântulas de mandioca de mesa (*M. esculenta* – acesso 52) durante 45 dias de cultivo

em diferentes substratos de aclimação. Avaliações aos 0 (transplante), 15, 20, 30 e 45 dias após o transplante. Os valores médios foram obtidos a partir de 15 plântulas transplantadas por tratamento. 166

**Figura 18:** Crescimento *ex vitro* em número de folhas (média) de plântulas de mandioca de mesa (*M. esculenta* – acesso 52) durante 45 dias de cultivo em diferentes substratos de aclimação. Avaliações aos 0 (transplante), 15, 20, 30 e 45 dias após o transplante. Os valores médios foram obtidos a partir de 15 plântulas transplantadas por tratamento. 167

**Figura 19:** Altura média de microplantas de mandioca de mesa (*M. esculenta* – acesso 52) cultivadas durante doze meses em meio de cultura MS semi-sólido acrescidos de diferentes concentrações de sacarose. As avaliações ocorreram a cada três meses utilizando-se 3 repetições de 12 microplantas cada, por tratamento. Letras iguais sobre as colunas em cada período de tempo não diferem significativamente pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). ..... 122

**Figura 20:** Número médio de nós (foliares + apical) por microplanta de mandioca de mesa (*M. esculenta* – acesso 52) cultivadas durante doze meses em meio de cultura MS semi-sólido acrescido de diferentes concentrações de sacarose. As avaliações ocorreram a cada três meses utilizando-se 3 repetições de 12 microplantas cada, por tratamento. Letras iguais sobre as colunas em cada período de tempo não diferem significativamente pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). ..... 122

**Figura 21:** Percentagem de mortalidade de microplantas de mandioca de mesa (*M. esculenta* – acesso 52) cultivadas durante doze meses em meio de cultura MS semi-sólido acrescido de diferentes concentrações de sacarose. As avaliações ocorreram a cada três meses, durante 12 meses, utilizando-se 4 repetições de 12 microplantas cada, por tratamento. Letras iguais sobre as colunas em cada período de tempo não diferem significativamente pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). ..... 123

**Figura 22:** Percentagem de brotamento de ápices e segmentos nodais de mandioca de mesa (*M. esculenta* – acesso 52) encapsulados em alginato de cálcio e inoculados em meio de regeneração/multiplicação. As avaliações ocorreram diariamente durante 12 dias a partir do quinto dia de cultivo, utilizando-se 3 repetições de 10 explantes cada. Letras iguais sobre as colunas em cada período de tempo não diferem significativamente pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). ..... 127

**Figura 23:** Percentagem de Brotamento de explantes (ápices e/ou segmentos nodais) de mandioca de mesa (*M. esculenta* – acesso 52) submetidos à desidratação química em solução líquida de MS e sacarose 0,3 M durante 16, 24 e 40 horas. A avaliação ocorreu aos sete dias após

a inoculação em meio de multiplicação. Média de 3 repetições de 10 explantes por período.....128

**Figura 24:** Percentagem de brotamento de explantes (ápices e/ou seguimentos nodais) de mandioca de mesa (*M. esculenta* – acesso 52) submetidos à desidratação química sobre papel embebido em solução de MS e sacarose 0,3 M durante 16, 24 e 40 horas. A avaliação ocorreu aos sete dias após a inoculação em meio de multiplicação. Média de 3 repetições de 10 explantes por período. ....129

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Propriedades físico-químicas de amidos dos acessos genéticos de mandioca de mesa (*M. esculenta*). Os valores de rendimento de extração (%) e teor de amilose (%) referem-se às safras de 2010/2011 e 2011/2012, enquanto o tamanho do grânulo ( $\mu\text{m}$ ) e poder de inchamento (%) à safra 2010/2011..... 58
- Tabela 2:** Índice de cristalinidade dos amidos dos acessos genéticos de mandioca de mesa, determinados via difração de raios-X (%) e estimadas pela razão das intensidades de sinais das absorvâncias de 999/1018 ( $\text{ondas.cm}^{-1}$ -ATR-FTIR), referentes à amilopectina e amilose, respectivamente..... 62
- Tabela 3:** Contribuições fatoriais (*loadings*) para as variáveis físico-químicas e funcionais dos amidos de mandioca de mesa estudados. .... 66
- Tabela 4:** Usos potenciais da fração amídica dos acessos genéticos estudados como substituinte de outras fontes amiláceas, utilizando como variável determinante de sua aplicabilidade o teor de amilose ( $\% \pm 2,00$ ), determinado por método enzimático. .... 77
- Tabela 5:** Percentual de brotamento de gemas de segmentos de ramos de 5 acessos de mandioca de mesa contendo de 3 a 5 gemas em substrato papel toalha sob condições semi-asepticas. Avaliações ocorreram aos 5 e 10 dias após a implantação. .... 109
- Tabela 6:** Percentual de indução de brotamento de gemas de segmentos de ramos (manivas) de mandioca de mesa (*M. esculenta* - acesso 52) contendo 1 ou 2 gemas, em dois diferentes substratos sob condições semi-asepticas, avaliados diariamente durante 10 dias a partir do quinto dia de implantação..... 110
- Tabela 7:** Efeito de diferentes tempos de imersão em álcool 70% e em solução comercial de hipoclorito de sódio sobre a desinfecção de explantes (segmentos nodais e/ou apicais) de mandioca de mesa (*M. esculenta* - Acesso 52), oriundas de brotações obtidas em condições semi-asepticas..... 112
- Tabela 8:** Percentuais de brotamento de diferentes explantes (segmentos nodais basais, segmentos nodais medianos e segmentos apicais), obtidos de microplantas de mandioca de mesa (*M. esculenta* - acesso 52) cultivadas *in vitro*, durante 60 dias, em meio de cultura MS semi-sólido, suplementado com 4% de sacarose, 0,2% de Phytigel e isento de reguladores de crescimento. Avaliações ocorreram diariamente, durante dezesseis dias a partir do quinto dia de inoculação. .... 113
- Tabela 9:** Percentuais de enraizamento de diferentes explantes (segmentos nodais basais, segmentos nodais medianos e segmentos

apicais), obtidos de microplantas de mandioca de mesa (*M. esculenta* - acesso 52) cultivadas *in vitro*, durante 60 dias, em meio de cultura MS semi-sólido, suplementado com 4% de sacarose, 0,2% de Phytigel e isento de reguladores de crescimento. Avaliações ocorreram diariamente, durante dezesseis dias a partir do quinto dia de inoculação.....114

**Tabela 10:** Efeito de diferentes concentrações de BAP sobre a indução de brotamento (%) das gemas de segmentos nodais de mandioca de mesa (*M. esculenta* – acesso 52) cultivados *in vitro* em meio MS semi-sólido acrescido de 4% de sacarose durante um período de 16 dias. Avaliações ocorreram diariamente durante dezesseis dias a partir do quinto dia de inoculação. ....115

**Tabela 11:** Efeito de diferentes concentrações de BAP sobre o enraizamento (%) de segmentos nodais de mandioca de mesa (*M. esculenta* – acesso 52) cultivados *in vitro* em meio MS semi-sólido acrescido de 4% de sacarose durante um período de 16 dias. Avaliações ocorreram diariamente durante dezesseis dias a partir do quinto dia de inoculação. ....116

**Tabela 12:** Parâmetros de crescimento *ex vitro* de plântulas micropropagadas de mandioca de mesa (*M. esculenta* – acesso 52), após 45 dias de cultivo em diferentes substratos de aclimação. ....118

**Tabela 13:** Crescimento em altura (cm) de plantas micropropagadas de mandioca de mesa (*M. esculenta* – acesso 52) inoculadas e cultivadas durante 3, 6, 9 e 12 meses em meio de cultura MS semi-sólido acrescido de diferentes concentrações de sacarose. ....120

**Tabela 14:** Crescimento em número de nós de plantas micropropagadas de mandioca de mesa (*M. esculenta* – acesso 52) inoculadas e cultivadas durante 3, 6, 9 e 12 meses em meio de cultura MS semi-sólido acrescido de diferentes concentrações de sacarose. ....121

**Tabela 15:** Taxa de brotamento (%) de ápices e segmentos nodais de mandioca de mesa (*M. esculenta* – acesso 52) obtidos de microplantas cultivadas durante 3, 6, 9 e 12 meses em meio MS com diferentes concentrações de sacarose. Avaliação após 30 dias de cultivo em meio MS acrescido de 4% sacarose e 0,01 mg/l de BAP.....124

**Tabela 16:** Taxa de enraizamento (%) de ápices e segmentos nodais de mandioca de mesa (*M. esculenta* – acesso 52) obtidos de microplantas cultivadas durante 3, 6, 9 e 12 meses em meio MS com diferentes concentrações de sacarose. Avaliação após 30 dias de cultivo em meio MS acrescido de 4% sacarose e 0,01 mg/l de BAP.....125

**Tabela 17:** Taxa de brotamento (%) de ápices e segmentos nodais de mandioca de mesa (*M. esculenta* – acesso 52) encapsulados e inoculados

em meio de regeneração/multiplicação (MS acrescido de 4% sacarose e 0,01 mg/l de BAP). Avaliação durante 12 dias a partir do quinto dia após a inoculação. .... 126



## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ANA	– Ácido $\alpha$ -naftalenoacético
AIB	– Ácido indol-3-butírico
ATR-FTIR	– Espectroscopia vibracional de Infravermelho médio com transformada de Fourier
BAP	– 6-benzilaminopurina
DMSO	– Dimetilsulfóxido
DRX	– Difração de Raios-X
Epagri	– Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina
GA <sub>3</sub>	– Ácido giberélico
HCl	– Ácido clorídrico
MECPLANT <sup>®</sup>	– Substrato comercial
MEV	– Microscopia eletrônica de varredura
MS	– Meio de cultura de Murashige & Skoog (MS, 1962)
NaOH	– Hidróxido de sódio
PI (%)	– Poder de inchamento do amido em porcentagem
PPM <sup>™</sup>	– Plant Preservative Mixture-Plant Cell Technology
PVS 2	– Solução de vitrificação de Sakai (1990)
UV-vis	– Espectrofotometria de absorção molecular no ultravioleta/visível



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	<b>33</b>
1.1 TAXONOMIA, ORIGEM E DOMESTICAÇÃO DE <i>Manihot esculenta</i> CRANTZ.....	33
1.2 IMPORTÂNCIA, SOCIAL ECONÔMICA E ALIMENTAR DE <i>Manihot esculenta</i> CRANTZ .....	34
1.3 GERMOPLASMA E DIVERSIDADE GENÉTICA DE <i>Manihot esculenta</i> CRANTZ.....	35
1.4 CONTEXTUALIZAÇÃO DA PROPOSTA EM TELA.....	37
<b>2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>41</b>
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>45</b>
3.1 OBJETIVOS GERAIS .....	45
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	45

### CAPÍTULO 1

#### CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE AMIDOS DE ACESSOS GENÉTICOS DE MANDIOCA DE MESA (*Manihot esculenta* CRANTZ)

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>49</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>51</b>
2.1 MATERIAL VEGETAL – SELEÇÃO DOS ACESSOS GENÉTICOS.....	51
2.2 ISOLAMENTO E RENDIMENTO DE EXTRAÇÃO DO AMIDO .....	51
2.3 PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E FUNCIONAIS .....	52
<b>2.3.1 Teor de amilose</b> .....	<b>52</b>
<b>2.3.2 Poder de Inchamento do amido – PI (%)</b> .....	<b>52</b>
2.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV).....	53
<b>2.4.1 Diâmetro e forma dos grânulos de amido</b> .....	<b>53</b>
2.5 DIFRAÇÃO DE RAIOS-X (DRX).....	53
<b>2.5.1 Índice de Cristalinidade (IC) da fração amídica</b> .....	<b>54</b>
2.6 ESPECTROSCOPIA VIBRACIONAL DE INFRAVERMELHO MÉDIO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (ATR-FTIR).....	54
2.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	55
<b>3. RESULTADOS</b> .....	<b>57</b>

3.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E PROPRIEDADES FUNCIONAIS DOS AMIDOS.....	57
3.1.1 Rendimento de extração de amido (% m/m) .....	57
3.1.2 Teor de amilose .....	57
3.1.3 Poder de inchamento (PI) (% m/m) .....	59
3.1.4 Diâmetro e forma dos grânulos.....	59
3.1.5 Índice de cristalinidade (IC) da fração amídica determinado por difração de raios-X(DRX) .....	60
3.1.6 Espectroscopia vibracional de infravermelho médio com transformada de Fourier (ATR-FTIR) .....	63
3.2 ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS E CLUSTERS ....	65
<b>4. DISCUSSÃO.....</b>	<b>72</b>
4.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E PROPRIEDADES FUNCIONAIS .....	72
4.1.1 Rendimento de extração de amido.....	72
4.1.2 Teor de amilose .....	73
4.1.3 Poder de inchamento (PI).....	74
4.1.4 Tamanho (diâmetro) e formato dos grânulos.....	75
4.1.5 Índice de cristalinidade (IC) da fração amídica determinado por difração de raios-X (DRX) .....	76
4.1.6 Espectroscopia vibracional de infravermelho médio com transformada de Fourier (ATR-FTIR) .....	79
4.2 ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS E CLUSTERS ....	81
<b>5. CONCLUSÕES.....</b>	<b>84</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>86</b>

**CAPÍTULO 2**  
**OTIMIZAÇÃO DE PROTOCOLOS PARA**  
**MICROPROPAGAÇÃO E CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DE**  
**MANDIOCA DE MESA (*Manihot esculenta* CRANTZ)**

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>96</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>101</b>
2.1 MATERIAL VEGETAL.....	101
2.2 ESTABELECIMENTO <i>EX VITRO</i> E <i>IN VITRO</i> DE CULTURAS SEMI-AXÊNICAS E AXÊNICAS DE <i>Manihot esculenta</i> CRANTZ	101

2.2.1	Indução de brotamento de gemas em segmentos de ramos (manivas) <i>ex vitro</i> , em condições semi-assépticas .....	101
2.2.2	Desinfecção e estabelecimento <i>in vitro</i> de segmentos nodais e apicais de ramos obtidos a partir da brotação das gemas de segmentos de manivas, mantidas <i>ex vitro</i> em condições semi-assépticas.....	102
2.3	MICROPROPAGAÇÃO DE <i>Manihot esculenta</i> CRANTZ – ACESSO GENÉTICO 52.....	103
2.3.1	Multiplicação <i>in vitro</i> .....	103
2.3.2	Efeito do BAP sobre a indução do brotamento de gemas e formação de raízes em segmentos nodais cultivados <i>in vitro</i> .....	104
2.3.3	Aclimatação de microplantas de <i>Manihot esculenta</i> Crantz – Acesso 52 produzidas <i>in vitro</i> .....	104
2.4	CONSERVAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE GERMOPLASMA DE <i>Manihot esculenta</i> CRANTZ – ACESSO 52.....	105
2.4.1	Restrição do crescimento <i>in vitro</i> .....	105
2.4.1.1	Efeito de diferentes concentrações de sacarose sobre a conservação <i>in vitro</i> de microplantas <i>Manihot esculenta</i> Crantz – acesso 52.....	105
2.4.1.2	Efeito de diferentes concentrações de Phytigel sobre a conservação <i>in vitro</i> de segmentos nodais, encapsulados em alginato, de <i>Manihot esculenta</i> Crantz – acesso 52 .....	106
2.4.2	Desenvolvimento de métodos para a criopreservação de ápices e segmentos nodais de <i>Manihot esculenta</i> Crantz – acesso 52 .....	107
2.5	ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	108
<b>3.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>109</b>
3.1	MICROPROPAGAÇÃO DE MANDIOCA DE MESA ( <i>Manihot esculenta</i> CRANTZ) .....	109
3.1.1	Estabelecimento <i>ex vitro</i> de culturas semi-axênicas de mandioca de mesa ( <i>Manihot esculenta</i> Crantz) .....	109
3.1.1.1	Efeito de tipos de substratos e de tipos de segmentos de manivas sobre a indução de brotamento de gemas, <i>ex vitro</i> , em condições semi-assépticas.....	109
3.1.2	Estabelecimento <i>in vitro</i> de culturas axênicas de <i>Manihot esculenta</i> Crantz (Acesso 52) a partir de segmentos nodais e apicais de ramos obtidos em condições semi-assépticas .....	111
3.1.2.1	Desenvolvimento de protocolos de desinfecção de segmentos nodais e apicais de ramos obtidos em condições semi-assépticas.....	111
3.1.3	Multiplicação e enraizamento <i>in vitro</i> .....	112

3.1.3.1 Brotamento e enraizamento <i>in vitro</i> de segmentos nodais e apicais, cultivados na ausência de reguladores de crescimento. ....	112
3.1.3.2 Efeito de diferentes concentrações de BAP sobre a indução do brotamento de gemas e formação de raízes em segmentos nodais de mandioca de mesa ( <i>Manihot esculenta</i> – Acesso 52) .....	115
<b>3.1.4 Aclimação .....</b>	<b>117</b>
3.2 CONSERVAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE GERMOPLASMA DE MANDIOCA DE MESA ( <i>Manihot esculenta</i> CRANTZ) .....	119
<b>3.2.1 Efeito de diferentes concentrações de sacarose no meio de cultura sobre a conservação <i>in vitro</i> de microplantas de mandioca de mesa.....</b>	<b>119</b>
<b>4.2.2 Efeito de diferentes concentrações de Phitagel no meio de cultura sobre o armazenamento de ápices e segmentos nodais de mandioca de mesa (<i>M. esculenta</i> – acesso 52) encapsulados em alginato de cálcio .....</b>	<b>125</b>
<b>3.2.3 Desenvolvimento de métodos para criopreservação de segmentos nodais de mandioca de mesa (<i>M. esculenta</i> – acesso 52) .....</b>	<b>127</b>
<b>4. DISCUSSÃO.....</b>	<b>131</b>
4.1 MICROPROPAGAÇÃO DE MANDIOCA DE MESA ( <i>Manihot esculenta</i> CRANTZ) .....	131
<b>4.1.1 Obtenção de culturas axênicas.....</b>	<b>131</b>
4.1.1.1 Indução de brotamento de gemas em sistema semi-asséptico. 131	
4.1.1.2 Desinfecção e isolamento <i>in vitro</i> a partir de segmentos nodais e apicais de brotações de mandioca de mesa obtidas em condições semi-assépticas .....	133
4.2 CULTURA <i>IN VITRO</i> : ESTABELECIMENTO, MULTIPLICAÇÃO E ENRAIZAMENTO.....	136
<b>4.2.1 Estabelecimento de cultura <i>in vitro</i> de mandioca de mesa (<i>Manihot esculenta</i> Crantz – acesso 52).....</b>	<b>136</b>
<b>4.2.2 Indução do brotamento de gemas e formação de raízes em segmentos nodais de mandioca de mesa (<i>Manihot esculenta</i> – Acesso 52) cultivados <i>in vitro</i> sob efeito de diferentes concentrações BAP137</b>	
<b>4.3 ACLIMATAÇÃO .....</b>	<b>140</b>
4.4 CONSERVAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE GERMOPLASMA DE MANDIOCA DE MESA ( <i>Manihot esculenta</i> CRANTZ) .....	142
<b>4.4.1 Efeito de diferentes concentrações de sacarose no meio de cultura sobre a conservação <i>in vitro</i> de microplantas de mandioca de mesa.....</b>	<b>143</b>

<b>4.4.2 Efeito de diferentes concentrações de Phitagel no meio de cultura sobre o armazenamento de segmentos nodais de mandioca de mesa (<i>M. esculenta</i> – acesso 52) encapsulados em alginato de cálcio .....</b>	<b>146</b>
<b>4.4.3 Desenvolvimento de métodos para criopreservação de ápices e segmentos nodais de mandioca de mesa (<i>M. esculenta</i> – acesso 52) .....</b>	<b>149</b>
4.4.3.1 Efeito da desidratação química sobre a sobrevivência de ápices e segmentos nodais de mandioca de mesa ( <i>M. esculenta</i> – acesso 52)..	150
<b>5. CONCLUSÕES .....</b>	<b>153</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>155</b>
<b>APÊNDICES.....</b>	<b>164</b>



## 1. INTRODUÇÃO GERAL

### 1.1 TAXONOMIA, ORIGEM E DOMESTICAÇÃO DE *Manihot esculenta* CRANTZ

A mandioca pertence à família EUPHORBIACEAE, gênero *Manihot* e espécie *Manihot esculenta* Crantz. Este gênero compreende 98 espécies com diferentes hábitos de crescimento, arbustivos ou arbóreos, sendo que a espécie *M. esculenta*, no entanto apresenta hábito arbóreo, sendo também a única deste gênero que produz raízes comestíveis (ROGER & APPAN, 1973).

As raízes das diferentes variedades de mandioca acumulam em maior ou menor grau compostos cianogênicos, sendo conhecidas e/ou classificadas como “mansas” (atóxicas) as variedades que apresentam teor de HCN abaixo de  $100 \mu\text{g.kg}^{-1}$  de raízes frescas ou “bravas” (tóxicas) aquelas com teores acima deste. Assim as mandiocas mansas (i.e. mandioca de mesa, aipim, macaxeira) podem ser destinadas ao consumo *in natura* e as bravas às indústrias de transformação (e.g. produção de farinhas e fécula) (BOLHUIS *et al.*, 1954).

Para Olsen (2004), as discussões acerca da origem genética e domesticação de *M. esculenta* ainda são controversas. É fato no entanto, que o Brasil é o país com o maior centro de diversidade de espécies de *Manihot* (NASSAR; HASHIMOTO & FERNANDES, 2008). Segundo Fukuda e Otsubo (2003), a mandioca é originária das Américas e possivelmente do Brasil Central, mas há evidências de seu cultivo por civilizações Incas há 4000 anos na América Central, Venezuela, Colômbia e Peru. Estudos evidenciam que a cultura da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz spp. *esculenta*) possivelmente foi domesticada de populações selvagens de *M. esculenta* da subespécie *flabellifolia* (ALLEM, 2002), na extensão da fronteira sul da bacia Amazônica (OLSEN & SCHAAL 1999). Segundo Murray (2010) estudos recentes, agregando evidências obtidas a partir de estudos moleculares e arqueológicos, apontam o Sudoeste da Amazônia, em uma região que compreende os estados do Acre, Rondônia, Tocantins, Goiás e Mato Grosso como sendo definitivamente a região de origem e domesticação da mandioca, acerca de 10 mil a 12 mil anos. Parece consenso, contudo, que *M. esculenta* foi domesticada e cultivada por nativos americanos antes de ser disseminada à África e Ásia após a chegada dos europeus no século XVI. Atualmente esta espécie é cultivada em regiões tropicais e subtropicais numa região compreendida entre 30° de latitude ao norte e sul do Equador.

## 1.2 IMPORTÂNCIA, SOCIAL ECONÔMICA E ALIMENTAR DE *Manihot esculenta* CRANTZ

Essa espécie tem um aspecto social muito importante, pois é utilizada como alimento energético básico na dieta de mais de 800 milhões de pessoas, em diversos países (NASSAR & ORTIZ, 2010). Pode ser produtiva em solos marginais, deficientes em fertilidade e ácidos, além de ser muito tolerante às doenças, à seca e às pragas. Portanto é uma cultura extremamente rústica que se adapta a variados ambientes, sem grandes exigências em agroquímicos e sem depender de sementes, sendo caracterizada como uma cultura destinada principalmente aos cultivos de subsistência praticados por pequenos produtores familiares. Esta cultura foi de certa forma negligenciada ao longo de muitos anos pela pesquisa em função do desinteresse de governantes e de grandes corporações ligadas principalmente ao agronegócio. Mais recentemente, devido à sua importância cultural e econômica frente à agricultura familiar e às preocupações crescentes relacionadas à segurança alimentar, aquecimento global, conservação dos recursos fitogenéticos, incentivos às produções agrícolas mais sustentáveis, surgimento de novos nichos de mercado agrícola, associados à produção orgânica e de negação aos produtos de origem transgênica, esta cultura é vista como uma alternativa para viabilizar as pequenas propriedades rurais. Este cenário tem levado algumas instituições a investirem em pesquisas, na busca de resolver e/ou minimizar os principais gargalos tecnológicos e organizacionais gerados por essa histórica desconsideração.

A mandioca ocupa a terceira posição de cultura mais importante, como fonte de calorias do mundo, dentre o grupo das culturas alimentícias básicas, que inclui o arroz e o milho (FAO, 2012). O continente africano lidera a produção de mandioca, representando 55,8% do volume total que é produzido, seguido do continente asiático com 30,4% e o americano com 13,6%. O Brasil é o segundo maior produtor mundial de mandioca com 10% do volume total de produção, perdendo apenas para a Nigéria que produz 20,8%. A safra brasileira de 2011 foi de 25,35 milhões de toneladas, em uma área plantada de 1,73 milhão de hectares (IBGE, 2011).

Pode ser amplamente utilizada na alimentação humana, na forma de raízes cozidas, fritas e/ou processadas de outras formas (LANCASTER *et al.*, 1982), como sua transformação em tapioca e farinhas (OBOH & ELUSIYAN, 2007). A farinha e o amido de mandioca são os principais produtos de interesse à indústria, sendo

oamido e seus derivados utilizados em produtos tanto para a alimentação humana e animal, quanto para outros fins industriais, tais como: alimentos embutidos, embalagens, colas, mineração, têxtil e farmacêutica (CARDOSO & SOUZA, 2002). Mais da metade do amido de mandioca produzido no Brasil é utilizado por indústrias alimentícias na forma nativa do amido, destacando-se as indústrias de biscoitos, iogurtes, panificação, chocolates e bombons, conservas entre outras (CEREDA *et al.*, 2001). Além disso, boa parte da mandioca de “mesa” é consumida na forma *in natura* e já vem sendo comercializada nas formas pré-cozida e congelada.

Apesar de competir com os cereais, a mandioca como matéria-prima para processos industriais é uma das principais fontes amiláceas no mundo (CEREDA *et al.*, 2001). Tal fato está associado à grande capacidade adaptativa desta espécie, especialmente em regiões com déficits hídricos e solos pobres, condições nas quais muitos cereais não apresentam bom desenvolvimento (NASSAR *et al.*, 2008).

### 1.3 GERMOPLASMA E DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Manihot esculenta* CRANTZ

A espécie apresenta uma ampla diversidade genética, concentrada principalmente na América Latina e Caribe. Diversidade genética que foi resultado da facilidade de polinização cruzada da espécie, de sua alta heterozigosidade e da deiscência abrupta dos frutos, sendo a maioria das variedades nativas selecionadas naturalmente, muitas vezes pelos próprios agricultores (FUKUDA & SILVA, 2002). Por ser uma cultura perene e devido à sua rusticidade pode ser mantida *on farm*, constituindo bancos de germoplasma. Como a mandioca é cultivada em quase todo o território brasileiro é suposto que apresenta uma alta variabilidade genética. No entanto, a maior parte desta ainda não foi utilizada em programas de melhoramento genético. Além disto, pelo fato dessas variedades terem sido cultivadas e sofrerem seleções ao longo do tempo pelos agricultores, pode haver variedades com características de interesse agrônomo e industrial no âmbito das pequenas propriedades, as quais ainda não foram identificadas e introduzidas em bancos de germoplasma (SILVA *et al.*, 2002). Segundo Hershey (1988) esta diversidade genética ocorreu basicamente, a partir da seleção natural ocorrida durante o processo de evolução na pré e pós-domesticação da espécie, conservando genes de interesse agrônomo, adaptados a diferentes agroecossistemas e para diferentes formas de uso, resultando numa ampla diversidade de materiais genéticos. Nesse

contexto, as populações tradicionais (e.g. pequenos produtores familiares) desempenham papel relevante na conservação da agrobiodiversidade, por associarem demandas sociais, uso sustentável dos ecossistemas e conservação de recursos genéticos (ALLEM, 1994). Por sua vez estes materiais podem ser perpetuados pela reprodução vegetativa, ou ainda utilizados na obtenção de novos materiais via reprodução sexual (KERR & CLEMENT, 1980; MARTINS, 1994). Por outro lado sabe-se que as espécies silvestres de *Manihot* possuem grande reservatório de genes úteis para serem transferidos para os cultivares comerciais, mas estas têm sido pouco utilizadas nos programas de melhoramento genético, devido à elevada heterozigose, que leva a produção de populações híbridas que segregam para inúmeras diferentes características (NASSAR, 2000). PEREIRA (2008) comenta que, não se deve negligenciar a importância dos acessos selvagens para os programas de melhoramento genético, porém enfatiza a importância das etnovarietades para os melhoristas vegetais como sendo um rico reservatório genético, que pode ser útil no melhoramento genético de mandioca para a transferência de caracteres genéticos de interesse agrônomo para as variedades comerciais. Segundo PERONI & MARTINS (2004) a variabilidade genética vegetal mantida *on farm* (e.g. quintais, roçados e sistemas agroflorestais) e *in situ* (e.g. florestas e capoeiras), associada ao processo de seleção sociocultural contínua realizada pelos agricultores locais no decorrer da história da agricultura, promoveu a etnoconservação de algumas espécies alimentares, entre elas a mandioca. Sendo assim as etnovarietades colecionadas em bancos e coleções de germoplasma possuem potencial para serem usadas de forma direta, como variedades comerciais após seleção criteriosa, ou empregadas nos programas de melhoramento, visando à geração e seleção de novos cultivares. No entanto, estes acessos necessitam estar avaliados, pelo menos, quanto aos caracteres botânicos, morfológicos e agrônômicos para os fatores de maior importância e de forma regionalizada.

Por outro lado, a expansão das fronteiras agrícolas e o uso cada vez mais intenso de cultivares melhorados de outras espécies, provocam sensíveis mudanças nos centros de diversificação e como consequência uma valiosa perda de diversificação de germoplasma (erosão genética), sob a forma de espécies silvestres, bem como de variedades tradicionais (EMPERAIRE, 2005), provocados também em outras situações em decorrência do êxodo rural e expansão urbana acelerada (ZUIN *et al.*, 2009). Por este motivo a coleta e o armazenamento, associados à caracterização morfológica, anatômica, botânica, agrônoma e da

análise genética de germoplasma de mandioca pode minimizar o efeito desta erosão genética (ZUIN *et al.*, 2009), podendo-se acrescentar a necessidade de caracterização metabólica (i.e. amido e suas frações, carotenóides e outros metabólitos secundários) que determinem outras potencialidades de utilização alimentar e/ou industrial (tecnológica) e que também podem ser usados como marcadores bioquímicos a identificação e seleção assistida dos diferentes acessos genéticos.

No Brasil, grande parte desta variabilidade de *M. esculenta* encontra-se disponível ao melhoramento genético, concentradas nos principais bancos de germoplasma de mandioca do país, a saber: o Centro Nacional de Pesquisa de Mandioca e Fruticultura (CNPMPF, da Embrapa), o Cenargen (da divisão Recursos Genéticos e Biotecnologia da Embrapa), a Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (Epagri), o Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) e a Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ-USP).

#### 1.4 CONTEXTUALIZAÇÃO DA PROPOSTA EM TELA

A Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina-Epagri, através da Estação Experimental de Urussanga (EEU), situada no Sul do Brasil, mantém um banco de germoplasma de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) com acessos genéticos oriundos de outras instituições de pesquisa do Brasil e internacionais para apoio ao seu programa de melhoramento genético de mandioca. Além destes a empresa agregou em torno de 200 acessos de mandioca de mesa especificamente oriundos de coletas realizadas por seu grupo de pesquisa em diversas localidades do Estado de Santa Catarina, que estavam sendo mantidos *on farm* por pequenos produtores familiares. Esta coleção de trabalho de mandioca de mesa ao longo dos últimos anos tem sido avaliada basicamente através de parâmetros eminentemente agrônômicos (e.g. produção/produtividade, adaptação, resistência às pragas e/ou doenças) e de caracteres morfofisiológicos. Estas avaliações têm evidenciado que há uma grande diversidade de diferentes fenótipos (e.g. tamanho de plantas, distribuição de ramos, tipos foliares, produtividade, resistência aos fatores bióticos, coloração das raízes cruas e/ou cozidas). Ou seja, há uma diversidade genética interessante nestes materiais que tem potencial de ser explorados para seleção e indicação de novas variedades para determinadas regiões de cultivo e/ou de serem utilizados como parentais em cruzamentos para obtenção de novos materiais genéticos. Porém estes diferentes acessos genéticos devem ser devidamente caracterizados em relação a sua

composição amídica para se diagnosticar o verdadeiro potencial individual de cada acesso genético tanto para consumo *in natura*, outras formas alimentares, bem como para exploração das potencialidades de utilização industrial. Portanto, a obtenção e/ou seleção de genótipos de mandioca de mesa em relação a sua composição amídica, bem como de suas frações amilose/amilopectina, além de outros elementos importantes para a nutrição humana (e.g. carotenoides pró-vitamínicos), pode dar um novo enfoque de valorização à cultura da mandioca de mesa como alimento, pela possibilidade de agregação de valor ao produto e também pela possibilidade de obtenção de diferentes produtos a partir da biomassa de determinado acesso genético. Porém, associada a estes aspectos há a necessidade de se desenvolver paralelamente abordagens que possibilitem a multiplicação e conservação daquele germoplasma.

Sendo assim, o objetivo deste estudo foi iniciar um processo de caracterização metabolômica, com ênfase inicial na composição amídica dos acessos genéticos de mandioca de mesa que estão depositados no banco de germoplasma da Epagri, como forma de agregar as diferentes formas analíticas de avaliação utilizadas neste estudo, bem como do conjunto de informações obtidas na avaliação de parte dos acessos genéticos do banco de germoplasma, como ferramentas de suporte na orientação e seleção de novas variedades e de potenciais progenitores para cruzamentos futuros, além dos parâmetros, predominantemente agrônômicos utilizados. Assim, estas ferramentas de caracterização metabolômica, aliadas a diversidade genética existente poderão dar um amplo suporte ao programa de melhoramento genético desta cultura, permitindo a ampliação dos parâmetros de avaliação, seja para seleção direta e recomendação de novos materiais de cultivo em relação ao seu real potencial nutritivo para consumo *in natura*, bem como para outras finalidades de cunho industrial, determinando os benefícios e potenciais de uso de cada material e conseqüentemente a necessidade de manutenção e conservação dos recursos genéticos existentes. Além do que estas informações poderão também estar associadas a formas de agregação de valor aos produtos a serem eventualmente produzidos por pequenos produtores familiares.

Neste contexto no trabalho em tela foram desenvolvidos e/ou validados protocolos passíveis de utilização como ferramentas auxiliares nos trabalhos de caracterização, identificação e seleção de acessos genéticos de mandioca de mesa. Desta forma foram analisados por diferentes métodos analíticos típicos de uma plataforma metabolômica (i.e. UV-vis, DRX e ATR-FTIR), associados à ferramentas

quimiométricas (PCAs e *clusters*) o amido e suas frações (amiloze e amilopectina) de 40 acessos genéticos de mandioca de mesa. Além destas análises, os acessos foram ainda caracterizados quanto ao teor de amiloze, diâmetro dos grânulos, poder de inchamento e índice de cristalinidade. O conjunto de dados e informações gerados em relação às diferentes abordagens adotadas para caracterizar o amido e suas frações nos diferentes acessos genéticos encontram-se descritos no Capítulo 1. No capítulo 2 estão descritos os resultados que foram obtidos no desenvolvimento e/ou validação de diferentes abordagens para otimização dos processos relacionados à cultura e conservação de germoplasma *in vitro* para esta espécie, através do desenvolvimento de protocolos de micropropagação (produção de ramos matrizes em condições semi-assépticas, desinfecção/isolamento de explantes, multiplicação/enraizamento *in vitro* e aclimação de microplantas), bem como sistemas que permitam a conservação de germoplasma em condições axênicas, entre estes, métodos baseados na limitação do crescimento *in vitro* (e.g. encapsulamento de explantes, meios de cultura com altas concentrações de sacarose) e métodos de criopreservação, que estão descritos no capítulo 2 deste trabalho.

Resumidamente a análise conjunta dos dados de caracterização físico-química do amido dos diferentes acessos genéticos indica a existência de constituições amídicas significativamente distintas e peculiares a cada acesso genético. A utilização de análises quimiométricas (PCAs e *clusters*), associadas aos dados obtidos permitiu distinguir e/ou agrupar os acessos genéticos avaliados de acordo com suas peculiaridades físico-químicas e conseqüentemente de seu potencial de uso alimentar e/ou aplicação industrial.

Tomados em conjunto os resultados gerados no presente trabalho, referentes à caracterização físico-química do germoplasma contribuíram para gerar informações que podem ser empregadas como ferramentas de apoio ao programa de melhoramento genético de mandioca de mesa, através do desenvolvimento de ferramentas que podem promover e facilitar os trabalhos de melhoramento por mecanismos de seleção assistida. Paralelamente a otimização dos processos de cultura e conservação *in vitro* desenvolvidos, possibilitarão alternativas de salvaguardar a diversidade genética que se encontra nos bancos de germoplasma, bem como de materiais genéticos ainda desconhecidos, que eventualmente estão conservados *on farm* por pequenos produtores familiares. Desta forma, preservando importantes fontes de recursos fitogenéticos de uma espécie historicamente negligenciada pela pesquisa, mas que se apresenta atualmente como uma excelente

alternativa para alimentação em função de suas características nutricionais e nutracêuticas (i.e. amido e compostos funcionais como os carotenóides), além de ser também um substituto potencial de algumas espécies também produtoras de amidos, porém transgênicas, que tradicionalmente são utilizadas na alimentação humana, bem como pelas potencialidades de aplicação industrial que se mostram possíveis em razão da diversidade bioquímica que se apresenta.

## 2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEM, A.C. **The origin of *Manihot esculenta* Crantz (Euphorbiaceae)**. Genetic Resource and Crop Evolution, v.41, p. 133-150, 1994.

ALLEM, A.C. The Origins and Taxonomy of Cassava, In: R.J. Hillocks, J.M. Thresh and A.C. Bellotti (Eds), **Cassava: Biology, Production and Utilization**. CABI Publishing, p. 1-16, 2002

BOLHUIS, G.G. The toxicity of cassava roots. **Netherlands Journal of Agricultural Science**.v.2, p.176-185, 1954.

CARDOSO, E. L.; SOUZA, J. S. Importância, potencialidades e perspectivas do cultivo da mandioca na América Latina. In: CEREDA, M. P. (Coord.). **Cultura de tuberosas amiláceas latino-americanas**. São Paulo: Fundação Cargill (Série Culturas de tuberosas amiláceas latino-americanas), v.1, p. 29-47, 2002.

CEREDA, M. P., FRANCO, C. M. L., DAIUTO, E. R., DEMIATE, I. M., CARVALHO, L. J. C. B., LEONEL, M. **Propriedades gerais do amido**. Serie: culturas de tuberosas amiláceas latino-americanas, v. 1. São Paulo, Brasil: Fundação Cargill, 2001.

EMPERAIRE, L. A biodiversidade agrícola na Amazônia brasileira: recurso e patrimônio. **Revista do Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional**, v. 32, p. 23-35, 2005.

FAO.(Food and Agriculture Organization of the United Nations).Rome, Italy. Disponível em: <http://www.fao.org/ag/agp/agpc/gcnds/>. Acesso em: 10/05/2013.

FUKUDA, C.; OTSUBO, A. A. Cultivo da mandioca na região centro sul do Brasil. EMBRAPA Mandioca e Fruticultura. **Sistemas de produção**, 2003.

FUKUDA, W.M.G. & SILVA, S.O.E. Melhoramento de mandioca Brasil. In: CEREDA, M.P. (Org.). **Agricultura: Tuberosas amiláceas latino americanas**. São Paulo, **Fundação Cargil** (1ª Ed.), p. 242-257. 2002.

HERSHEY, C. H. Cassava breeding-CIAT headhunters. In: HOWELER, R. H.,

KAWANO, K. (Ed.) Cassava Breeding and Agronomy Research in Asia, 1988,

Bangkok. **Proceedings...** Cali: Centro Internacional de Agricultura Tropical, 1988.

IBGE (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA). Produção Agrícola Municipal, 2011. Disponível em: [http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/pam/2011/PAM2011\\_Publicacao\\_completa.pdf](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/pam/2011/PAM2011_Publicacao_completa.pdf). Acesso em: 08/05/2013.

KERR, W.E.; CLEMENT, C.R. Práticas agrícolas de conseqüências genéticas que possibilitaram aos índios da Amazônia uma melhor adaptação às condições ecológicas da região. **Acta Amazônica**, v.10, p.251-261, 1980.

LANCASTER, P.A.; INGRAM, J.S.; LIM, M.Y.; COURSEY, D.G. Traditional cassava based foods: Survey of processing techniques. **Economy Botany**, vol. 36 (1): 12-45. 1982.

MARTINS, P.S. Biodiversity and agriculture: patterns of domestication of Brazilian native plants species. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.66, p.219-226, 1994.Suplemento 1.

MURRAY, A. Cassava presentation, 2010. Disponível em: <<http://www.morris.umm.edu>>. Acesso em: 10/08/2013.

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

NASSAR, N., ORTIZ, R. Melhorar a mandioca e alimentar os pobres. **Scientific American Brazil**, p. 72-77, 2010.

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

OBOH, G. & ELUSIYAN, C.A. Changes in the nutrient and anti-nutrient content of micro-fungi fermented cassava flour produced from low- and medium-cyanide variety of cassava tubers. **African Journal of Biotechnology**, vol. 6 (18): 2150-2157. 2007.

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

OLSEN, K. M.; SCHAAL, B. A. Evidence on the origin of cassava: Phylogeography of *Manihot esculenta*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, p. 5586–5591, 1999.

PEREIRA, K.J.C. **Agricultura tradicional e manejo da agrobiodiversidade na Amazônia Central; um estudo de caso nos roçados de mandioca das Reservas de Desenvolvimento Sustentável Amaná e Mamirauá, Amazonas**. Tese (Doutorado em Ecologia Aplicada) Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Centro Nacional de Energia Nuclear na Agricultura, ESALQ/CENA. Piracicaba, 2008. 222p.

PERONI, N.; MARTINS, P. S. Influência da dinâmica agrícola itinerante na geração de diversidade de etnovarietades cultivadas vegetativamente. **Interciencia**. Caracas, v. 25, n. 1, p. 22-29, 2004.

ROGER, D.J; APPAN, S.G; *Manihot* and *Manohotoides* (Euphorbiaceae). **Flora Neotropics**.v.13, p.1-272, 1973.

SILVA, R. M., et al. Variabilidade genética de etnovarietades de mandioca. In: CEREDA, M. P. (Coord.). *Cultura de tuberosas amiláceas latino-americanas*. São Paulo: Fundação Cargill (Série Culturas de tuberosas amiláceas latino-americanas), v. 1, p. 13-56, 2002.

ZUIN, G.C.; VIDIGAL FILHO, O.S.; KVITSCHAL, M.V.; VIDIGAL, M.C.G.; COIMBRA G.K. Divergência genética entre acessos de mandioca de mesa coletados no município de Cianorte, região Noroeste do Estado do Paraná. **Semina**. Ciências Agrárias (Online), 30: 21-30. 2009.



### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVOS GERAIS

- Determinar as características físico-químicas, morfológicas e funcionais da fração amídica de raízes de acessos genéticos de mandioca de mesa (*M. esculenta*), do banco de germoplasma (BAG) mantido pelo programa de melhoramento genético da Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina - Estação Experimental de Urussanga EEU-Epagri;
- Desenvolver sistemas otimizados de cultura e conservação *in vitro* de genótipos de aipins (*M. esculenta*) através da aplicação de diferentes abordagens biotecnológicas associadas às técnicas de cultura de células e tecidos vegetais;

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Quantificar e caracterizar os constituintes amiláceos (amilose e amilopectina) das raízes dos acessos genéticos de mandioca de mesa em estudo;
- Caracterizar por microscopia eletrônica de varredura (MEV) a morfologia e granulometria dos grãos de amido dos acessos genéticos de mandioca de mesa;
- Determinar o índice de cristalinidade dos grânulos de amido dos acessos genéticos por difração de Raios-X (DRX);
- Caracterizar a fração amídica (amilose e amilopectina) através dos perfis espectrais de infravermelho (ATR-FTIR: Espectroscopia vibracional de infravermelho médio com transformada de Fourier)
- Desenvolver modelos descritivos e de classificação, através de ferramentas quimiométricas (PCAs e *Clusters*) associadas a bioinformática, aplicadas a interpretação dos resultados obtidos as variáveis estudadas (características físico-químicas do amido, dados de infra-vermelhoe de difração de raios-X) que possibilitem a geração de uma ferramenta de discriminação eficiente para determinar a variabilidade química, auxiliando na identificação e seleção de acessos genéticos de interesse, no contexto bioquímico e que auxiliem também na interpretação dos resultados, permitindo a associação destas variáveis com as propriedades funcionais de interesse.

- Otimizar os protocolos de isolamento, de multiplicação, enraizamento *in vitro* e de aclimação para mandioca de mesa (*M. esculenta*);
- Desenvolver protocolos eficientes de conservação/preservação de germoplasma *in vitro* para mandioca de mesa (*M. esculenta*), através da utilização de metodologias de limitação/restricção do crescimento *in vitro* e criopreservação;

**CAPÍTULO 1**  
**CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE AMIDOS DE**  
**ACESSOS GENÉTICOS DE MANDIOCA DE MESA (*Manihot***  
***esculenta* CRANTZ)**



## 1. INTRODUÇÃO

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) ocupa atualmente a posição da terceira cultura mais importante como fonte de calorias do mundo, dentre o grupo das culturas alimentícias básicas, que inclui o arroz e o milho (FAO, 2012). A parte mais importante da planta é a raiz, rica em fécula (i.e. amido) utilizada na alimentação humana e animal ou como matéria-prima para diversas indústrias.

A fração amídica é formada basicamente por dois polissacarídeos, i.e., amilose (formada por unidades de D-glucose unidas por ligações glicosídicas  $\alpha$ -(1, 4), originando uma cadeia linear (RIBEIRO & SERAVALLI, 2004; LIU, 2005) e amilopectina (derivada de ligações C1→C4 de resíduos de D-glucose em conformação  $\alpha$  na cadeia principal, com ramificações também em conformação  $\alpha$ - em C6) (WALTER, SILVA & EMANUELLI, 2005). A relação de conteúdos destas duas macromoléculas mostra-se variável de acordo com a fonte botânica e até mesmo entre acessos de uma mesma espécie, o que irá determinar características específicas à pasta de amido (CEREDA *et al.*, 2001). Amilose e amilopectina diferem quanto ao grau de hidratação e ao comportamento hidrotérmico sob aquecimento, evidenciando propriedades funcionais peculiares aos diversos tipos de amidos de interesse industrial (CEREDA *et al.*, 2001).

Para atender às exigências dos múltiplos mercados consumidores é necessário caracterizar o amido, o que envolve um grande número de determinações analíticas. A análise dos resultados obtidos, o modo como as características avaliadas se correlacionam e a explicação para tais fatos ainda é objeto frequente de estudos, visando uma maior exploração das potencialidades desta biomassa. Além disto, estudos que visam à caracterização estrutural de polissacarídeos (fração amídica) podem servir futuramente para a rápida identificação de acessos de mandioca, ou como um marcador bioquímico para avaliação da diversidade química entre acessos e ao melhoramento genético assistido. Tal aspecto é de interesse, haja vista que grande parte do amido nativo tem uso limitado na indústria por não possuir as propriedades funcionais necessárias para determinados usos específicos. Tal cenário evidencia a importância de pesquisas de caracterização das biomassas de acessos de *M. esculenta*, subsidiando o desenvolvimento de novas aplicações da matéria-prima dessa espécie junto às indústrias alimentícia, farmacêutica e cosmética, por exemplo.

A Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (EPAGRI), através da Estação Experimental de Urussanga,

situada no Sul do Brasil, mantém um banco de germoplasma de mandioca com acessos genéticos oriundos de outras instituições de pesquisa do Brasil e internacionais para apoio ao seu programa de melhoramento genético de mandioca. Além destes, a empresa agregou em torno de duzentos acessos de mandioca de mesa especificamente, oriundos de coletas realizadas por seu grupo de pesquisa em diversas localidades do Estado de Santa Catarina que são conservados *on farm* por pequenos agricultores produtores familiares. Esta coleção de trabalho ao longo dos últimos anos tem sido avaliada com base em parâmetros eminentemente morfofisiológicos e agrônômicos. Contudo, destaca-se a quase total escassez de informações sobre a composição química e o valor nutricional destes acessos. Neste contexto, este estudo objetivou a caracterização físico-química, química e funcional da fração amídica de 40 acessos genéticos de mandioca de mesa, preferencialmente com polpa pigmentada, depositados naquele banco de germoplasma. Sugere-se inicialmente que há diversidade química entre os acessos de *M. esculenta* estudados, indicando uma constituição amídica (e.g. frações amilose/amilopectina) distinta entre estes e conseqüentemente propriedades físico-químicas e funcionais diferentes àquelas biomassas. Neste estudo, análises de componentes principais (PCAs) e *clusters* foram usadas, objetivando a construção de modelos descritivos e de classificação que auxiliem na interpretação dos resultados das variáveis de interesse, permitindo a associação destas com as propriedades funcionais analisadas. Tomados em conjunto, os resultados alcançados são relevantes quanto a aspectos nutricionais e do potencial industrial daquelas biomassas, podendo agregar-lhes valor e a seus produtos derivados, além do que configuram a necessidade de caracterização e de manutenção desta diversidade para fins de seleção de eventuais materiais genéticos para determinados fins, bem como para sua utilização em programas de melhoramento genético direcionado.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 MATERIAL VEGETAL – SELEÇÃO DOS ACESSOS GENÉTICOS

Foram utilizadas amostras representativas de raízes de 40 acessos genéticos de mandioca de mesa (*M. esculenta*) colhidas nas safras 2010/2011 e 2011/12 (mistura de ~3 Kg de raízes de diferentes plantas de cada acesso genético), produzidas em Argissolo sob manejo convencional na área de produção da Estação Experimental da Empresa de Pesquisa e Extensão Agropecuária de Santa Catarina (Epagri) em Urussanga (Latitude 28°31'18'', Longitude 49°19'03''), SC, Brasil. Para a definição dos 40 acessos alvo do presente estudo foram considerados aqueles que apresentavam determinada importância econômica, social, de preservação, bem como a geração de conhecimento em relação a materiais genéticos ainda desconhecidos. Desta forma, selecionaram-se materiais que já estavam sendo avaliados em ensaio de pesquisa participativa conduzido pela Epagri em diversas regiões do Estado de Santa Catarina, materiais genéticos com polpa pigmentada e alguns materiais genéticos que vinham sendo mantidos *on farm* por pequenos produtores familiares, que foram coletados pela Epagri e inseridos em seu banco de germoplasma. Para identificação dos materiais aqui estudados foi mantida a mesma formatação (numeração e/ou código) utilizado pela Epagri na identificação de sua coleção de trabalho de mandioca de mesa, que segue: 01; 03; 07; 09; 10; 11; 21; 23; 25; 31; 46; 54; 57; 59; 65; 74; 75; 79; 82; AO-13; AO-17; AO-40; AO-48; AO-49; AO-50; AO-53; AO-54; AO-55; AO-72; AO-79; AO-80; AO-85; AO-89; AO-90; AO-94; AO-97; AO-102; AO-109; AO-118 e AO-121.

Após a colheita, as raízes (mistura de 3 Kg) foram descascadas integralmente (retirada total do felema e entrecasca), lavadas, acondicionadas em embalagens de polietileno, armazenadas à -20°C e transportadas ao laboratório onde foram mantidas sob as mesmas condições até a preparação das amostras para as análises.

### 2.2 ISOLAMENTO E RENDIMENTO DE EXTRAÇÃO DO AMIDO

Para obtenção do amido, amostras (~500 g) de raízes foram moídas com o auxílio de um ralador manual. À massa obtida foram acrescentados 2 litros de água destilada/deionizada e realizada a suspensão das amostras por agitação. Em seguida, as suspensões foram filtradas, utilizando-se um sistema formado por duas peneiras (60 mesh)

sobrepostas e um elemento filtrante (tecido *voil*) em dupla camada. A biomassa retida foi coletada e lavada com água destilada, em número de vezes suficiente à obtenção de filtrado incolor, i.e., desprovido de amido. O filtrado foi transferido a um béquero de 5 litros e mantido em repouso durante 5 horas para decantação do amido. Subsequentemente, o sobrenadante foi removido e o amido depositado ressuspenso em 2 litros de água destilada/deionizada, permanecendo nesta condição durante 12 horas (*overnight*), para obtenção de amido com maior grau de pureza. Na sequência, o sobrenadante foi totalmente drenado e a massa de amido depositada no fundo dos béqueres foi recolhida, transferida a bandejas de alumínio e seca em estufa com circulação de ar a 45°C durante 24 horas. As amostras secas foram pesadas, seguidas pelo cálculo de rendimento de extração com base em peso seco. As amostras de amidos correspondentes a cada acesso, após secagem e pesagem, foram trituradas em moinho de café (Cadence MDR 301), padronizadas à granulometria de 60 *mesh*, acondicionadas em frascos herméticos e armazenadas em local fresco, seco e ao abrigo da luz para posterior análise.

## 2.3 PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E FUNCIONAIS

### 2.3.1 Teor de amilose

O teor de amilose foi determinado para os 40 acessos, colhidos nas safras 2010/2011 e 2011/2012, de acordo com o protocolo proposto pela Megazyme<sup>®</sup> (AMYLOSE/AMYLOPECTIN, 2006), utilizando-se o kit comercial daquela empresa à determinação dos conteúdos de amilose e amilopectina, baseado na precipitação da amilopectina via concanavalina.

### 2.3.2 Poder de Inchamento do amido – PI (%)

A determinação do poder de inchamento do amido (PI) dos acessos em estudo foi realizada de acordo com o método descrito por Leach, McCowen & Schoch (1959), com modificações (ADEBOOYE & SING, 2008; MARCON, AVANCINI & AMANTE, 2007; ARYEE *et al.*, 2006). Amostras (500 mg) foram transferidas para tubos *falcon* de 50 ml (com peso conhecido), adicionadas de água destilada até o volume de 40 ml, agitadas (*vortex*) e incubadas em banho-maria à 60°C, durante 60 min. e agitação constante. Na sequência, os tubos foram resfriados em temperatura ambiente e centrifugados (2500 rpm, 20 min.). O

sobrenadante foi descartado e a massa do resíduo (gel) juntamente com o tubo *falcon* foi determinada. O poder de inchamento dos amidos foi estimado através da seguinte equação:

$$PI(\%) = \frac{PG}{PA} \times 100$$

Onde: PI (%) = Poder de Inchamento do amido

P<sub>G</sub> (mg) = Peso do gel

P<sub>A</sub> (mg) = Peso da amostra de amido com a umidade corrigida

## 2.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

Amostras de amido previamente desidratadas em estufa (45 °C, 24 h) foram comparadas quanto ao tamanho e forma dos grânulos por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Para tal, amostras (~10 mg) foram depositadas em fitas de carbonodupla face fixadas sobre suportes (*stubs*) de alumínio e recobertas com uma fina camada de ouro (espessura de 350 Å, metalizador Polaron E5001 *coating system*). As micrografias foram capturadas em microscópio eletrônico de varredura modelo JEOL JSM-6390LV (JEOL Ltda. Tóquio, Japão), operando na faixa de energia de 10 Kv e magnificação de 500x a 2000x (Laboratório Central de Microscopia Eletrônica – LCME, Universidade Federal de Santa Catarina).

### 2.4.1 Diâmetro e forma dos grânulos de amido

O tamanho dos grânulos foi mensurado diretamente a partir das micrografias com magnificação de 2000x (5 medidas por imagem), com o auxílio de ferramenta de régua existente no próprio software de captura das imagens e/ou com auxílio do software ImageJ®. As formas foram observadas nas micrografias com magnificações de 500x e de 2000x (**Figura 14**).

## 2.5 DIFRAÇÃO DE RAIOS-X (DRX)

A avaliação da cristalinidade dos grânulos foi realizada em difratômetro de raios-X (X-ray Powder X`Pert PRO Multi-Purpose PanAnalytical, Holanda) - Laboratório de Difração de Raios X (LDRX)

- Universidade Federal de Santa Catarina. Para tal, amostras de amido, dos acessos genéticos em estudo colhidos na safra 2010/2011, foram compactadas em suportes específicos e escaneadas com radiação  $\text{Cu K}\alpha$  ( $\lambda = 1,5418\text{\AA}$ ), atuando na faixa angular  $2\theta$  de  $4-50^\circ$ . A variação  $2\theta$  foi empregada com um passo de  $0,334^\circ$  e intervalo de tempo de 10 segundos, operando em condições de 45 kV e 40 mA.

### 2.5.1 Índice de Cristalinidade (IC) da fração amídica

O índice de cristalinidade relativa (IC) foi determinado como proposto por Hayakawa *et al.*, (1997), com modificações, sendo a linha de base dos picos do difratograma definida a partir do perfil obtido de uma amostra de amido de mandioca completamente amorfizada. A amostra de amido completamente amorfizada foi obtida via trituração mecânica, utilizando moinho de esferas de alta energia (SPEX 8000 - Laboratório de Síntese e Caracterização dos Materiais LSCM – Universidade Federal de Santa Catarina) durante 90 minutos. O IC foi definido como a razão entre a área da região cristalina ( $A_c$ ) e a área total coberta pela curva, composto pela área da região cristalina ( $A_c$ ) e a área da região amorfa ( $A_a$ ), conforme a equação:

$$IC(\%) = A_c / (A_c + A_a) \times 100$$

Para o cálculo da integral das áreas de região amorfa ( $A_a$ ) e cristalina ( $A_c$ ) foi utilizado o software *Origin* (versão 7.0, Microcal, Inc., Northampton, MA, USA). Em complementação à estimativa da cristalinidade dos amidos via análise de DRX, esta variável também foi calculada através dos espectros de ATR-FTIR, conforme previamente descrito por Rubens *et al.*, (1999) e Sevenou *et al.*, (2002).

## 2.6 ESPECTROSCOPIA VIBRACIONAL DE INFRAVERMELHO MÉDIO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (ATR-FTIR)

Espectros de ATR-FTIR dos amidos dos acessos genéticos em estudo, colhidos na safra 2010/2011, foram coletados em equipamento Bruker IFS-55 (Modelo Opus v. 5.0, Bruker Biospin, Germany), equipado com detector DGTS e sistema de reflexão única (ângulo de  $45^\circ$  de incidência), com acessório de atenuação da refletância total ATR (goldengate). Coletaram-se espectros de 5 replicatas/amostra, em janela espectral de 4000 a 400  $\text{ondas.cm}^{-1}$ , com resolução de 4  $\text{ondas.cm}^{-1}$ .

O processamento dos espectros utilizou o programa Essential FTIR (v.1.50.282) e considerou a delimitação da janela espectral de interesse (3000-600 ondas.cm<sup>-1</sup>), a correção da linha de base, a normalização e a otimização da relação sinal/ruído (*smoothing*). Subsequentemente, o conjunto de dados dos espectros processados foi submetido à análise estatística multivariada, através da aplicação dos métodos de componentes principais (PCAs) em *scripts* implementados em linguagem R.

## 2.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados submetidos à avaliação estatística foram coletados, sumarizados e submetidos à análise de variância simples (ANOVA), com separação de médias pelo teste de Tukey, ao nível de significância de 5% ( $p \leq 0,05$ ) e em alguns casos específicos complementados pelo teste de Skott Knott (5%). Os cálculos foram realizados com o auxílio dos *softwares* STATGRAPHICS Centurion XVI.I e StatPlus 2009. Todos os procedimentos foram realizados, no mínimo, em triplicata ( $n=3$ ). Os dados espectrais de ATR-FTIR, bem como das variáveis físico-químicas detectadas foram submetidos também à análise estatística multivariada, via aplicação dos métodos de componentes principais (PCAs) e de agrupamentos (*clusters*) com a utilização de *scripts* implementados em linguagem R (v.2.15.2) e dos pacotes Chemospec e Hyperspec.



### 3. RESULTADOS

#### 3.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E PROPRIEDADES FUNCIONAIS DOS AMIDOS

##### 3.1.1 Rendimento de extração de amido (% m/m)

Os rendimentos na extração de amido dos acessos genéticos colhidos na safra 2010/2011 variaram de 40,08% e 63,75% nos acessos 07 e AO-109 respectivamente, enquanto que a média geral de rendimento dos acessos foi de 50,18%. Na safra 2011/2012, os rendimentos de extração daquele polissacarídeo foram semelhantes, variando entre 40,54% e 62,36% nos acessos 74 e 57 respectivamente, com média geral de 53,46% (**Tabela 1**).

##### 3.1.2 Teor de amilose

Os dados referentes ao teor de amilose (**Tabela 1**) demonstram que os conteúdos de amilose presentes nas raízes dos acessos genéticos em estudo mostraram-se significativamente distintos. De fato, uma grande amplitude nos conteúdos de amilose entre os acessos estudados foi detectada, e.g., para os amidos dos acessos colhidos na safra 2010/2011 os teores de amilose variaram de 9,51% (acesso AO-94) a 21,43% (acesso AO-53). Nos acessos colhidos na safra 2011/2012 a variação ficou entre 11,33% e 22,84% para os acessos AO-13 e AO-89, respectivamente.

**Tabela 1:** Propriedades físico-químicas de amidos dos acessos genéticos de mandioca de mesa (*M. esculenta*). Os valores de rendimento de extração (%) e teor de amilose (%) referem-se às safras de 2010/2011 e 2011/2012, enquanto o tamanho do grânulo ( $\mu\text{m}$ ) e poder de inchamento (%) à safra 2010/2011.

Acessos Genéticos	Rendimento de extração (%)		Teor de amilose (%)		Tamanho do grânulo ( $\mu\text{m}$ )	Poder de inchamento (%)
	Safra 2010/2011	Safra 2011/2012	Safra 2010/2011	Safra 2011/2012		
01	52,11	50,15	18,09 e	16,75 e	12,97 b	8,83 d
03	45,23	43,66	14,27 i	15,91 fg	11,99 c	7,80 f
07	40,08	43,01	10,62 k	13,83 hi	13,76 a	8,72 d
09	49,30	50,69	16,82 f	16,87 e	13,61 a	9,35 c
10	47,42	50,23	17,47 e	14,62 h	13,52 a	9,88 b
11	48,53	53,31	18,02 e	17,49 d	11,40 d	7,69 fg
21	52,29	54,68	13,46 i	16,38 f	12,20 c	8,50 e
23	44,30	54,70	12,99 j	14,74 h	13,19 b	9,43 c
25	41,97	47,57	14,97 i	17,76 d	10,82 de	9,07 cd
31	48,90	56,84	15,76 h	15,85 fg	10,26 e	10,21 b
46	52,17	51,76	16,39 fgh	15,88 fg	10,05 e	10,65 ab
54	49,34	54,97	13,19 i	14,76 h	15,03 a	7,52 fg
57	54,54	62,36	16,32 fgh	16,03 fg	9,82 ef	8,88 d
59	52,96	60,19	14,36 i	15,92 fg	14,49 a	8,06 f
65	44,20	51,17	16,55 fg	15,77 g	13,78 a	8,82 d
74	42,51	40,54	16,59 fg	17,14 e	8,64 g	9,53 bc
75	46,15	54,39	16,70 f	14,73 h	12,35 bc	8,43 ef
79	52,98	55,45	14,45 i	16,41 f	12,47 bl	10,35 b
82	51,49	53,65	12,04 k	14,48 hi	11,49 cd	12,37 a
AO-13	51,76	47,75	13,24 i	11,33 k	14,42 a	7,24 g
AO-17	51,26	52,85	15,70 h	16,72 e	14,08 a	8,62 de
AO-40	59,20	54,00	15,97 h	16,17 fg	12,28 c	8,48 e
AO-48	50,13	55,85	17,18 gh	16,91 e	14,45 a	9,16 c
AO-49	50,48	56,58	15,45 h	14,88 h	14,57 a	8,82 d
AO-50	55,57	53,06	16,30 fgh	15,07 h	12,67 b	7,17 g
AO-53	45,63	52,46	21,43 a	21,86 b	11,14 d	9,26 c
AO-54	49,53	42,05	15,02 i	16,25 fg	15,43 a	6,85 h
AO-55	55,30	55,32	16,28 fgh	18,00 cd	9,86 ef	8,84 d
AO-72	59,41	57,99	20,25 b	18,31 c	12,08 c	8,81 d
AO-79	48,57	49,12	19,65 c	18,49 c	11,22 d	7,31 g
AO-80	51,40	61,15	19,79 c	15,95 fg	14,31 a	6,87 h
AO-85	50,05	53,86	16,63 fg	16,95 e	13,25 b	7,16 g
AO-89	56,26	54,46	18,55 d	22,84 a	12,89 b	6,80 h
AO-90	55,50	57,71	16,13 gh	14,21 hi	13,85 a	7,73 f
AO-94	49,84	58,05	9,51 l	11,73 j	13,55 a	7,85 f
AO-97	53,64	54,48	16,14 gh	16,70 e	15,06 a	7,90 f
AO-102	47,24	51,25	11,53 k	12,43 i	13,43 a	8,57 e
AO-109	63,75	59,72	18,00 e	16,67 e	10,84 de	7,01 gh
AO-118	43,24	60,45	19,55 c	18,31 c	13,22 b	8,27 f
AO-121	42,36	55,78	17,57 de	16,44 ef	11,93 c	9,28 c

<sup>z</sup>Valores representam a média de pelo menos três experimentos independentes. Valores seguidos pela mesma letra na coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

### 3.1.3 Poder de inchamento (PI) (% m/m)

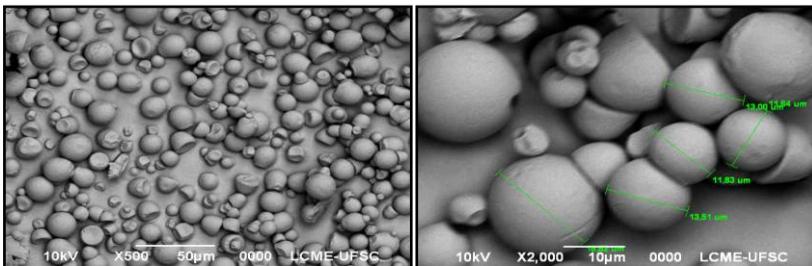
Diferenças significativas no poder de inchamento dos amidos dos acessos genéticos em estudo indicam alterações na organização intramolecular dos grânulos de amido. Foram detectados valores de PI entre 6,80% a 12,37% identificados nos acessos AO-89 e 82, respectivamente (**Tabela 1**).

Adicionalmente, a aplicação do teste de Skott Knott (5%) aos valores de poder de inchamento obtidos, revelou a formação de 5 grupos distintos (dados não apresentados). Sendo que o acesso 82 (12,37%) foi diferente dos demais. Esta informação foi muito semelhante às obtidas através do teste Tukey ( $p \leq 0,05$ ), onde este mesmo acesso se diferenciou significativamente em relação aos demais.

### 3.1.4 Diâmetro e forma dos grânulos

Quanto ao formato dos grânulos de amido dos acessos genéticos as micrografias dos detalhes morfológicos, representadas na **Figura 1**, revelaram formas arredondadas, ovaladas e convexas bicôncavas muito semelhantes e homogêneas entre as amostras, com características típicas dos amidos da espécie. A variável tamanho de grânulos se mostrou significativamente distinta (**Tabela 1**) entre os diferentes acessos, sendo possível também observar certa proporção de grânulos de amido danificados. Os tamanhos dos grânulos variaram de 8,64  $\mu\text{m}$  (acesso 74) a 15,43  $\mu\text{m}$  (acesso AO-54).

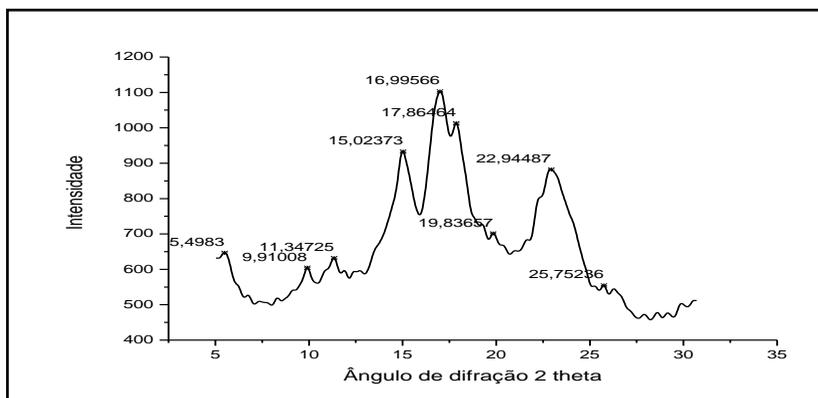
A aplicação do teste de Skott Knott (5%) aos dados relativos ao diâmetro dos grânulos possibilitou a formação de três agrupamentos distintos, a saber: Grupo **a**: acessos com tamanho de grânulo variando entre 15,43 a 12,67  $\mu\text{m}$ ; Grupo **b**: tamanho variando entre 12,47 a 11,13  $\mu\text{m}$  e Grupo **c**: acessos com tamanho variando de 10,84 a 8,64  $\mu\text{m}$ . Esta constatação de certa forma corrobora os resultados obtidos da análise realizada pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ), uma vez que todos os acessos com maior média, identificados como significativamente diferentes dos demais por esta metodologia, também fazem parte do agrupamento (Grupo **a**), identificados pelo teste de Skott Knott.



**Figura 1:** Micrografias de grânulos de amido típicos de raízes de mandioca de mesa (acesso 07) (A) magnificação de 500x evidenciando os detalhes morfológicos e distribuição típica dos grânulos de amido de mandiocas de mesa. (B) Micrografia (2000x) mostrando como foram realizadas as mensurações dos grânulos.

### 3.1.5 Índice de cristalinidade (IC) da fração amídica determinado por difração de raios-X(DRX)

A **Figura 2** ilustra um difratograma de raios-X característico dos acessos genéticos estudados. As amostras de amido de mandioca de mesa analisadas exibiram o padrão de difração caracterizado por duplo sinal de  $2\Theta \approx 17^\circ$  e  $18^\circ$ , em adição a uma intensa reflexão  $2\Theta = 15^\circ$  e algumas reflexões adicionais a  $2\Theta \approx 9,9^\circ$ ;  $11,2^\circ$  e  $22,9^\circ$  (LOPEZ-RUBIO *et al.*, 2008).



**Figura 2:** Típico difratograma de raios-X de amostras de amidos dos acessos genéticos de mandioca de mesa. Os picos nos ângulos de difração 2 theta no difratograma são característicos de polimorfismo tipo A.

Os índices de cristalinidade, mensurados via DRX, obtidos para os 40 acessos genéticos estudados estão apresentados na **Tabela 2**. Os valores variaram entre 36,73% (acesso 21) a 43,06% (acesso 54), sendo que a cristalinidade média amostral foi de 39,84%.

**Tabela 2:** Índice de cristalinidade dos amidos dos acessos genéticos de mandioca de mesa, determinados via difração de raios-X (%) e estimadas pela razão das intensidades de sinais das absorvâncias de 999/1018 (ondas.cm<sup>-1</sup>-ATR-FTIR), referentes à amilopectina e amilose, respectivamente.

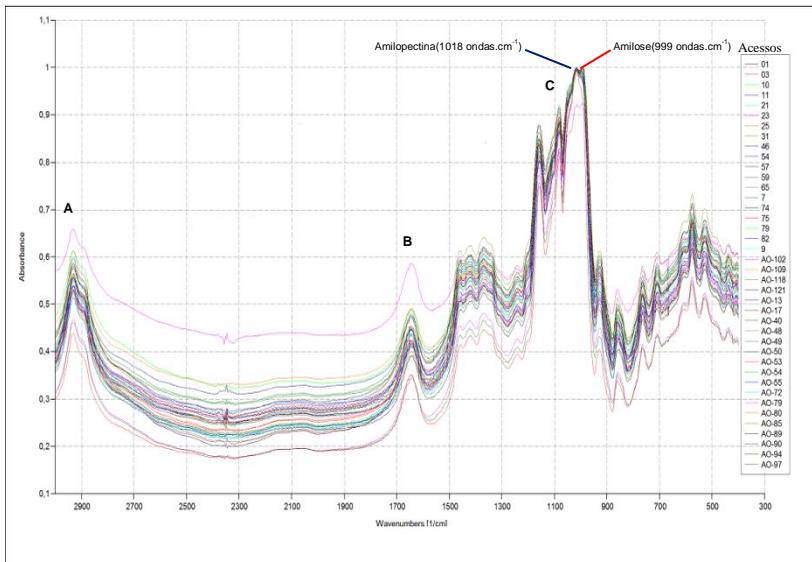
Acessos genéticos	Índice de cristalinidade por DRX (%)	Cristalinidade estimada - razão IR 999/1018 (ondas.cm <sup>-1</sup> )
01	<sup>Z</sup> 41,344 ±2,7923	0,9861
03	41,280 ±2,9951	1,0054
07	40,564 ±0,4991	1,0066
09	37,542 ±2,4458	0,9979
10	41,226 ±2,2283	0,9906
11	38,436 ±2,4397	0,9981
21	36,734 ±2,9703	0,9916
23	41,378 ±0,4540	1,0037
25	39,284 ±2,1622	0,9818
31	35,137 ±2,3355	0,9856
46	37,262 ±2,0748	0,9769
54	43,061 ±1,5866	1,0048
57	42,578 ±1,1992	0,9837
59	41,416 ±0,3109	0,9993
65	39,720 ±0,6046	0,9947
74	39,516 ±1,5841	0,9819
75	39,959 ±0,9513	0,9554
79	40,662 ±1,0517	0,9971
82	41,895 ±0,5948	0,9801
AO-13	39,305 ±0,4967	1,0015
AO-17	39,810 ±1,2073	0,9988
AO-40	40,246 ±0,7843	0,9853
AO-48	40,039 ±1,0636	0,9907
AO-49	39,795 ±0,1756	0,9966
AO-50	40,514 ±0,6378	1,0004
AO-53	38,956 ±0,4788	0,9919
AO-54	38,683 ±0,8059	1,0114
AO-55	41,551 ±0,5431	0,9909
AO-72	39,318 ±0,2468	0,9808
AO-79	40,535 ±1,0155	0,9884
AO-80	39,226 ±0,6276	0,9989
AO-85	39,163 ±1,3281	0,9993
AO-89	38,210 ±0,6826	0,9932
AO-90	38,968 ±1,1864	1,0016
AO-94	40,035 ±0,8835	1,0066
AO-97	40,190 ±0,8532	1,0037
AO-102	40,434 ±0,6249	1,0003
AO-109	41,172 ±1,4983	1,0122
AO-118	39,007 ±2,1383	1,0013
AO-121	39,613 ±0,8327	1,0051

<sup>Z</sup>Valores representam a média±desvio padrão de pelo menos três experimentos independentes (n=3).

### 3.1.6 Espectroscopia vibracional de infravermelho médio com transformada de Fourier (ATR-FTIR)

A análise do perfil espectral de ATR-FTIR (**Figura 3**) das amostras de amido de raízes de *M. esculenta* permitiu identificar que maioria dos sinais de grupamentos dos constituintes químicos das amostras se concentrou na região do *fingerprint* entre 700 a 1700  $\text{cm}^{-1}$ . Esta região foi claramente identificada em todas as amostras. Os perfis espectrais revelaram picos de maior intensidade na faixa espectral de infravermelho entre 1200–950  $\text{ondas.cm}^{-1}$ , região de *fingerprint* de carboidratos (CERNÁ *et al.*, 2003). Adicionalmente, proteínas (1650-1550  $\text{ondas.cm}^{-1}$ , aminas primárias - LAMBERT *et al.*, 2001) e ácidos graxos (1740  $\text{ondas.cm}^{-1}$  e 3000-2800  $\text{ondas.cm}^{-1}$ - SILVERSTEIN, 1994) também foram detectados.

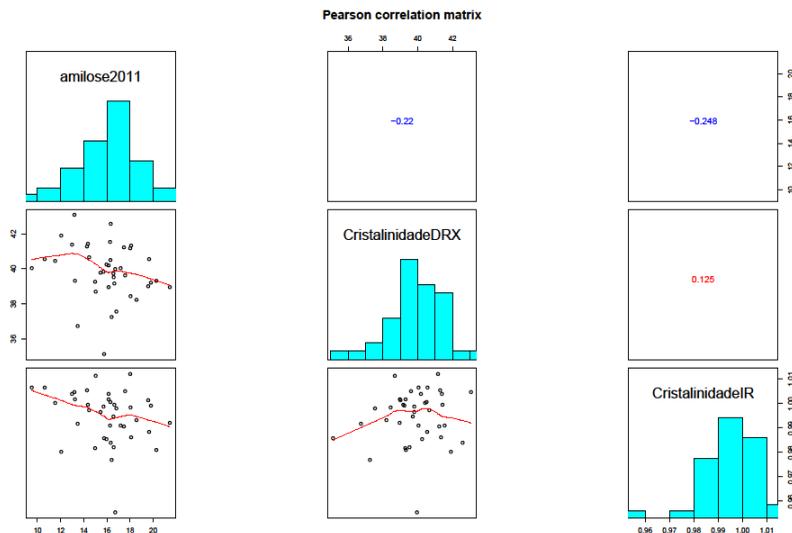
Como esperado, em todas as amostras de amido dos acessos genéticos analisados foram detectadas duas bandas específicas na região de *fingerprint* de carboidratos, i.e., 1018 e 999  $\text{ondas.cm}^{-1}$ , que correspondem aos sinais diagnósticos de amilose e amilopectina, respectivamente, porém com intensidades distintas entre as amostras. Por esta razão, uma análise complementar da estimativa da cristalinidade dos grânulos de amido foi realizada, via cálculo da razão entre os valores de intensidades das absorvâncias daquelas bandas, como proposto por Kuhnen *et al.*, (2010). Estes valores estão apresentados na **Tabela 2**.



**Figura 3:** Perfil espectral (ATR-FTIR, 3000–300 ondas.cm<sup>-1</sup>) de amostras de amido dos 40 acessos genéticos de mandioca de mesa estudados. Onde: **A**-Região de *fingerprint* de lipídios (3000-2800 ondas.cm<sup>-1</sup>); **B**-Região de *fingerprint* de proteínas (1650-1550 ondas.cm<sup>-1</sup>) e **C**-Região de *fingerprint* de carboidratos (1200-950 ondas.cm<sup>-1</sup>).

Os valores da razão IR 999/1018 ondas.cm<sup>-1</sup> obtidos apresentaram correlação negativa fraca (**Figura 4**) com os teores de amilose das amostras, determinados via método enzimático (correlação linear de Pearson  $r = -0,248$ ,  $p < 0,05$ ).

Observou-se ainda que os dados de índices de cristalinidade obtidos via ATR-FTIR e DRX correlacionaram-se negativamente aos conteúdos de amilose ( $r = -0,248$  e  $r = -0,22$ ; respectivamente,  $p < 0,05$  (**Figura 4**)).



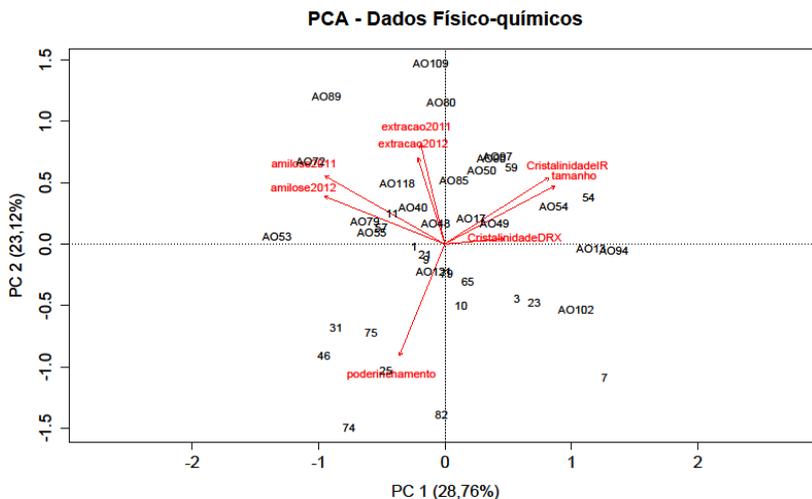
**Figura 4:** Correlação linear de Pearson para os valores de cristalinidade calculados por ATR-FTIR e DRX e o conteúdo de amilose determinado por método enzimático (amostras de amido do ciclo 2010/2011).

### 3.2 ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS E CLUSTERS

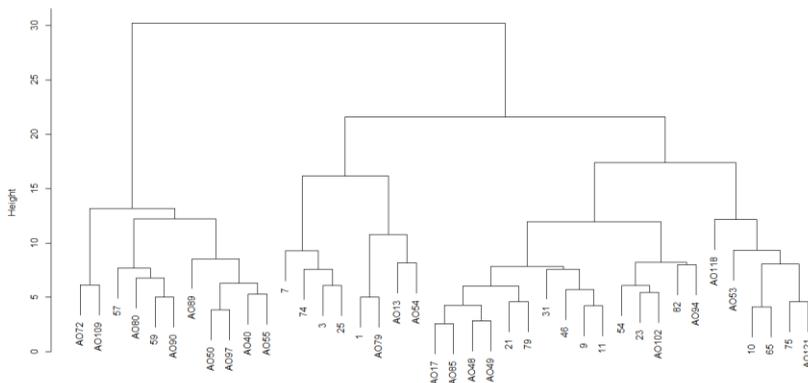
A análise de componentes principais foi aplicada aos dados das variáveis físico-químicas e funcionais, gerando dois conjuntos de dados i.e. os componentes principais PC1 e PC2 que contaram com 28,76 e 23,12% de variação, respectivamente, expressando 51,88% do total da variação existente no conjunto de dados (**Figura 5**). As variáveis, índice de cristalinidade, obtidas por DRX e ATR-FTIR e tamanho dos grânulos estão positivamente correlacionadas em PC1(+), enquanto os teores de amilose apresentaram maior contribuição fatorial às amostras em PC1(-). As amostras em PC2(+) mostraram-se principalmente influenciadas pelos conteúdos de amilose e índice de cristalinidade (ATR-FTIR), enquanto o poder de inchamento apresentou maior contribuição fatorial às amostras em PC2(-). A adição do componente principal 3 (PC3-16,38%) possibilitou extrair informações adicionais, derivadas dos efeitos de teor de amilose e cristalinidade (ATR-FTIR) em PC3(+), enquanto a cristalinidade da fração amídica (DRX) mostrou maior contribuição às amostras em PC3(-) (ver valores de *loadings* para PC1, PC2 e PC3 – **Tabela 3**).

**Tabela 3:** Contribuições fatoriais (*loadings*) para as variáveis físico-químicas e funcionais dos amidos de mandioca de mesa estudados.

Variáveis	PC1	PC2	PC3
Eficiência de extração 2011	-0,1000	0,4734	-0,4574
Eficiência de extração 2012	-0,1111	0,4064	-0,5309
Teor de amilose 2011	-0,4951	0,3232	0,2090
Teor de amilose 2012	-0,4968	0,2263	0,3072
Tamanho do grânulo	0,4537	0,2742	0,1576
Poder de inchamento	-0,1880	-0,5290	-0,3347
Cristalinidade (DRX)	0,2448	0,0240	-0,4020
Cristalinidade (ATR-FTIR)	0,4293	0,3148	0,2685



**Figura 5:** Distribuição fatorial em PC1 e PC2 para as variáveis físico-químicas de amostras de amido das raízes dos acessos genéticos de mandioca de mesa.

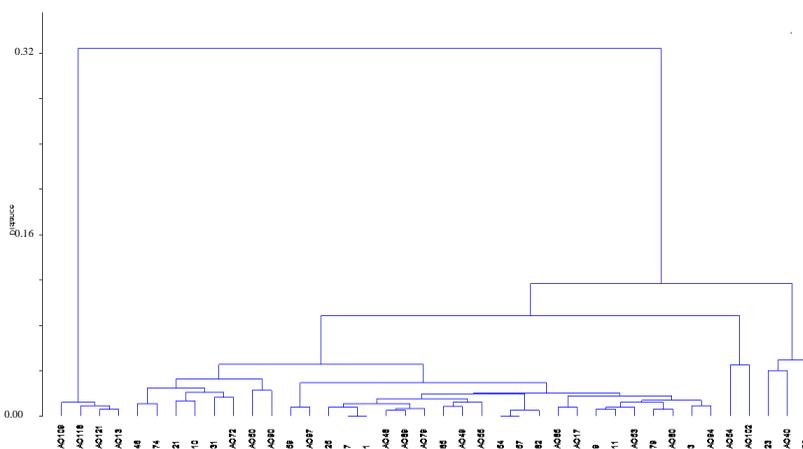


**Figura 6:** Análise hierárquica (*cluster*) de amidos de acessos genéticos de mandioca de mesa em relação às suas características físico-químicas e funcionais. Similaridades de grupos (acessos genéticos) definidas com base na distância euclidiana (UPGMA). Correlação cofenética de 70,65%.

A aplicação da análise de componentes principais à matriz de dados dos espectros de ATR-FTIR (3000-600 ondas.cm<sup>-1</sup>, **Figura 7**), revelou que os componentes principais PC1 e PC2 contribuíram para explicar em 98,78% a variância ocorrente. Uma tendência de arranjo em dois agrupamentos amostrais, concentrou a maioria das amostras nos quadrantes de distribuição fatorial correspondentes a PC1 (+) e PC2 (+) e somente 4 amostras (AO-109, AO-121, AO-13 e AO-118) nos quadrantes correspondentes a PC1(-) e PC2(-). Esta constatação foi subsequentemente confirmada pela análise hierárquica (*cluster*) a partir da matriz de dados espectrais de ATR-FTIR (3000-600 ondas.cm<sup>-1</sup>– **Figura 8**), aonde claramente constatou-se a separação em dois grandes grupos de acessos genéticos.

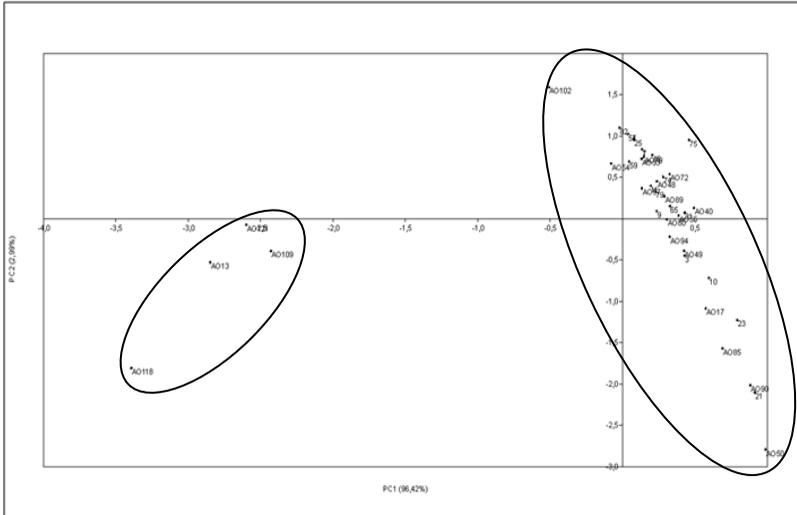


Numa segunda abordagem experimental ao cálculo dos componentes principais, foram computados somente os dados espectrais da janela da região de *fingerprint* de carboidratos, i.e., 1200-950  $\text{ondas.cm}^{-1}$ . Os componentes principais PC1 e PC2 explicaram 96,32% da variação amostral, revelando a ocorrência de dois grupos, a saber: acessos genéticos AO-109, AO-121, AO-13 e AO-118 em PC1(+) e os demais agrupados prioritariamente em PC1(-) e PC2(-). A análise hierárquica complementar (**Figura 9**), confirmou o padrão de agrupamento demonstrado via análise de componentes principais.

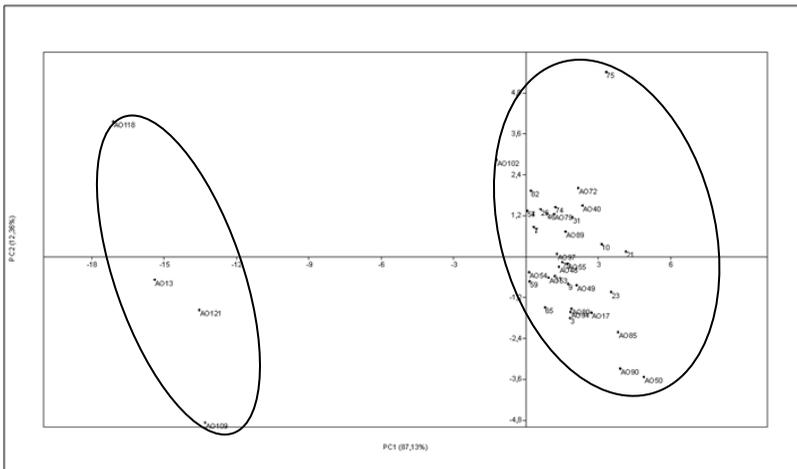


**Figura 9:** Análise hierárquica (cluster) dos dados espectrais de ATR-FTIR (1200-950  $\text{ondas.cm}^{-1}$ ) de amostras de amidos de acessos genéticos de mandioca de mesa. Similaridades de grupos (acessos genéticos) definidas com base na distância euclidiana (UPGMA). Correlação cofenética de 97,74%.

Os cálculos dos componentes principais para os dados espectrais das regiões de *fingerprints* de lipídios (3000-2800  $\text{ondas.cm}^{-1}$ ) (**Figura 10**) e proteínas (1650-1500  $\text{ondas.cm}^{-1}$ ) (**Figura 11**) também demonstraram uma clara discriminação amostral, principalmente entre os acessos genéticos AO-109, AO-121, AO-13 e AO-118. Nestas análises formaram-se dois grupos, de forma semelhante aos agrupamentos observados quando da análise de componentes principais relativos à matriz de dados espectrais de ATR-FTIR (3000 e 600  $\text{ondas.cm}^{-1}$  e 1200-950  $\text{ondas.cm}^{-1}$ ).



**Figura 10:** Distribuição fatorial de PC1 e PC2 para os dados espectrais de ATR-FTIR (3000-2800 ondas.cm<sup>-1</sup>, *fingerpint* de lipídios) de amostras de amidos de mandioca de mesa. PC1 e PC2 contribuíram para explicar em 99,41% a variação amostral.



**Figura 11:** Distribuição fatorial de PC1 e PC2 dos dados espectrais de ATR-FTIR (1650-1500 ondas.cm<sup>-1</sup>, *fingerpint* de proteínas) de amostras de amidos de mandioca de mesa. PC1 e PC2 contribuíram para explicar em 99,49% a variação amostral.



## **4. DISCUSSÃO**

### **4.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E PROPRIEDADES FUNCIONAIS**

#### **4.1.1 Rendimento de extração de amido**

Os valores de rendimento de extração de amido das raízes dos acessos genéticos apresentaram uma amplitude de variação semelhante nos dois ciclos de produção avaliados. Da mesma forma, o rendimento de extração entre os acessos, comparando-os individualmente, também se mostrou semelhante, uma vez que somente 6,25% dos acessos apresentaram diferença superior a 10 pontos percentuais entre um ciclo de produção e o outro. Tomados em conjunto, estes dados sugerem que o protocolo de extração de amido de alta pureza a partir de raízes de mandioca de mesa foi adequado aos propósitos de caracterização deste metabólito, além de ser uma metodologia de fácil execução e que otimiza o uso de água durante o processo. Os resultados dos dois ciclos de produção indicam ainda que parece não haver uma variação importante na produção, acúmulo e consequente rendimento de extração de amido das raízes dos acessos genéticos avaliados. Desta forma, sugere-se que este fenótipo apresenta certa estabilidade para os acessos investigados e que, sob determinadas condições ambientais, o componente genético peculiar a cada acesso apresenta comportamento previsível de rendimento de produção daquele polissacarídeo. Tal assertiva requer confirmação através de maior número de ciclos de produção dos acessos genéticos.

Por outro lado, o estabelecimento de protocolos mais eficientes de extração de amido a partir de raízes pode tornar o processo e a matéria-prima mais atrativos à indústria, em termos econômicos e ambientais. Neste contexto, deve-se considerar como parâmetros importantes o rendimento de amido obtido, associando-o também à facilidade, praticidade, rapidez e redução de custos (e.g. redução do uso de água) do processo de extração. Obviamente, para além destes aspectos os amidos devem apresentar ainda características físico-químicas diferenciadas que determinam sua aplicabilidade industrial para cada situação específica.

### 4.1.2 Teor de amilose

Os teores de amilose variaram significativamente entre os acessos genéticos nas safras avaliadas. Estes dados (**Tabela 1**) evidenciaram uma variabilidade bioquímica importante entre os acessos estudados, aqui representada pela composição amídica. De fato, a existência de composições amídicas bastante distintas, foi detectada principalmente em relação à proporção amilose/amilopectina das raízes. Esta constatação configura a importância de manutenção e conservação destes acessos no banco de germoplasma, seja para seleção direta de genótipos com determinadas características de sua fração amídica para usos específicos e/ou para sua utilização como possíveis parentais em programas de melhoramento genético assistidos bioquimicamente.

A determinação da relação e/ou proporção amilose/amilopectina dos amidos é reconhecida como uma característica importante, pois se relaciona à funcionalidade e/ou aplicabilidade do amido, assim como à organização física da estrutura granular (UARROTA *et al.*, 2013; AMANTE, 1986). As variações nesta relação resultam em grânulos de amido com propriedades físico-químicas e funcionais diferenciadas, definindo sua utilização em alimentos e outras possibilidades de aplicações industriais (WANG & WHITE, 1994; SÁNCHEZ *et al.*, 2010). Por exemplo, amidos com teores elevados de amilose são recomendados à formação de filmes dada à sua menor digestibilidade, comparativamente aqueles com maiores concentrações de amilopectina. Um alto teor de amilose é necessário também para produtos que precisam ser crocantes e, ao mesmo tempo, de maior resistência mecânica. Por outro lado, a amilopectina propicia manutenção da forma da pasta (i.e., maleabilidade), conferindo maior resistência a tratamentos suplementares tais como o corte e a secagem. A amilopectina forma uma rede na matriz da pasta, contribuindo à expansão da massa, aumentando sua friabilidade (CEREDA *et al.*, 2001).

De forma semelhante ao encontrado no estudo em tela, uma grande variação de conteúdos de amilose em acessos de mandioca, determinados pela mesma técnica aplicada neste trabalho (e.g. precipitação da amilopectina via complexação com concanavalina A - Kit enzimático comercial da Megazyme<sup>®</sup>) também foi observada em outros estudos, a saber: teores de 0%, em acessos *waxys* e 30% em acessos com alta concentração de amilopectina (ROLLAND-SABATÉ *et al.*, 2012); 15,2% a 26,5% (SÁNCHEZ *et al.*, 2009), 15,9% a 22,4% (CHARLES *et al.*, 2005) e ainda valores menores, i.e., 6% a 18,4% (GOMAND *et al.*, 2010). Por outro lado, conteúdos relativamente

superiores de amilose, i.e., 25,95% a 32,09% foram relatados por Nunes, Santos & Cruz (2009), utilizando a metodologia iodométrica, a qual parece superestimar os conteúdos reais de amilose.

#### 4.1.3 Poder de inchamento (PI)

Como esperado, diferenças significativas foram observadas no poder de inchamento dos amidos dos acessos genéticos em estudo. De fato, uma grande amplitude na capacidade de inchamento daquela macromolécula foi detectada entre os acessos, consequência direta da variabilidade nos teores de amilose/amilopectina discutidos acima. Esta variabilidade no poder de inchamento indica também que há diferenças de organização intramolecular dos grânulos de amido destes acessos. Normalmente, amidos de mandioca exibem fraca organização intramolecular, comparativamente a amidos de cereais e de outras raízes e tubérculos, indicada pela baixa temperatura de relaxamento das pontes de hidrogênio e rápido aumento dos grânulos (inchamento, gelatinização), ocorrendo à temperatura de em torno de 60 °C (HOOVER, 2001; CEBALLOS & CRUZ, 2012).

Através da determinação do poder de inchamento é possível identificar a capacidade de hidratação dos grânulos (MARCON, AVANCINI & AMANTE, 2007). Tipicamente, esta variável é dependente da capacidade de absorção d'água das moléculas de amido, via pontes de hidrogênio (ADEBOOYE & SINGH, 2008), e, portanto, bastante influenciada pelos arranjos intra/intermoleculares dos componentes amilose e amilopectina.

A maior e/ou menor capacidade de inchamento dos grânulos de amido está relacionada à proporção entre o teor de amilose/amilopectina da sua composição. Neste sentido, Morrison, Scott & Karkalas (1986) afirmam que a amilose e o conteúdo de lipídios do grânulo possuem efeito significativo no poder de inchamento de amidos de cevada, quando este é aquecido em água. Para amidos de mandioca, no entanto, pode-se considerar que este efeito resulta majoritariamente da presença da amilose, uma vez que nos amidos de mandioca o conteúdo de lipídios é insignificante. Desta forma, conclui-se que amidos com alto teor de amilose caracterizam-se por apresentarem valores menores de PI, isto porque a amilopectina é a fração que favorece em maior extensão a hidratação e, conseqüentemente, o inchamento dos grânulos. Os dados desta variável (**Tabela 1**) corroboram estas afirmações quando relacionados aos valores obtidos de teor de amilose e o poder de inchamento para os acessos de mandioca de mesa estudados. Assim,

percebe-se que há uma forte tendência das amostras de amidos com maiores teores de amilose apresentarem um menor poder de inchamento, sendo o inverso também verdadeiro.

Os resultados discutidos acima, quando considerados conjuntamente (e.g. teor de amilose  $\times$  poder de inchamento), revelam adicionalmente que as metodologias utilizadas neste estudo foram adequadas e complementares, sendo corroboradas por estudos anteriores (MORRISON, SCOTT & KARKALAS, 1986; CEBALLOS & CRUZ, 2012).

#### 4.1.4 Tamanho (diâmetro) e formato dos grânulos

O tamanho e o formato dos grânulos de amido variam com a espécie, assim como a distribuição de tamanho varia com o estágio de desenvolvimento da planta e o processo de tuberização, podendo ainda se diferenciar entre acessos genéticos da mesma espécie. Os resultados encontrados no trabalho em tela evidenciam claramente estas afirmações. A definição destes parâmetros, associados aos descritos anteriormente, são fundamentais na determinação do real potencial de utilização dos amidos encontrados em cada acesso genético. Grânulos pequenos ( $\leq 2,0 \mu\text{m}$ ) podem ser usados como substituintes de gorduras, em função da semelhança de tamanho com as gotículas de lipídios (ZAMBRANO, CAMARGO & TAVARES, 2001). Outras possíveis aplicações referem-se à produção de filmes plásticos biodegradáveis e de papéis (LEONEL, 2007). Os tamanhos dos grânulos mostraram ampla dispersão entre os acessos genéticos avaliados, variando de  $8,64 \mu\text{m}$  a  $15,43 \mu\text{m}$  nos acessos 74 e AO-54, respectivamente. A variabilidade é concordante com outros trabalhos, a saber: Charoenkul *et al.*, (2011) observaram valores entre  $4,8 \mu\text{m}$  a  $22,8 \mu\text{m}$ ; Rickard, Asaoka & Blanshard, (1991)  $5 \mu\text{m}$  a  $20 \mu\text{m}$ ; Sriroth *et al.*, (1999)  $8 \mu\text{m}$  a  $22 \mu\text{m}$  e Niba *et al.*, (2002)  $9$  a  $20 \mu\text{m}$ .

Quanto ao formato dos grânulos de amido das amostras estudadas, as micrografias dos detalhes morfológicos (**Figura 1**) revelaram formas muito semelhantes e homogêneas, com características típicas dos amidos de mandioca (i.e. formas arredondadas, ovaladas, convexos bicôncavos) e de tamanhos significativamente variados entre os acessos genéticos (**Tabela 1**). Foi possível observar também uma pequena proporção relativa de grânulos de amido danificados. Este parâmetro é bastante estudado para estabelecer a aplicabilidade de tipos de amidos na indústria farmacêutica. Itiola & Odeku (2005) afirmam que os amidos de formato arredondado e mais regular exibem menor

fator de forma, possibilitando um melhor empacotamento de partículas e, portanto, mais adequados à produção de cápsulas. Testados como agentes de formulação de comprimidos de paracetamol, o amido de mandioca exibiu fortes propriedades de ligação (ITIOLA & AMOO, 1998). Chitedze *et al.*, (2012) mostraram também que a escolha da variedade de mandioca é determinante à qualidade final de comprimidos de ibuprofeno, influenciando suas características mecânicas de ligação, desintegração, friabilidade e dureza.

A ampla diversidade de tamanho e formato apresentado pelos 40 acessos genéticos, da mesma forma como ocorreu para os demais parâmetros estudados neste capítulo (e.g., teor de amilose e poder de inchamento), resulta da diversidade bioquímica derivada da diversidade genética existente nos materiais amostrais. Tal cenário apresenta potencial a ser explorado racionalmente pelas indústrias associadas ao uso das matérias-primas derivadas de cada acesso genético. Além disto, a variabilidade observada poderá ser explorada à obtenção de novos materiais genéticos destinados ao uso alimentício e/ou industrial de forma dedicada, por exemplo.

De forma generalizada, na **Tabela 4** são sugeridas algumas possibilidades potenciais de aplicações dos amidos dos acessos genéticos estudados, em substituição a outras fontes amiláceas para determinados fins alimentícios e industriais. Ressalva-se que o critério utilizado à definição dos possíveis genótipos substituintes foi o teor de amilose, uma vez que a proporção relativa de amilose e amilopectina em última análise determina direta e/ou indiretamente as propriedades físico-químicas e funcionais do amido e, em consequência, suas aplicações industriais (SÁNCHEZ *et al.*, 2010). Além disso, as características típicas do amido de mandioca diferem dos amidos de milho ou batata, por exemplo, criando assim um nicho potencial de uso industrial (CEBALLOS *et al.*, 2007; CEBALLOS *etal.*, 2008).

#### **4.1.5 Índice de cristalinidade (IC) da fração amídica determinado por difração de raios-X (DRX)**

Nas plantas, o amido é armazenado como corpos intracelulares parcialmente cristalinos denominados grânulos. Consoante aos padrões de cristalinidade daquela macromolécula, determinados via DRX, é possível distinguir três tipos de grânulos denominados Tipo A, B e/ou C (CEREDA *et al.*, 2001). Estes padrões de cristalinidade dependem, em parte, do comprimento das cadeias de amilopectina, da densidade de

empacotamento dos grânulos e da presença de água (SAJILATA, SINGHAL & KULKARNI, 2006).

**Tabela 4:** Usos potenciais da fração amídica dos acessos genéticos estudados como substituinte de outras fontes amiláceas, utilizando como variável determinante de sua aplicabilidade o teor de amilose (% $\alpha$ -2,00), determinado por método enzimático.

Uso	Produto	Matéria-prima substituída (% amilose)	Potenciais acessos substituintes <sup>1</sup>		Principal vantagem	Referências
			Substituição (%)			
Alimentos	Pães	Farinha de trigo (~14)	5-20	(1)	Redução de custo	ARISTIZABAL & HENAO (2004)
	Pães sem glúten	Arroz (20-25)	~100*	(2)	Não afeta celíacos	PERDON et al. (1979); TORRES et al. (1999); GUJRAL et al. (2004)
	Misturas para bebidas e sopas instantâneas	Famílias de trigo (~14), arroz europeu (~17)	10-20	(3)	Aumento de rendimento	OSPINA et al. (2009)
	Carnes processadas	Farinha de trigo (~14), outros amidos	50	(4)	Melhor qualidade	OSPINA et al. (2009)
	Nuggets	Milho (~25)	~100*	(5)	Redução de custo, maior crocância e menor absorção de óleo	WEBER et al. (2009)
	Snacks	Arroz (20-25) e milho (~25)	100	(6)	Redução de custo, maior crocância e menor absorção de óleo	OSPINA et al. (2009)
	Massas alimentícias	Arroz asiático (25-30)	~100*	(7)	Redução de custo; maior retrogradação	MILATOVIC & BALLINI (1966); KOHLWEY, KENDALL & MOHINDRA (1995)
	Cerveja	Amido de milho (~25), família de arroz (20-25), xarope maltose	50-100	(8)	Redução de custo	OSPINA & ARISTIZABAL (2006)
	Adesivos	Amidos de milho (~25) e de batata (25-30)	30-100	(9)	Redução de custo	BONILLA & ALONSO (2002)
	Plásticos biodegradáveis	Amidos de milho (~25) e de batata (25-30)	70	(10)	Melhor estabilidade	VILLADA & ACOSTA (2003)

**Fonte:** Adaptado de Ceballos & Cruz (2012). \*Estimado pelo autor.

(1) 07:23:21;5:45:75;79;AO-117;AO-49 e AO-54 (2) 01:11;AO-53;AO-72;AO-79;AO-89 e AO-118 (3) 03:09;25:31;46:57;65;74;AO-40;AO-48;AO-50;AO-55;AO-80;AO-85;AO-90;AO-97;AO-109 e AO-121 (4) 07:82;AO-13;AO-94 e AO-102 (5) AO-53; AO-72;AO-79;AO-89 e AO-118 (6) AO-53; AO-72;AO-79;AO-89 e AO-118 (7) AO-53; AO-72;AO-89 e AO-118 (8) AO-53; AO-72;AO-79;AO-89 e AO-118 (9) e (10) AO-89; AO-118;AO-53; AO-72 e AO-79.

Para Zobel (1964), os grânulos de amido tipo A, típicos de cereais, caracterizam-se por apresentar um padrão de cristalinidade com picos nos ângulos de difração  $2\Theta$  em  $15,3^\circ$ ;  $17,8^\circ$  e  $23,5^\circ$ , enquanto os grânulos tipo B mostram picos em  $5,6^\circ$ ;  $14,4^\circ$ ;  $17,2^\circ$ ;  $22,2^\circ$  e  $24^\circ$  e o tipo C em  $5,6^\circ$ ;  $15,3^\circ$ ;  $17,3^\circ$  e  $23,5^\circ$ . O polimorfo tipo C é considerado um intermediário entre A e B, sendo detectado caracteristicamente em amidos de leguminosas e sementes (ELIASSON & GUDMUNDSSON, 2006). Geralmente, amidos de tuberosas e raízes exibem padrão de difração tipo B, no entanto, alguns trabalhos (FRANCO, CIACCO & TAVARES, 1988; MOORTHY, 1985; GALLANT *et al.*, 1982 e ROSENTHAL *et al.*, 1974), reportam que o amido de mandioca apresenta padrão de difração tipo-A. No estudo em tela, todas as amostras de amido exibiram padrão de difração tipo A, caracterizado por duplo sinal de  $2\Theta \approx 17^\circ$  e  $18^\circ$ , em adição a uma intensa reflexão  $2\Theta = 15^\circ$  e algumas reflexões adicionais a  $2\Theta \approx 9.9^\circ$ ;  $11.2^\circ$ ;  $22,9^\circ$  (LOPEZ-RUBIO *et al.*, 2008).

Os índices de cristalinidade determinados por DRX apresentaram valores que se dispersaram entre 35,13% (acesso 31) a 43,06% (acesso 54), com média de 39,84%. Estes valores estão de acordo com Rickard *etal.* (1991) que cita que os níveis de cristalização em amido de mandioca é de cerca de 38%. Mutungi *et al.*, (2012) obtiveram uma amplitude de valores de cristalinidade para amidos de mandioca de 33,4 a 58,2%, a partir de um modelo amorfo como referência para linha de base no difratograma, de forma semelhante à descrita neste trabalho.

A região cristalina do grânulo de amido é formada por cadeias laterais de amilopectina que tem papel fundamental na determinação da sua cristalinidade, enquanto a região amorfa é composta por amilose e ramificações de amilopectina. Desta forma, a cristalinidade do grânulo está diretamente relacionada às duplas hélices formadas pelas ramificações de amilopectina (HOOVER, 2001; CEBALLOS & CRUZ, 2012). Os resultados descritos no trabalho em tela estão em concordância com esta afirmação.

Segundo Biliaderis (1992), são as regiões cristalinas do amido que mantêm a estrutura do grânulo, controlam o seu comportamento na presença de água e lhe conferem resistência aos ataques químicos e enzimáticos. Altas temperaturas de gelatinização têm sido relatadas como resultantes do alto grau de cristalinidade, que fornece estabilidade estrutural aos grânulos e maior resistência à gelatinização. Desta forma, a presença de amilose em maior proporção (menor índice de cristalinidade) reduz o ponto de fusão das regiões cristalinas e a energia para iniciar a gelatinização, pois as cadeias longas de amilopectina

requerem uma maior temperatura para se dissociar completamente, comparativamente àquela requerida para cadeias mais curtas das duplas hélices. Logo, amidos com altos conteúdos de amilose têm maior proporção de região amorfa, exibindo perdas de cristalinidade em temperaturas menores de gelatinização (SINGH *et al.*, 2003). Estas características, associadas às propriedades físico-químicas dos amidos são fundamentais à determinação da funcionalidade e da aplicação daquela matéria prima. Para exemplificar, Moorthy (2002), estudando as propriedades de amidos de diversas raízes de fontes botânicas tropicais, observou que um dos fatores que interfere na capacidade de expansão (aumento de volume) do amido é o conteúdo de amilose. Assim, o alto conteúdo de amilose no amido nativo e/ou o incremento desta em amidos transformados, reduz a sua capacidade de expansão. Por outro lado, sabe-se que altas quantidades de amilose também estão relacionadas à maior suscetibilidade enzimática e aumento da retrogradação, associada ao incremento da sinerese. Portanto, tais características determinam a aplicabilidade de amidos, seja como alimento com determinadas propriedades (e.g. alimentos funcionais), ou para outras aplicações. Na indústria farmacêutica, por exemplo, o amido é largamente utilizado como excipiente. Para tanto, certo grau de cristalinidade é requerido àquele polissacarídeo para manter a especificidade de liberação da droga, além de outras propriedades funcionais (PIFFERI, SANTORO & PEDRANI, 1999; FREI *et al.*, 2003). Na formulação de comprimidos, mudanças na cristalinidade do amido podem ocorrer durante a produção, decorrentes da secagem, granulação, revestimento, compressão e refinamento dos constituintes da formulação. Logo, fatores associados à amorfização e/ou cristalinização que podem ocorrer durante o processo de produção e armazenamento interferem na solubilidade, dissolução e biodisponibilidade do ingrediente ativo, devendo ser monitorados (VEIJ *et al.*, 2009).

#### **4.1.6 Espectroscopia vibracional de infravermelho médio com transformada de Fourier (ATR-FTIR)**

Os perfis espectrais de ATR-FTIR dos amidos em estudo revelaram que a maioria dos constituintes químicos se concentrou na região do *fingerprint* entre 1700-700 ondas.cm<sup>-1</sup>. Sinais comumente associados à ocorrência de proteínas, lipídeos, amilose e amilopectina são claramente identificados em todas as amostras. Na região de *fingerprint* de carboidratos (1200–950 ondas.cm<sup>-1</sup> - CERNÁ *et al.*, 2003)

foram detectados os picos de maior intensidade, sendo que outros compostos também foram identificados nas amostras, a saber: proteínas (1650-1550  $\text{ondas.cm}^{-1}$ , aminas primárias – LAMBERT *et al.*, 2001) e ácidos graxos (1740  $\text{ondas.cm}^{-1}$  e 3000-2800  $\text{ondas.cm}^{-1}$  - SILVERSTEIN, 1994).

Particularmente em relação à região de *fingerprint* de carboidratos, estudos demonstraram que algumas bandas de absorção de infravermelho são altamente sensíveis à conformação dos polímeros amilose e amilopectina (WILSON & BELTON, 1988; VAN SOEST *et al.*, 1995; SEVENOU *et al.*, 2002; BERNAZZANI *et al.*, 2008). Segundo alguns autores (VAN SOEST *et al.*, 1995; SEVENOU *et al.*, 2002; KUHNEN *et al.*, 2010), as bandas que ocorrem em 1018 e 999  $\text{ondas.cm}^{-1}$  são diagnósticos à caracterização de amilose e amilopectina, respectivamente, e representam o ordenamento amorfo e cristalino dos grânulos de amido. Em todas as amostras de amido dos acessos genéticos analisados constataram-se estas duas bandas, no entanto com intensidades distintas entre as amostras. A estimativa da cristalinidade dos grânulos via razão dos valores de absorbância dos picos em 999 e 1018  $\text{ondas.cm}^{-1}$  (KUHNEN *et al.*, 2010) representa uma importante ferramenta diagnóstica à seleção de acessos genéticos diferenciados para determinadas finalidades específicas. Como a intensidade das bandas em 999  $\text{ondas.cm}^{-1}$  refere-se à fração amilopectina e 1018  $\text{ondas.cm}^{-1}$  à amilose, quanto maior a razão IR 999/1018  $\text{ondas.cm}^{-1}$  maior o conteúdo de amilopectina nas amostras analisadas e, por consequência, maior a cristalinidade destes grânulos. Os valores da razão IR 999/1018  $\text{ondas.cm}^{-1}$  obtidos apresentaram correlação negativa com os teores de amilose das amostras analisadas, corroborando esta afirmação. Ou seja, amostras com bandas menos intensas em 1018  $\text{ondas.cm}^{-1}$  e com maiores intensidades em 999  $\text{ondas.cm}^{-1}$  resultam um valor  $>1.0$  à razão IR 999/1018  $\text{ondas.cm}^{-1}$  e indicam maior cristalinidade do grânulo.

Adicionalmente observou-se que os dados gerados nas duas metodologias utilizadas à determinação do índice de cristalinidade, e.g. ATR-FTIR e DRX, quando analisados em conjunto apresentaram correlação positiva entre si e correlação negativa aos conteúdos de amilose.

A análise dos perfis espectrais isoladamente revelou similaridade de composição química entre os amidos de mandioca estudados. No entanto, geralmente a análise visual pura e simples dos espectros de ATR-FTIR não possibilita a extração de quantidades maximizadas de informações. Sendo assim, a técnica de FTIR torna-se muito promissora quando associada a ferramentas de análise estatística multivariada,

particularmente através da determinação dos componentes principais (PCAs) e de agrupamentos (*clustering*), uma vez que estas permitem uma rápida extração de informações relevantes de um conjunto de dados complexos (e.g. parâmetros químicos) e possibilita o entendimento mais detalhado das eventuais discrepâncias e/ou similaridades no conjunto de dados espectrais (FUKUSAKI & KOBAYASHI, 2005).

#### 4.2 ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS E CLUSTERS

A complementação das análises referentes às características físico-químicas, realizadas através da elaboração de modelo descritivo baseado no cálculo dos componentes principais possibilitou obter informações adicionais quanto às propriedades funcionais dos amidos estudados. Estes resultados corroboram as informações que correlacionam a estrutura cristalina dos grânulos às duplas hélices formadas pelas ramificações da amilopectina (HOOVER, 2001) e que consideram as regiões amorfas dos grânulos de amido predominantemente formadas pela fração amilose, menos densa e, conseqüentemente, mais suscetíveis às enzimas, com maior capacidade de absorção de água em temperaturas abaixo da temperatura de gelatinização (SINGH *et al.*, 2003; CEREDA *et al.*, 2001). Complementarmente, confirmam que o conteúdo de amilose está ligado a uma maior ocorrência de retrogradação após a gelatinização, devido a sua forte tendência de reassociação por meio de ligações de pontes de hidrogênio com outras moléculas de amilose adjacentes (SINGH *et al.*, 2003).

Por outro lado, a análise de *clusters*, a partir das variáveis físico-químicas estudadas, permitiu adequada separação entre os amidos dos acessos genéticos de mandioca de mesa. As similaridades e/ou discrepâncias entre os acessos genéticos foram definidas com base na distância (distância euclidiana) entre duas amostras usando média aritmética (UPGMA). Os acessos genéticos de maior similaridade em suas características físico-químicas e funcionais foram agrupados em dois grandes grupos principais (representados através da análise hierárquica de *cluster* na **Figura 6**).

A aplicação da análise de componentes principais à matriz de dados obtidos a partir dos espectros de ATR-FTIR (3000 e 600 ondas.cm<sup>-1</sup>) revelou uma tendência de arranjo dos acessos genéticos em dois agrupamentos totalmente distintos. Os acessos AO-109, AO-121, AO-13 e AO-118 formaram um agrupamento único que se destacou dos demais por apresentarem perfis metabólicos fortemente discrepantes em

comparação aos demais acessos genéticos analisados, formando um grupo com similaridades metabólicas específicas, sugerindo uma composição química diferenciada em relação aos demais e semelhante entre os mesmos. A análise hierárquica (*clusters*) dos dados espectrais de ATR-FTIR, considerando esta mesma janela espectral (3000-600  $\text{ondas.cm}^{-1}$ ) confirma esta constatação.

Adicionalmente, considerando-se somente os dados dos espectros de ATR-FTIR relativos à janela de interesse específica deste estudo (1200-950  $\text{ondas.cm}^{-1}$ , região de *fingerprint* de carboidratos), também se observou a formação de dois grupos, de forma semelhante à descrita acima. Da mesma forma, a análise hierárquica realizada para os dados desta mesma janela espectral confirmou o padrão de agrupamento observado na análise de componentes principais.

Complementarmente, o cálculo dos componentes principais para os dados espectrais das regiões de *fingerprints* típicas de lipídios (3000-2800  $\text{ondas.com}^{-1}$ ) e proteínas (1650-1500  $\text{ondas.com}^{-1}$ ) demonstrou uma forte discriminação entre as amostras, principalmente entre os acessos genéticos AO-109, AO-121, AO-13 e AO-118, comparativamente à dispersão constatada para os acessos restantes analisados.

Pode-se afirmar também, que a classificação e agrupamento dos genótipos via análise dos componentes principais, usando a região de *fingerprint* para carboidratos, apresenta similaridade com os agrupamentos formados pelas análises quimiométricas realizadas a partir dos resultados obtidos com os dados físico-químicos e funcionais. Estes resultados sugerem que a análise dos espectros de ATR-FTIR em conjunto com abordagens quimiométricas constitui uma ferramenta analítica adequada, rápida e eficaz à caracterização de amidos de mandioca de mesa. Sendo assim, pode se constituir numa abordagem eficiente para caracterização da diversidade bioquímica associada a bancos de germoplasma, bem como para seleção assistida nos programas de melhoramento genético de mandioca de mesa e de definição do potencial de aplicabilidade (e.g. alimentícia e/ou industrial) da biomassa associada a cada acesso genético.



## 5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos segundo as abordagens metodológicas experimentais estabelecidas no trabalho em tela, visando à caracterização físico-química dos acessos genéticos de mandioca de mesa (*Manihot esculenta* Crantz), permitem concluir que:

O conjunto das técnicas analíticas empregadas, associadas às análises quimiométricas (PCAs e *clusters*), permitiram identificar e caracterizar a variabilidade química dos acessos genéticos avaliados, além de discriminar, distinguir e/ou agrupar estes acessos de acordo com suas similaridades e peculiaridades físico-químicas e funcionais.

Foi detectada uma ampla variabilidade de perfis metabólicos sugerindo diversas possibilidades de aplicações industriais e/ou alimentares das biomassas de raízes de *M. esculenta*, consoante ao acesso genético.

A identificação de acessos genéticos que possuem amidos com maiores teores de amilose (i.e. AO-89, AO-118, AO-53, AO-72, AO-79) sugerem que a biomassa destes materiais apresenta potencial de utilização na elaboração de produtos específicos que necessitam de maior crocância, resistência e baixa adsorção de óleo (i.e. salgadinhos tipo *chips*, *nuggets* e *snacks*).

Produtos que requerem a propriedade de formação de uma pasta mais estável (i.e. sopas e molhos), aonde os produtos podem sofrer a perda de viscosidade e precipitação, é necessário que o amido tenha um teor mais elevado de amilopectina, ou seja, que o amido tenha uma menor tendência a retrogradação e sinerese. Sendo indicados nestes casos específicos os acessos genéticos como potencialmente mais promissores: AO-94, AO-102, 82, 54, 23 e 21.

Pode-se considerar ainda, associada às conclusões anteriores que em relação à utilização daquelas biomassas na alimentação, fontes de amidos com altos teores de amilose são associados à menor resposta glicêmica, redução nos níveis de colesterol plasmático e esvaziamento mais lento do trato gastrointestinal, comparativamente aqueles com baixos níveis de amilose. Desta forma a utilização *in natura* (i.e. farinhas, fécula e/ou minimamente processado) pode representar um fator de diferenciação à indústria alimentícia e/ou de estímulo ao consumo direto, com vistas à inovação na busca de novos produtos com propriedades nutracêuticas e diferenciais de mercado. Adicionalmente, deve-se considerar também que o amido de mandioca não possui glúten, sendo indicado para o consumo de portadores da doença celíaca. Cabe enfatizar ainda que além destes diferenciais em relação à biomassa

produzida, a mandioca pode ser cultivada em sistemas de produção com menor impacto ao ambiente a com a mínima utilização de agrotóxicos, podendo ser uma alternativa à produção de outras culturas, também amiláceas, mas que potencialmente são mais impactantes ao ambiente e ao homem, principalmente pelo excessivo uso de agrotóxicos, além do que muitas delas podem ser de origem transgênica.

Os padrões de perfis espectrais obtidos por espectroscopia vibracional de infravermelho, combinados à quimiometria, e.g., PCA e análise hierárquica, evidenciou de forma bastante clara discrepâncias nos perfis químicos dos acessos genéticos. Esta constatação indica que esta abordagem analítica configura uma ferramenta de análise rápida e eficiente à caracterização de amidos de mandioca de mesa. Os espectros de ATR-FTIR dos acessos AO-13, AO-109, AO-118 e AO-121 destacaram-se dos demais, apresentando perfis metabólicos similares entre eles e totalmente discrepantes em comparação com os outros acessos analisados, sugerindo uma composição química peculiar entre os mesmos.

Presume-se que a utilização conjunta das técnicas empregadas neste trabalho de caracterização e discriminação de acessos genéticos de mandioca de mesa, pode tornar-se uma abordagem interessante à investigação e determinação das características estruturais e funcionais do amido, relacionado à diversidade genética de mandioca de mesa (*M. esculenta*) que se encontra depositada em bancos de germoplasma (e.g. Epagri), bem como de eventuais materiais genéticos ainda desconhecidos que são mantidos *on farm* por agricultores familiares. Adicionalmente, os resultados sugerem que estas abordagens podem ainda ser empregadas como ferramentas de apoio aos programas de melhoramento genético de mandioca, assistidos bioquimicamente, otimizando o processo de seleção.

O conjunto de resultados obtidos revela também a necessidade estratégica de conservação destes recursos genéticos associados à diversidade genética encontrada em bancos de germoplasma e em poder dos produtores rurais. Considerando que esta condição é fundamental à perenidade dos trabalhos de melhoramento genético, tanto para a ampliação da diversidade, bem como para a seleção e desenvolvimento de novos materiais genéticos promissores, com características nutricionais diferenciadas e/ou aplicabilidade industrial específica.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEBOOYE, V.C., SINGH, V. Physico-chemical properties of the flours and starches of two cowpea varieties (*Vigna unguiculata* L. Walp). **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 9, p. 92-100, 2008.

AMANTE, E.R. Caracterização de amidos de variedades de mandioca (*Manihot esculenta*, Crantz) e da batata doce (*Ipomoea batatas*). Dissertação. Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade de Viçosa, Minas Gerais. Brasil, 1986.

AMYLOSE/AMYLOPECTIN. Assay procedure for the measurement of the amylose and amylopectin contents in starch. Megazyme International Ireland Ltd. **Wicklow**: Ireland. 2006.

ARISTIZÁBAL, J. and HENAO, S. Adapación y validación de tecnologia para utilización de harina de yuca en panificación. In: Informe de Proyecto. CLAYUCA, Palmira, Colombia. 2004.

ARYEE, F.N.A., ODURO, I., ELLIS, W.O., AFUAKWA, J.J. The physicochemical properties of flour samples from the roots of 31 varieties of cassava. **Food Control**, v. 17, p. 916-922, 2006.

BERNAZZANI, P., PEYYAVULA, V.K., AGARWAL, S., TATIKONDA, R.K. Evaluation of the phase composition of amylose by FTIR and isothermal immersion heats. **Polymers**, v. 49, p. 4150-4158, 2008.

BILIADERIS, C. G. Structures and phase transitions of starch in food systems. **Food Technology**, v. 145, p. 98-109, 1992.

BONILLA, A.M. & ALONSO, L. **Estudio de La viabilidad técnica, econômica y comercial de La obtención de adhesivos para uso en la industria de cartón corrugado, a partir de almidón de yuca extraído por via seca**. In: CLAYUCA. Informe anual de actividades. Palmira, Colombia. 2002.

CEBALLOS, H.; SÁNCHEZ, T.; MORANTE, N.; FREGENE, M.; DUFOUR, D.; SMITH, A.; DENYER, K.; PÉREZ, J.C.; CALLE, F. and MESTRES, C. Discovery of an amylose-free starch mutant in cassava

(*Manihot esculenta* Crantz). **J. Agric. Food Chem.** 55(18):7469-7476. 2007.

CEBALLOS, H.; SÁNCHEZ, T.; DENYER, K.; TOFIÑO, A.P.; ROSERO, E.A.; DUFOUR, D.; SMITH, A.; MORANTE, N.; PÉREZ, J.C. and FAHY, B. Induction and identification of a small-granule, high-amylose mutant in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **J. Agric. Food Chem.** 56(16):7215-7222. 2008.

CEBALLOS, H. & CRUZ, G. de la. Cassava taxonomy and Morphology. In: OSPINA, B. and CEBALLOS, H. (editors). **Cassava in the third millennium: modern production, processing, use, and marketing systems**. Cali, Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT); Latin America and Caribbean Consortium to Support Cassava Research and Development (CLAUYCA); Technical Centre for Agricultural and Rural Cooperation (CTA). p. 15-28. 2012.

CEREDA, M. P., FRANCO, C. M. L., DAIUTO, E. R., DEMIATE, I. M., CARVALHO, L. J. C. B., LEONEL, M. Propriedades gerais do amido. Serie: culturas de tuberosas amiláceas latino-americanas, v. 1. São Paulo, Brasil: Fundação Cargill, 2001.

CERNÁ, M., BARROS, A.S., NUNES, A., ROCHA, S.M., DELGADILLO, I., COPÍKOVÁ, J., COIMBRA, M.A. Use of FTIR spectroscopy as a tool for the analysis of polysaccharide food additives. **Carbohydrate Polymers**, v. 51, p. 383–389, 2003.

CHAROENKUL, N., UTTAPAP, D., PATHIPANAWAT, W., TAKEDA, Y. Physicochemical characteristics of starches and flours from cassava varieties having different cooked root textures. **Food Science and Technology**, v. 44, p. 1774-1781, 2011.

CHARLES, A. L., CHANG, Y. H., KO, W. C., SRIROTH, K., & HUANG, T. C. Influence of amylopectin structure and amylose content on the gelling properties of five cultivars of cassava starches. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 53, p. 2717–2725, 2005.

CHITEDZE, J., MONJEREZI, M., SAKA, J.D. K., STEENKAMP, J. Binding effect of cassava starches on the compression and mechanical properties of ibuprofen tablets. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 02, p. 31-37, 2012.

ELIASSON, A. N., GUDMUNDSSON, M. Starch: Physicochemical and functional aspects. In ELIASSON, A. N. (ed.) **Carbohydrates in food**, v. 2, p 391-469, 2006

FAO.(Food and Agriculture Organization of the United Nations).Rome, Italy.Disponível em: <http://www.fao.org/ag/agp/agpc/gcds/>. Acesso em: 08/06/2012.

FRANCO, C. M. L., CIACCO C. F., TAVARES, D. Q. Studies on the susceptibility of granular cassava and corn starches to enzymatic attack. Part II. Study of the granular structure of starch. **Starch/Stärke**, v. 40, p. 29–32, 1988.

FREI, M., SIDDHURAJU, P., BECKER, K. Studies on the in vitro starch digestibility and the glycemic index of six different indigenous rice cultivars from the Philippines. **Food Chemistry**, v. 83, p. 395–402, 2003.

FUKUSAKI, E. & KOBAYASHI, A. Plant metabolomics: potential for practical operation. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 100, p. 347–354, 2005.

GALLANT, D. J., BEWA, H., BUY, Q. M., BOUCHET, B., SZYLIT, O., & SEALY, L. On the ultrastructural and nutritional aspects of some tropical tuber starches. **Starch/Stärke**, v. 30, p. 255–262, 1982.

GOMAND, S. V., LAMBERTS, L., DERDE, L. J., GOESAERT, H., VANDEPUTTE, G. E., GODERIS, B., VISSER, R.G.F. DELCOUR, J.A. Structural properties and gelatinization characteristics of potato and cassava starches and mutants thereof. **Food Hydrocolloids**, v. 24, p. 307–317, 2010.

GUJRAL, H.S. & ROSELL C.M. Improvement of the Bread making quality of rice flour by glucose. **Food Research International**. 37: 75–81.2004.

HAYAKAWA, K. Quality characteristics of hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.): properties of starch gelatinization and retrogradation. **Cereal Chemistry**, v. 74, p. 576-580, 1997.

HOOVER, R. Composition, molecular structure, and physicochemical properties of tuber and root starches: a review. **Carbohydrate Polymers**, v. 45, p. 253-267, 2001.

ITIOLA, O. A., AMOO, O. A. Effects of cassava starch and gelatin on the compressional characteristics of a paracetamol tablet formulation. **Nigerian Journal Science**. v. 32, p. 83–87, 1998.

ITIOLA, O.A., ODEKU, O.A. Packing and cohesive properties of some locally extracted starches. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 4, p. 363-368, 2005.

KAUSHAL, KUMAR, V., SHARMA, H.K. Comparative study of physicochemical, functional, antinutritional and pasting properties of taro (*Colocasia esculenta*), rice (*Oryza sativa*) flour, pigeon pea (*Cajanus cajan*) flour and their blends. **Food Science and Technology**, v. 48, p. 59-68, 2012.

KOHLWEY, D.E.; KENDALL, J.H.; MOHINDRA, R.B. Using the physical properties of rice as a guide to formulation. **Cereal Foods World**, v. 40, n.10, p. 728 - 732, 1995.

KUHNEN, S., OGLIARI, J. B., DIAS, P. F., BOFFO, E. F., CORREIA, I., FERREIRA, A. G., DELGADILLO, I. AND MARASCHIN, M. ATR-FTIR spectroscopy and chemometric analysis applied to discrimination of landrace maize flours produced in southern Brazil. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 45, p. 1673–1681, 2010.

LAMBERT, J.B., SHURVELL, H.F., LIGHTNER, D.A., COOKS, R.G. **Organic Structural Spectroscopy**. Prentice Hall: Upper Saddle River, 2001.

LEACH, H.W., MCCOWEN, L.D., SCHOCH, T.J. Structure of the starch granule I. Swelling and solubility patterns of various starches. **Cereal Chemistry**, v. 36, p. 534-544, 1959.

LEONEL, M. Análise da forma e tamanho de grânulos de amidos de diferentes fontes botânicas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, p. 579-588, 2007.

LIU, Q. Understanding starches and their role in foods. In: CUI, S. W. (ed). **Food Carbohydrates: Chemistry, Physical Properties and Applications**. Boca Raton: CRC Press, p. 305-309, 2005.

LOPEZ-RUBIO, A., FLANAGAN, B. M., GILBERT, E. P., & GIDLEY, M. J. A novel approach for calculating starch crystallinity and its correlation with double helix content: A combined XRD and NMR study. **Biopolymers**, v. 89, p. 761–768, 2008.

MARCON, M.J.A., AVANCINI, S.R.P., AMANTE, E.R. Propriedades químicas e tecnológicas do amido de mandioca e do polvilho azedo. Editora da UFSC, Florianópolis, Brasil, 2007.

MILATOVIC, L.; BALLINI, N. Un nuovo approccio tecnologico e nutrizionale alla produzione della pasta. **Tecnica Molitoria**, v. 37, n.10, p. 801-815, 819, 1986.

MOORTHY, S. N. Effect of different types of surfactants on cassava starch properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 33, p. 1227–1232, 1985.

MOORTHY, N. S. Physical and functional properties of tropical tuber starches: A review. **Starch/Stärke**, v. 54, n. 12, p. 559-592, 2002.

MORRISON, W. R., SCOTT, D. C., KARKALAS, J. Variation in the composition and physical properties of barley starches. **Starch/Stärke**, v. 38, p. 374-379, 1986.

MUTUNGI, C., PASSAUER, L., ONYANGO, C., JAROS, D. ROHM, H. Debranched cassava starch crystallinity determination by Raman spectroscopy: Correlation of features in Raman spectra with X-ray diffraction and  $^{13}\text{C}$  CP/MAS NMR spectroscopy. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, p. 598–606, 2012.

NIBA, L. L., BOKANGA, M. M., JACKSON, F. L., SCHILMME, D. S., LI, B. W. Physicochemical properties and starch granular characteristics of flour from various *Manihot esculenta* (cassava) genotypes. **Journal of Food Science**, v. 67, p. 1701-1705, 2002.

NUNES, L.B., SANTOS, W. J., CRUZ, R. S. Rendimento de extração e caracterização química e funcional de féculas de mandioca da região do

semi-árido baiano. Alimentos e Nutrição. **Brazilian Journal of Food and Nutrition**, v. 20, p. 129-134, 2009.

OSPINA, B. & ARISTIZÁBAL, J. **Investigación para la evaluación técnica del uso de la harina de yuca como adjunto cervecero**. In: Informe de proyecto. CLAYUCA, Palmira, Colombia. 2006.

OSPINA, B. NUTTI, M.; GALLEGO, S.; CARVALHO, J.L.; ASCHERI, J.L. Fichas Técnicas: Productos alimenticios. In: Proc. of an international course on “Tecnologías para elaboración de productos alimenticios a partir de cultivos con alto contenido nutricional”, held in Palmira, Colombia. CLAYUCA; Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), Palmira, Colombia. 115 p. 2009.

PERDON, A.A & JULIANO, B.O. Amylose content of rice and quality of fermented cake. **Die Stärke**. 1975; 27(6):196-8.

PIFFERI, G., SANTORO, P., PEDRANI, M. Quality and functionality of excipients. **Farmaco**, v, 54, p. 1–14, 1999.

RIBEIRO, E. P., SERAVALLI, E. A. G. Química dos Alimentos. São Paulo: Edgard Blücher, 2004.

RICKARD, J. E., ASAOKA, M., & BLANSHARD, J. M. V. The physical-chemical properties of cassava starch. **Tropical Science**, v. 31, p. 189-207, 1991.

ROLLAND-SABATÉ, A., SÁNCHEZ, T., BULÉON, A., COLONNA, P., JAILLAIS, B., CEBALLOS, H., DUFOUR, D. Structural characterization of novel cassava starches with low and high amylose contents in comparison with other commercial sources. **Food Hydrocolloids**, v. 27, p. 161–174, 2012.

ROSENTHAL, F. R. T., NAKAMURA, T., ESPINDOLA, A. M. C., & JOCHIMEK, M. R. Structure of starch granules. **Die Stärke**, v. 26, p. 50–55, 1974

RUBENS, P., SNAUWAERT, J., HEREMANS, K. & STUTE, R. In situ observation of pressure-induced gelation of starches studied with FTIR in the diamond anvil cell. **Carbohydrate Polymers**, v. 39, p. 231-235, 1999.

SALIJATA, M. G. SINGHAL, R. S. KULKARNI, P. R. Resistant Starch – A Review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 5, p. 1-17, 2006.

SÁNCHEZ, T., MAFLA, G., MORANTE, N., CEBALLOS, H., DUFOUR, D., CALLE, F. Screening of starch quality traits in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Starch/Stärke**, v. 61, p. 12–19, 2009.

SÁNCHEZ, T.; DUFOUR, D.; MORENO, I. and CEBALLOS, H. Pasting and gel stability of wax and normal starches from cassava, potato, maize, and rice under thermal, chemical and mechanical stress. **J. Agr. Food Chem.** 58:5093-5099. 2010.

SEVENOU, O., HILL, S.E., FARHAT, I.A. & MITCHELL, J.R. Organization of the external region of the starch granule as determined by infrared spectroscopy. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 31, p. 79–85, 2002.

SILVERSTEIN, R.M. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 5<sup>a</sup> ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994

SINGH, N., SINGH, J., KAUR, L., SODHI, N. S., GILL, B.S. Morphological, thermal and rheological properties of starches from different botanical sources. Review. **Food Chemistry**, v. 81, p. 219-231, 2003.

SRIROTH, K., SANTISOPASRI, V., PETCHALANUWAT, C., KUROTJANAWONG, K., PIYACHOMKWAN, K., OATES, C. G. Cassava starch granule structure function properties: influence of time and conditions at harvest on four cultivars of cassava starch. **Carbohydrate Polymers**, v. 38, p. 161-170, 1999.

TORRES, R.L.; GONZALEZ, R.J.; SANCHEZ, H.D.; OSELLA, C.A.; de la TORRE, M.A.G. Performance of rice varieties in making bread without gluten. **Arch Latinoamer. Nutric.** 1999; 49 (2): 162-165.

UARROTA, V.G., AMANTE, E.R., DEMIATE, I.M., VIEIRA, F., DELGADILLO, I., MARASCHIN, M. Physicochemical, thermal, and pasting properties of flours and starches of eight Brazilian maize landraces (*Zea mays* L.). **Food Hydrocolloids**, v. 30, p. 614-624, 2013.

VAN SOEST, J.J.G., TOURNOIS, H., WIT, DE D., Vliegenthart, J.F.G. Short-range structure in (partially) crystalline potato starch determined with attenuated total reflectance Fourier transform IR spectroscopy. **Carbohydrate Research**, v.279, p. 201-214, 1995.

VEIJ, M., VANDENABEELE, P., DE BEER, T., REMONC, J. P., MOENS, L. Reference database of Raman spectra of pharmaceutical excipients. **Journal of Raman Spectroscopy**, v, 40, p. 297–307, 2009.

VILLADA, H.S. & ACOSTA, H. **Proyectos de desarrollo de materiales poliméricos biodegradables usando extrusion simple**. In: CLAYUCA. Informe anual de actividades. Palmira, Colombia. p. 212-222. 2003.

WALTER, M, SILVA, L. P., EMANUELLI T. Amido resistente: características físico-químicas, propriedades fisiológicas e metodologias de quantificação. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.35, n.4, p. 974-980, 2005.

WANG, L. Z., WHITE, P. J. Structure and properties of amylose, amylopectin, and intermediate materials of oat starches. **Cereal Chemistry**, v.71, p. 263-268, 1994.

WEBER, F.H.; COLLARES-QUEIROZ, F.P.; CHANG, Y.K. Caracterização físico-química, reológica, morfológica e térmicas dos amidos de milho normal, ceroso e com alto teor de amilose. **Ciência e tecnologia de Alimentos**. Campinas, São Paulo. 29(4):748-753. 2009.

WILSON, R.H. & BELTON, P.S. A Fourier-transform infrared study of wheat starch gels. **Carbohydrate Research**, v. 180, p. 339–344, 1988.

ZAMBRANO, F., CAMARGO, C. R. O, TAVARES, D. Amido de mandioca modificado comparado com substitutos de gordura comerciais. **Brazilian Journal of Food Technology**. v. 4, p. 155-161, 2001.

ZOBEL, H. F. X-ray analysis of starch granules. In Whistler, R. L. (ed.). **Methods in carbohydrates chemistry**, v. 4, p. 109-143, 1964.

**CAPÍTULO 2**  
**OTIMIZAÇÃO DE PROTOCOLOS PARA**  
**MICROPROPAGAÇÃO E CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DE**  
**MANDIOCA DE MESA (*Manihot esculenta* CRANTZ)**



## 1. INTRODUÇÃO

A mandioca de mesa (*Manihot esculenta* Crantz - EUPHORBIACEAE), também é conhecida no Brasil como aipim, mandioca doce, mandioca mansa, macaxeira e na língua inglesa como “sweet cassava”, em Frances como “manioc” e “yuca” em espanhol. Esta é a única espécie deste gênero cultivada, abrangendo também a mandioca destinada à indústria (ROGER & APPAN, 1973).

Estudos recentes, agregando evidências obtidas a partir de estudos moleculares e arqueológicos, apontam o Sudoeste da Amazônia, em uma região que compreende os estados do Acre, Rondônia, Tocantins, Goiás e Mato Grosso como sendo definitivamente a região de origem e domesticação da mandioca, acerca de 10 mil a 12 mil anos (OLSEN & SCHAAL, 2001; ALLEM, 2002; CARVALHO, 2005 e MURRAY, 2010).

A raiz desta espécie apresenta na sua composição um alto conteúdo de amido, em torno de 80% de sua massa seca, apresentando inúmeras formas de utilização. Pode ser amplamente utilizada na alimentação humana, na forma de raízes cozidas, frita e/ou processada de outras formas (LANCASTER *et al.*, 1982), como sua transformação em tapioca e farinhas (OBOH & ELUSIYAN, 2007). Também pode ser utilizada para alimentação animal, além da obtenção de outros carboidratos, como a glicose, a maltodextrina e o manitol (BALAGOPALAN, 2002), assim como matéria-prima para diversos segmentos da indústria. Em função da grande quantidade de amido e pela multiplicidade de formas de utilização tornou-se uma das culturas mais importantes nos trópicos úmidos e subtropicais. É cultivada principalmente para o aproveitamento de suas raízes tuberosas na alimentação humana, sendo uma das mais importantes fontes de calorias na dieta (COCK, 1985), particularmente para subsistência de populações menos favorecidas de países em desenvolvimento de regiões tropicais. Possui, portanto, um importante apelo social servindo como alimento energético básico na dieta de mais de 800 milhões de pessoas, em diversos países (NASSAR & ORTIZ, 2010). Atualmente ocupa a terceira posição entre as culturas básicas mais importantes como fonte de calorias na alimentação do mundo, além do arroz e do milho (FAO, 2012).

No Brasil é cultivada em todas as regiões, ocupando papel de destaque na indústria, alimentação humana e animal (OLSEN, 2004; CARVALHO, 2005). Sua exploração agrícola destina-se ao mercado hortícola e às indústrias de transformação. A comercialização das raízes

para uso na alimentação humana se dá principalmente para consumo *in natura*. Porém, segundo Fenimam (2004) há um mercado crescente de produtos industrializados de mandioca para fins gastronômicos/culinários (e.g. mandioca pré-cozida congelada), bem como produtos processados a partir da massa cozida (e.g. croquetes, empanados, bolinhos condimentados) e massas formatadas (e.g. palitos estruturados e fritas tipo “chips”).

A espécie apresenta uma ampla diversidade genética, concentrada principalmente na América Latina e Caribe. Diversidade genética que foi resultado da facilidade de polinização cruzada da espécie, de sua alta heterozigiosidade e da deiscência abrupta dos frutos, sendo a maioria das variedades nativas selecionadas naturalmente, muitas vezes pelos próprios agricultores (FUKUDA & SILVA, 2002). Esta diversidade genética ocorreu basicamente, a partir da seleção natural ocorrida durante o processo de evolução na pré e pós-domesticação da espécie, conservando genes de interesse agrônômico, adaptados a diferentes agroecossistemas e para diferentes formas de uso, resultando numa ampla diversidade de cultivares (HERSHEY, 1988). Nesse contexto, as populações tradicionais (e.g. pequenos produtores familiares) desempenham papel relevante na conservação da agrobiodiversidade, por associarem demandas sociais, uso sustentável dos ecossistemas e conservação de recursos genéticos (ALLEM, 1994). Por sua vez estes materiais podem ser fixados pela reprodução vegetativa, ou ainda utilizados na obtenção de novos acessos via reprodução sexual (KERR & CLEMENT, 1980; MARTINS, 1994).

Por outro lado sabe-se que as espécies silvestres de *Manihot*, possuem grande reservatório de genes úteis para serem transferidos para os cultivares comerciais. No entanto estas têm sido pouco utilizadas nos programas de melhoramento genético, devido à elevada heterozigose, que leva a produção de populações híbridas que segregam para inúmeras diferentes características (NASSAR, 2000). PEREIRA (2008), não negligenciando a importância dos acessos selvagens para os programas de melhoramento genético, enfatiza que as etnovarietades são vistas pelos melhoristas vegetais como um rico reservatório genético que pode ser útil no melhoramento genético de mandioca, na transferência de caracteres genéticos de interesse agrônômico para as variedades comerciais. Segundo PERONI & MARTINS (2004) a variabilidade genética vegetal mantida *on farm* (e.g. quintais, roçados e sistemas agroflorestais) e *in situ* (e.g. florestas e capoeiras), associada ao processo de seleção sociocultural contínua realizada pelos agricultores locais no decorrer da história da agricultura, promoveu a

etnoconservação de algumas espécies alimentares entre elas a mandioca. Desta forma as etnovariedades colecionadas em bancos e coleções de germoplasma possuem potencial para serem usadas de forma direta, como variedades comerciais após seleção criteriosa, ou empregadas nos programas de melhoramento, visando à geração e seleção de novos cultivares. Porém, estes acessos necessitam ser avaliados, pelo menos, quanto aos caracteres botânicos, morfológicos e agronômicos para os fatores de maior importância e de forma regionalizada. Por outro lado o grande número de variedades existentes no Brasil permite a escolha de variedades de acordo com a região e a finalidade de exploração da cultura (SOUZA *et al.*, 2006).

No entanto, a expansão das fronteiras agrícolas e o uso cada vez mais intenso de cultivares melhorados de outras espécies, provocam sensíveis mudanças nos centros de diversificação e como consequência uma valiosa perda de diversificação de germoplasma (erosão genética), sob a forma de espécies silvestres, bem como de variedades tradicionais (EMPERAIRE, 2005), provocados também em outras situações em decorrência do êxodo rural e expansão urbana acelerada (ZUIN *et al.*, 2009). Sendo assim a coleta e o armazenamento, associados à caracterização morfológica, anatômica, botânica, agronômica e da análise genética de germoplasma de mandioca pode minimizar o efeito desta erosão genética (ZUIN *et al.*, 2009).

Neste sentido em razão da grande importância da cultura da mandioca para o país, foram criados e estão sendo mantidos diversos bancos de germoplasma e coleções de trabalho de mandioca com a finalidade de conservar e preservar cultivares comerciais, etnovariedades tradicionais e espécies selvagens de *Manihot* (FUKUDA e GUEVARA, 1998). Estes bancos e coleções de germoplasma conservam a variabilidade genética, visando evitar a perda de genes ou de combinações gênicas, assegurando uma ampla base genética para programas de melhoramento. Outra finalidade dos bancos é a coleta de material cultivado e silvestre, a caracterização botânica, agronômica e a responsabilidade de promover a introdução e intercâmbio destes recursos (FUKUDA *et al.*, 1996).

Neste contexto a Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina-Epagri, através da Estação Experimental de Urussanga, situada no Sul do Brasil, mantém um banco de germoplasma de mandioca com acessos genéticos oriundos de outras instituições de pesquisa do Brasil e internacionais para apoio ao seu programa de melhoramento genético. Além destes a empresa agregou em torno de 200 acessos de mandioca de mesa especificamente oriundos de coletas

realizadas por seu grupo de pesquisa em diversas localidades do Estado de Santa Catarina que estavam sendo mantidos *on farm* por pequenos produtores familiares. Esta coleção de trabalho ao longo dos últimos anos tem sido avaliada baseada em parâmetros eminentemente agrônômicos (produção/produktividade, adaptação, resistência às pragas e/ou doenças...), de caracteres morfofisiológicos e também de alguns aspectos culinários, que evidenciam a existência de uma grande diversidade de diferentes fenótipos (e.g. tamanho de plantas, distribuição de ramos, tipos foliares, produtividade, resistência aos fatores bióticos, coloração das raízes cruas e/ou cozidas...). Ou seja, há uma diversidade genética interessante nestes materiais que têm potencial de ser explorados para seleção e/ou indicação de novas variedades para determinadas regiões de cultivo e/ou de serem utilizados em cruzamentos para obtenção de novos materiais genéticos. Esta caracterização (e.g. agrônômica, química, nutritiva e de produção) é importante em virtude de evidenciar a diversidade de acessos existentes vislumbrando-se a possibilidade de dar um novo enfoque de valorização à cultura da mandioca como alimento, agregando valor ao produto, mas também pela possibilidade de destinação de determinados acessos para a produção de biomassa para obtenção de diferentes produtos de interesse industrial.

Porém não basta se constatar a existência de variabilidade genética dentro dos bancos de germoplasma isoladamente, concomitantemente deve-se vislumbrar formas eficientes de também conservar estes recursos genéticos. Para Brush (2001) a garantia de manutenção da variabilidade genética das espécies cultivadas é essencial ao presente e futuro da humanidade, pois se relaciona diretamente com a evolução da agricultura atual, a qual deve se adequar para garantir a segurança alimentar humana, seja solucionando o problema de fornecimento de alimentos, seja respondendo à crescente procura por alimentos com maior valor nutricional. Tal abordagem é uma preocupação crescente e que tem levado à criação de programas de conservação da diversidade genética dos recursos vegetais, garantindo o acesso e uso destes às futuras gerações (BRUSH, 2001; ALVES *et al.*, 2004).

Particularmente para o Estado de Santa Catarina os trabalhos desenvolvidos pela Epagri com mandioca revestem-se de grande importância por apresentarem um potencial enorme de evolução, principalmente relacionados ao melhoramento genético. Este aspecto é fundamental, considerando-se principalmente os desafios relacionados à conjuntura atual de aquecimento global, a caracterização agrária e sócio-

econômica das propriedades rurais do Estado, a diversidade genética mantida nas coleções oficiais (BAG Epagri) e possivelmente de muitos materiais ainda desconhecidos mantidos por produtores. Este cenário indica que a busca de novos materiais genéticos adaptados, de melhor desempenho agrônômico e que gerem possibilidades de agregação de valor, deverá ser constante, em função da diversidade genética disponível e ainda por acessar. Desta forma o uso de diferentes abordagens biotecnológicas, através da aplicação das técnicas de cultura de células e tecidos vegetais *in vitro*, será fundamental para o desenvolvimento de estratégias que permitam a multiplicação em larga escala e a conservação/manutenção do germoplasma desta espécie, reduzindo também os riscos relativos à perda da variabilidade genética. Permitirá ainda a disponibilização desta diversidade para a continuidade dos trabalhos de melhoramento genético, além da multiplicação e distribuição de material vegetal de determinados acessos aos produtores com garantias de qualidade genética e fitossanitária.

Neste contexto o presente estudo teve como objetivos desenvolver sistemas otimizados de cultura e conservação *in vitro* de acessos de mandioca de mesa (*Manihot esculenta* Crantz), com ênfase em acessos pigmentados, através da aplicação de diferentes abordagens biotecnológicas associadas às técnicas de cultura de células e/ou tecidos vegetais. A aplicação destas abordagens possibilitou o desenvolvimento de protocolos otimizados de micropropagação (isolamento/estabelecimento, multiplicação/enraizamento *in vitro* e aclimação) bem como de protocolo simplificado e eficiente de conservação/preservação de germoplasma *in vitro* através da utilização de metodologia de limitação do crescimento *in vitro* associada ao cultivo em meio de cultura com alta concentração de sacarose. Foram testadas também metodologias de encapsulamento de explantes em alginato e inoculação em meios limitantes ao crescimento/desenvolvimento dos explantes, bem como a aplicação de técnicas de criopreservação de ápices e segmentos nodais.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 MATERIAL VEGETAL

Ramos de mandioca de mesa (*Manihot esculenta* Crantz) de cinco acessos genéticos diferentes, identificados pelos códigos numéricos 74, 58, 60, 52 e 81, foram fornecidos pela Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina S.A-Epagri por intermédio da Estação Experimental de Urussanga, onde é mantido o Banco de germoplasma desta espécie no Estado de Santa Catarina. Estas hastes, de aproximadamente um metro de comprimento, foram coletadas de plantas com cerca de 8 meses de idade, produzidas na safra 2009/2010. O plantio foi realizado em uma área de Argisolo pertencente à estação experimental e foi conduzido sob manejo convencional. Após a colheita, as raízes foram retiradas e as hastes foram armazenadas sob sombreamento, durante um período de dois meses. Após os experimentos iniciais de indução de brotamento, em condições assépticas, os demais experimentos foram conduzidos utilizando-se como material biológico somente o acesso genético de número 52.

### 2.2 ESTABELECIMENTO *EX VITRO* E *IN VITRO* DE CULTURAS SEMI-AXÊNICAS E AXÊNICAS DE *Manihot esculenta* CRANTZ

#### 2.2.1 Indução de brotamento de gemas em segmentos de ramos (manivas) *ex vitro*, em condições semi-assépticas

Os ramos matrizes foram submetidos inicialmente a um processo inicial de pré-desinfecção, que constou de uma lavagem superficial com água corrente e detergente. Logo, foram cortados em toletes (manivas) de 15-20 cm de comprimento, contendo de 3 a 5 gemas axilares e/ou em segmentos menores (5 a 10 cm), contendo uma ou duas gemas axilares. Estes segmentos foram então imersos em uma solução de BENLAT 0.1% (w/v), durante trinta minutos e foram plantados em bandejas de plástico transparente, “tipo croissant” (150X250X50 mm). As bandejas foram desinfetadas internamente com hipoclorito de sódio comercial, com 2,5% de cloro ativo, contendo como substratos folhas triplas de papel toalha e/ou areia lavada (3 cm) esterilizados. O plantio foi realizado em câmara de fluxo laminar, nos substratos umedecidos com água destilada/esterilizada. Posteriormente as bandejas foram fechadas com suas tampas plásticas transparentes, mantendo o ambiente interno com alta umidade. As culturas foram mantidas em sala de crescimento,

em temperatura de  $25^{\circ}\text{C}\pm 2$ , sob fotoperíodo de 16 horas, com fluxo de fótons de  $22.3 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , providos por lâmpadas fluorescentes Phillips TDL e umidade relativa em torno de 70%. Estas condições ambientais foram utilizadas nos demais experimentos de cultura *in vitro*, exceto quando especificado. As culturas foram nebulizadas com água destilada esterilizada a cada dois dias e com solução de BENLAT 0,1% (w/v) a cada três dias com borrifador manual.

Os ramos obtidos, pela brotação das gemas axilares, foram removidos dos segmentos de manivas, a partir do sétimo dia após a montagem do experimento, logo submetidos à desinfecção e inoculados em meio de cultura, conforme descrito abaixo (item 8.2.2). Os ramos originados das brotações subsequentes foram também retirados a cada sete dias. Foram utilizados ramos obtidos até a terceira brotação, para a formação inicial de um conjunto de plantas axênicas em número suficiente para a realização dos demais experimentos.

Os experimentos foram avaliados diariamente, do quinto ao décimo dia após a implantação, quanto aos seguintes parâmetros: percentual de gemas viáveis brotadas, para cada tipo de haste (maniva); número de explantes (segmentos nodais e apicais), que puderam ser removidos a partir de cada broto formado para inoculação *in vitro*; percentual de inibição de brotamento de gemas pela dominância apical nos dois diferentes tamanhos de segmentos de haste utilizados; percentual de contaminações, incidência de contaminações fúngicas e/ou bacterianas, em cada substrato no momento da retirada das brotações.

### **2.2.2 Desinfecção e estabelecimento *in vitro* de segmentos nodais e apicais de ramos obtidos a partir da brotação das gemas de segmentos de manivas, mantidas *ex vitro* em condições semi-assépticas**

Ramos, obtidos nas condições descritas no item 8.2.1 tiveram suas folhas removidas, foram lavados com detergente neutro em água corrente e submetidos aos seguintes tratamentos de desinfecção em câmara de fluxo laminar, a saber:

**Tratamento 1-** Imersão em álcool (70%), durante um minuto e em seguida imersão em hipoclorito de sódio (2,5% cloro ativo), por três minutos.

**Tratamento 2-** Imersão em álcool (70%), durante um minuto e em seguida imersão em hipoclorito de sódio (2,5% cloro ativo), por cinco minutos.

**Tratamento 3-** Imersão em álcool (70%), durante um minuto e trinta segundos e em seguida imersão em hipoclorito de sódio (2,5% cloro ativo), por três minutos.

**Tratamento 4-** Imersão em álcool (70%), durante um minuto e trinta segundos e em seguida imersão em hipoclorito de sódio (2,5% cloro ativo), por cinco minutos.

Após cada intervalo de tempo de imersão, em cada solução desinfetante, os ramos foram lavados 5 vezes com água destilada esterilizada, seccionados em segmentos nodais e apicais de 0,8 a 1,0 cm de comprimento (microestacas com uma única gema) e inoculados em tubos de ensaio (20 x 150 mm), contendo 5 ml de meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962; Sigma Co., USA), suplementado com 3% (w/v) de sacarose e 0,2% (w/v) de fitagel (Phytigel™, Sigma Co., USA), com pH ajustado para 5,8 pela adição de NaOH 0,1M ou HCL 0,1N e autoclavados por 20 minutos a 1.1Kg/cm<sup>2</sup>, em temperatura de 120°C. (Obs: esta metodologia de preparação de meio de cultura foi utilizada para todas as circunstâncias que envolveram a elaboração de meios de cultura, independente de sua composição).

As culturas foram mantidas em sala de crescimento nas mesmas condições de temperatura, fotoperíodo e umidade relativa descritas no item 8.2.1, sendo avaliadas no décimo dia após a inoculação, quanto ao percentual de explantes limpos (desinfetados), mortos e/ou contaminados. As microplantas produzidas a partir dessas culturas foram utilizadas como fontes de explantes para os experimentos de multiplicação, enraizamento, aclimatação e de criopreservação.

## 2.3 MICROPROPAGAÇÃO DE *Manihot esculenta* CRANTZ – ACESSO GENÉTICO 52

### 2.3.1 Multiplicação in vitro

As sucessivas subculturas das microplantas, produzidas conforme descrito no item 8.2.2, foram realizadas de acordo com o seguinte procedimento: segmentos nodais (medianos e basais) e/ou ápices de 0,5 a 0,8 cm, contendo uma única gema foram excisados das microplantas de 60 dias de idade e inoculados em tubos de ensaio (20 x 150 mm) contendo 5 ml de meio de cultura MS, suplementado com 4% (w/v) de sacarose e 0,2% (w/v) de fitagel, preparado sob as mesmas condições descritas no item 8.2.2.

As culturas foram mantidas em sala de crescimento nas mesmas condições descritas no item 8.2.1. Estas culturas foram avaliadas

diariamente durante 16 dias, a partir do quinto dia após a inoculação, quanto à velocidade de brotamento das gemas e formação de raízes nos explantes. Ao final de 16 dias de cultivo, as culturas foram avaliadas quanto à frequência de formação de ramos, enraizamento e de formação eventual de calos. Aos 40 dias de cultivo foram avaliadas também em relação ao comprimento do caule e número total de nós formados. Foram utilizadas 3 repetições contendo no mínimo 12 microplantas cada.

### **2.3.2 Efeito do BAP sobre a indução do brotamento de gemas e formação de raízes em segmentos nodais cultivados *in vitro***

Segmentos nodais, contendo somente uma única gema, medindo de 0,5 a 0,8 cm de comprimento, foram excisados de microplantas axênicas de *M. esculenta* com 40-60 dias de idade. Estes segmentos tiveram as folhas retiradas e os explantes foram inoculados em tubos de ensaio (20 x 150 mm) contendo 5 ml de meio MS, suplementado com 4% (w/v) de sacarose, 0,2% (w/v) de fitagel e do regulador de crescimento BAP (6-benzilaminopurina) nas concentrações de 0,0; 0,01; 0,05; 0,125; 0,25; 0,5 e 1,0 mg/l.

As culturas foram mantidas nas mesmas condições descritas no item 8.2.1 e avaliadas diariamente a partir do quinto dia, após a inoculação até o décimo segundo dia, quanto à frequência e velocidade de brotamento das gemas, formação de raízes e de calos. Foram utilizadas 3 repetições de no mínimo 12 explantes por tratamento.

### **2.3.3 Aclimação de microplantas de *Manihot esculenta* Crantz – Acesso 52 produzidas *in vitro***

As microplantas obtidas a partir de segmentos nodais foliares (0,5-0,8 cm) cultivados durante 45 dias em meio MS, suplementado com 4% (w/v) de sacarose, 0,2% (w/v) de fitagel e de 0,01 mg/l de BAP (6-benzilaminopurina) foram transferidas para condições *ex vitro*, sendo transplantadas para copos plásticos com capacidade de 150 ml, contendo três diferentes substratos esterilizados: areia de rio lavada, mistura de areia lavada e substrato comercial (1:1) e substrato comercial (MECPLANT®) somente. Nas duas primeiras semanas os copos com as plantas transplantadas permaneceram dentro de caixas plásticas opacas de 340x340x150 mm, fechadas com filme de PVC e mantidas nas mesmas condições descritas no item 8.2.1. Durante esse período as plantas foram nebulizadas com água destilada, a cada dois dias, com

borrifador manual. A partir do sétimo dia, após a transferência, as plantas foram submetidas a uma exposição gradual à umidade ambiental em torno de 70%, pela perfuração do filme de PVC, sendo totalmente expostas a esta condição ao final da segunda semana, pela retirada total do filme. Neste período, as plantas continuaram sendo regadas e nebulizadas manualmente, duas vezes por semana, até o final da terceira semana, a partir da qual foram somente regadas duas vezes por semana, porém não nebulizadas.

A sobrevivência e o crescimento inicial das plantas aclimatadas nos diferentes substratos foram avaliados durante a transferência (tempo zero) e aos 15, 20, 30 e 45 dias após o transplante, quanto aos seguintes parâmetros: altura da parte aérea (cm), número de folhas/nós foliares e taxa de sobrevivência. Foram avaliadas ainda as massas frescas das plantas durante o transplante (tempo zero) e ao final de 45 dias. Para estas avaliações foram utilizadas 15 plantas de cada tratamento.

## 2.4 CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DE GERMOPLASMA DE *Manihot esculenta* CRANTZ – ACESSO 52

### 2.4.1 Restrição do crescimento *in vitro*

#### 2.4.1.1 Efeito de diferentes concentrações de sacarose sobre a conservação *in vitro* de microplantas *Manihot esculenta* Crantz – acesso 52

Microplantas com duas semanas de cultivo, possuindo no mínimo uma raiz, obtidas a partir da subcultura de segmentos nodais e/ou apicais em meio de multiplicação/regeneração composto por MS, suplementado com 4% (w/v) de sacarose, 0,2% (w/v) de Fitagel e 0,01mg/l de BAP, foram transferidas para meio de cultura MS suplementado com 0,2% (w/v) de Fitagel e com sacarose nas concentrações de 4, 6, 8 e 10% (w/v). Para cada concentração de sacarose testada foram estabelecidos quatro lotes, com 15 microplantas cada, inoculadas individualmente em tubos de ensaio de 20 x 150 mm.

As culturas foram mantidas por 3, 6, 9 e 12 meses, nas condições descritas no item 8.2.1. Aos 6 meses de armazenamento, cada tubo de cada tratamento, dos lotes que posteriormente foram avaliados aos 9 e 12 meses de armazenamento, recebeu um “reforço” de 2 ml de solução estéril de sacarose nas concentrações respectivas de cada lote, a saber 6, 8 e 10% (w/v).

Ao final de cada período de armazenamento, as microplantas foram avaliadas quanto à sobrevivência, ao crescimento (altura e número de nós) e à viabilidade, capacidade de regeneração, dos explantes (segmentos nodais e ápices) removidos das microplantas armazenadas e inoculados em meio de multiplicação/regeneração.

Foram utilizadas no mínimo 15 microplantas, para avaliação do crescimento e 4 repetições de 12 microplantas, para avaliar a sobrevivência das microplantas nos meios com diferentes concentrações de sacarose. Para avaliar a manutenção da viabilidade (capacidade de brotamento e enraizamento em meio de multiplicação/regeneração) dos explantes oriundos das microplantas submetidas aos tratamentos de conservação, no mínimo 15 explantes de cada tratamento foram utilizados.

#### 2.4.1.2 Efeito de diferentes concentrações de Phytigel sobre a conservação *in vitro* de segmentos nodais, encapsulados em alginato, de *Manihot esculenta* Crantz – acesso 52

Segmentos nodais axilares, com aproximadamente 0,5 cm de comprimento, foram excisados de plântulas axênicas de *M. esculenta* com 60 dias de idade, e foram encapsulados em alginato de cálcio. As cápsulas de alginato de cálcio foram produzidas de acordo com o método descrito por KINOSHITA & SAITO (1990), com adaptações. Os explantes foram imersos em meio de cultura MS, com a metade da concentração salina, suplementado com 4% (w/v) de alginato de sódio. Em seguida, foram coletados juntamente com uma alíquota de 0,2 ml de meio de cultura com alginato, com auxílio de uma pipeta, e posteriormente cada gota contendo um explante foi imersa numa solução estéril de 1,4% (w/v) de cloreto de cálcio, onde permaneceram durante 20 minutos para polimerização das cápsulas. As cápsulas formadas, contendo um único explante, foram armazenadas em tubos de ensaio 20 X 150 mm, contendo, cada tubo, 8 ml de meio de cultura MS suplementado apenas com fitagel, nas concentrações de 0,1; 0,2 e 0,3 % (w/v).

As culturas foram mantidas nos meios de armazenamento por 3, 6, 9 e 12 meses, nas mesmas condições descritas no item 8.2.1. Para cada tratamento foram utilizadas 4 repetições, com 10 cápsulas cada.

Após cada período de armazenamento, as cápsulas foram transferidas individualmente para tubos de ensaio contendo o meio de cultura de multiplicação/regeneração (MS, suplementado com 4% (w/v) de sacarose, 0,2% (w/v) de Phytigel e 0,01 mg/l de BAP). As

porcentagens de explantes encapsulados regenerados foram avaliadas ao final de 30 dias, após a transferência das cápsulas para o meio de multiplicação/regeneração.

#### **2.4.2 Desenvolvimento de métodos para a criopreservação de ápices e segmentos nodais de *Manihot esculenta* Crantz – acesso 52**

Ápices e segmentos nodais (tamanho de em torno de 0,5 cm) foram removidos de microplantas com 45 dias de idade mantidas em meio de cultura MS semi-sólido acrescido de 4% sacarose, 0,2% de fitagel e 0,01 mg/l de BAP e foram submetidos aos procedimentos de desidratação química e vitrificação do protocolo proposto por Charoensub *et al.* (2003), com adaptações. Inicialmente o protocolo utilizado seguiu as seguintes etapas:

1. Pré-cultura dos explantes em meio líquido MS, com 0,3 M de sacarose (**Solução 1**), durante 16 horas, em temperatura ambiente (25°C).
2. Transferência dos explantes dos frascos de pré-cultura para criotubos (1,8 ml) contendo uma mistura osmoprotetora (**Solução 2**) de 0,4 M de sacarose em meio MS (NISHIZAWA *et al.*, 1992), com adaptações, acrescida de 2 M de glicerol, por 20 minutos em temperatura ambiente (25°C). Foram utilizados 10 explantes por criotubo.
3. Remoção dos explantes da solução 2, com auxílio de micropipeta e transferência para a solução de vitrificação (**Solução 3**), altamente concentrada (PVS2-7,8 M) (SAKAI *et al.*, 1990), contendo 30% de glicerol (w/v), 15% de etileno glicol (w/v) e 15% de DMSO em meio de cultura MS, com metade da concentração salina e com 0,4 M de sacarose, para lavagem dos explantes sob agitação.
4. Após agitação, remoção da **solução 3** e adição da solução PVS2 fresca (**solução 3**), mantendo-se em temperatura ambiente (25 °C) durante 45 minutos (CHAROENSUB *et al.*, 1999). Após este período, esta solução foi drenada e substituída por 0,5 ml de solução 3, por criotubo (1,8 ml), e em seguida foram imersos diretamente em nitrogênio líquido (-196 °C) por 2 horas.
5. Após o período em nitrogênio líquido, procedeu-se ao descongelamento rápido, em que os criotubos foram retirados do nitrogênio líquido e colocados em água (banho Maria a 45° C),

durante 1 minuto, sob agitação. Na sequência a **solução 3** foi drenada dos criotubos, substituída por 1,5 ml de solução de meio de cultura MS, acrescida de 1,2 M de sacarose (**Solução 4**), por 20 minutos. Após este período os explantes foram transferidos para meio de cultura de regeneração/multiplicação (MS acrescido de 4% sacarose, 0,01 mg/l de BAP e 0,2% de fitagel). Ressalta-se que a etapa do protocolo original de Charoensub *et al.* (2003), que preconizava que os explantes permanecessem durante um período de 24 horas sobre discos de papel filtro esterilizado, colocados sobre meio de cultura MS semi-sólido, em placas de Petri, antes de serem inoculados no meio de regeneração, não foi realizada no presente estudo. As culturas foram mantidas nas condições descritas no item 8.2.1 e avaliadas quanto à sobrevivência, após 30 dias de cultivo.

Nos tratamentos realizados neste estudo foram acrescentados, na etapa 1 do protocolo descrito, além do período de 16 horas de imersão na solução 1, os tempos de imersão de 24 e 40 horas.

## 2.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Todos os experimentos foram montados de acordo com o delineamento estatístico completamente casualizado. Os resultados foram analisados estatisticamente através de análise de variância simples (ANOVA), com separação de médias pelo teste de Tukey, ao nível de significância de 5% ( $p \leq 0,05$ ). Os cálculos foram realizados com o auxílio dos softwares estatísticos STATGRAPHICS Centurion XVI.I e StatPlus 2009.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 MICROPROPAÇÃO DE MANDIOCA DE MESA (*Manihot esculenta* CRANTZ)

##### 3.1.1 Estabelecimento *ex vitro* de culturas semi-axênicas de mandioca de mesa (*Manihot esculenta* Crantz)

3.1.1.1 Efeito de tipos de substratos e de tipos de segmentos de manivas sobre a indução de brotamento de gemas, *ex vitro*, em condições semi-assépticas

Na **tabela 5** são apresentadas as porcentagens de brotamento de segmentos de ramos (manivas), contendo de 3 a 5 gemas axilares, de 5 acessos de mandioca de mesa (*M. esculenta* Crantz) avaliados aos 5 e 10 dias, após a implantação em substrato de papel toalha. Observa-se que, no quinto dia após o início dos experimentos os percentuais de brotação das gemas para os acessos genéticos 74, 58, 60, 52 e 81 foram, respectivamente, de 81,26%; 68,03%; 51,36%; 73,10% e 68,93%, alcançando, após 10 dias percentuais que variaram de 90,70; 84,23; 55,53; 80,96 e 72,63% nos acessos de número de identificação 74, 58, 60, 52 e 81, respectivamente. Em todos os acessos testados, o brotamento ocorreu somente a partir da gema mais distal dos segmentos de manivas, ocorrendo inibição das demais. Após 15 dias de implantação ocorreu uma intensa contaminação fúngica, que inviabilizou a realização das avaliações subseqüentes, provocando a morte das brotações originadas anteriormente, bem como inviabilizando o brotamento das gemas remanescentes.

**Tabela 5:** Percentual de brotamento de gemas de segmentos de ramos de 5 acessos de mandioca de mesa contendo de 3 a 5 gemas em substrato papel toalha sob condições semi-asepticas. Avaliações ocorreram aos 5 e 10 dias após a implantação.

Acessos Genéticos	Tempo (dias)	
	5	10
74	<sup>z</sup> 81,26	90,70
58	68,03	84,23
60	51,36	55,53
52	73,10	80,96
81	68,93	72,63

<sup>z</sup>Valores (%) são proporções obtidas de no mínimo 23 gemas pré-existentes por tratamento.

Com a ocorrência de intensa contaminação fúngica utilizando-se o substrato de papel toalha foi realizado o segundo experimento, utilizando-se como substrato a areia esterilizada e segmentos de ramos (manivas), contendo somente uma e/ou duas gemas. As avaliações dos percentuais de brotamento das gemas ocorreram diariamente, durante um período de 10 dias. Neste experimento e nos experimentos subsequentes utilizou-se somente o acesso 52 como material biológico, em função da quantidade de ramos matrizes disponíveis.

Observa-se na **Tabela 6** e **Figura 12 (Apêndices)** que, no substrato de areia esterilizada a taxa de brotamento média foi de 70,33%, após 10 dias de implantação, enquanto que no substrato papel toalha esta foi de 61%, não sendo significativamente diferentes. Apesar de não terem sido realizadas as análises estatísticas, verifica-se ao longo de todo período de avaliação as taxas de brotamento no substrato de areia se mostraram superiores aos obtidos no substrato de papel toalha. Novamente neste experimento, no substrato de papel toalha, a partir do décimo dia de implantação foi observada contaminação saprofítica. Em ambos os substratos as taxas de brotamento se estabilizaram a partir do décimo dia de implantação.

**Tabela 6:** Percentual de indução de brotamento de gemas de segmentos de ramos (manivas) de mandioca de mesa (*M. esculenta* - acesso 52) contendo 1 ou 2 gemas, em dois diferentes substratos sob condições semi-asepticas, avaliados diariamente durante 10 dias a partir do quinto dia de implantação.

Substratos	Tempo (dias)					
	5	6	7	8	9	10
Areia	<sup>z</sup> 53,67	56,67	59,33	63,00	64,33	70,33a
Papel toalha	37,33	38,67	43,00	43,00	54,00	61,00a

<sup>z</sup>Valores (%) representam a média de três repetições, que continham com no mínimo 23 gemas pré-existentes cada, seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si, de acordo com o teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

Observou-se que nos segmentos de ramos com até duas gemas ocorreu o brotamento das gemas em sua totalidade. As brotações formadas a partir destas gemas iniciais da maniva matriz, originaram ramos que apresentaram, aos sete dias, após a indução de brotamento, independentemente do substrato utilizado, em média cinco gemas

(quatro axilares e uma apical), com potencial para utilização como fontes de explantes de segmentos nodais e apicais, para as subseqüentes etapas de desinfecção, isolamento e inoculação para o cultivo *in vitro*.

Os ramos originados pela brotação das gemas dos segmentos de manivas foram removidos, de forma que foram deixadas as gemas basais remanescentes, que brotaram posteriormente originando novos ramos. Assim, foi possível fazer até duas novas retiradas de ramos, em intervalos de sete dias. Estes ramos apresentavam gemas axilares e apicais em quantidade e com qualidade semelhante aos obtidos inicialmente. Entretanto, a partir da terceira coleta, apesar de serem produzidas maiores quantidades de ramos, estes eram menos vigorosos, com entrenós muito curtos, ocorrendo também o aparecimento significativo de contaminantes saprófitos.

### **3.1.2 Estabelecimento *in vitro* de culturas axênicas de *Manihot esculenta* Crantz (Acesso 52) a partir de segmentos nodais e apicais de ramos obtidos em condições semi-assépticas**

#### **3.1.2.1 Desenvolvimento de protocolos de desinfecção de segmentos nodais e apicais de ramos obtidos em condições semi-assépticas**

Os experimentos, cujos resultados são apresentados a seguir, foram realizados com o objetivo de otimizar o protocolo de desinfecção dos explantes de segmentos nodais e apicais, removidos dos ramos produzidos em condições semi-assépticas, conforme o item 1 desta seção. Foram testados os tratamentos de desinfecção descritos no item 8.2.2 (materiais e métodos) em que foram manipulados os tempos de imersão dos explantes em álcool 70% e em solução comercial de hipoclorito de sódio, contendo 2,5% de cloro ativo:

Os resultados obtidos nos diferentes tratamentos estão demonstrados na **Tabela 7**. Observa-se que o tratamento 3 (imersão dos explantes em álcool (70%) durante um minuto e trinta segundos e em seguida imersão em hipoclorito de sódio (2,5% cloro ativo) por três minutos foi o mais eficiente na assepsia dos explantes, possibilitando a obtenção de um maior percentual (90%) de culturas axênicas, diferindo significativamente dos demais. Nos tratamentos em que os explantes foram submetidos a um maior tempo de imersão em hipoclorito de sódio (5 minutos) ocorreu maior percentual de mortes, entre 30 e 45%, nos tratamentos 2 e 4, respectivamente. De maneira geral, considerando-se o somatório de culturas contaminadas juntamente com as mortes provocadas pela toxicidade em relação ao tempo de exposição (imersão)

dos explantes às soluções desinfetantes utilizadas, o tratamento 3 foi o mais efetivo e de menor efeito nocivo aos explantes, pois apresentou maior porcentagem de descontaminação e menor porcentagem de explantes contaminados e mortos.

**Tabela 7:** Efeito de diferentes tempos de imersão em álcool 70% e em solução comercial de hipoclorito de sódio sobre a desinfecção de explantes (segmentos nodais e/ou apicais) de mandioca de mesa (*M. esculenta* - Acesso 52), oriundas de brotações obtidas em condições semi-assépticas.

Tratamentos	Limpos (%)	Contaminados (%)	Mortes (%)
1	<sup>Z</sup> 70,4 bc	29,6 bc	12,1 a
2	80,0 ab	20,0 ab	30,0 b
3	90,0 a	10,0 a	27,5 b
4	60,0 c	40,0 c	45,0 c

<sup>Z</sup>Média de quatro repetições, que continham no mínimo dez explantes (segmentos nodais e/ou apicais), seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si, de acordo com o teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

### 3.1.3 Multiplicação e enraizamento *in vitro*

3.1.3.1 Brotamento e enraizamento *in vitro* de segmentos nodais e apicais, cultivados na ausência de reguladores de crescimento.

Para o estabelecimento de um conjunto de microplantas cultivadas em condições axênicas, como fontes de explantes para os experimentos subseqüentes, os explantes axênicos (segmentos apicais e nodais), obtidos através dos protocolos de desinfecção descritos no item 8.2.1, foram inoculados em meios de cultura MS semi-sólido, suplementado com 4% de sacarose e 0,2% de Phytigel, isento de reguladores de crescimento. Após 60 dias de cultivo, as microplantas originadas foram utilizadas para multiplicar o acesso em estudo.

Nas **Tabelas 8 e 9** são apresentados respectivamente os resultados da avaliação das capacidades de brotamento e enraizamento dos diferentes tipos de explantes, em meio de cultura MS desprovido de reguladores de crescimento.

Os dados da **Tabela 8** indicam que os segmentos apicais apresentaram 100% de brotamento já aos seis dias de cultivo, enquanto

os segmentos nodais medianos e basais apresentaram, no mesmo período, 54,58% e 51,67%, respectivamente. Ao final de dezesseis dias de cultivo os percentuais totais de brotamento obtidos foram de 72,08%, para segmentos nodais medianos, de 71,67%, para os segmentos nodais basais e de 100% para os segmentos apicais, diferindo significativamente dos demais explantes.

**Tabela 8:** Percentuais de brotamento de diferentes explantes (segmentos nodais basais, segmentos nodais medianos e segmentos apicais), obtidos de microplantas de mandioca de mesa (*M. esculenta* - acesso 52) cultivadas *in vitro*, durante 60 dias, em meio de cultura MS semi-sólido, suplementado com 4% de sacarose, 0,2% de Phytigel e isento de reguladores de crescimento. Avaliações ocorreram diariamente, durante dezesseis dias a partir do quinto dia de inoculação.

Tipos de Explantes	Tempo (dias)											
	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Segmentos nodais basais	38,33	51,67	61,67	66,67	66,67	66,67	66,67	68,33	70,00	71,67	71,67	71,67 b
Segmentos nodais medianos	54,58	54,58	58,33	60,42	65,83	65,83	65,83	67,91	70,00	70,00	70,00	72,08 b
Segmentos apicais	75,00	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0 a

<sup>2</sup>Valores são proporções médias obtidas de 3 repetições de no mínimo 12 culturas, onde os valores seguidos pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

Os resultados da **Tabela 9** indicam que os explantes demonstraram, também, distintas capacidades de enraizamento sob estas condições de cultivo. Assim, utilizando-se segmentos apicais obteve-se, já a partir do décimo dia de cultivo, em média 100% dos explantes com formação de raízes, originando microplantas completas, enquanto que em segmentos nodais medianos e basais os percentuais máximos de enraizamento de 55,83% e 73,33%, respectivamente, foram alcançados somente aos dezesseis dias de cultivo, não variando posteriormente.

**Tabela 9:** Percentuais de enraizamento de diferentes explantes (segmentos nodais basais, segmentos nodais medianos e segmentos apicais), obtidos de microplantas de mandioca de mesa (*M. esculenta* - acesso 52) cultivadas *in vitro*, durante 60 dias, em meio de cultura MS semi-sólido, suplementado com 4% de sacarose, 0,2% de Phytigel e isento de reguladores de crescimento. Avaliações ocorreram diariamente, durante dezesseis dias a partir do quinto dia de inoculação.

Tipos de Explantes	Tempo (dias)											
	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Segmentos nodais basais	0,00	0,00	23,33	26,67	33,33	46,67	60,00	66,67	68,33	68,33	73,33	73,33 b
Segmentos nodais medianos	0,00	2,08	2,08	12,50	18,33	18,33	27,08	29,17	35,00	45,41	48,75	55,83 b
Segmentos apicais	0,00	48,89	75,00	83,89	83,89	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0 a

<sup>Z</sup>Valores são proporções médias obtidas de 3 repetições de no mínimo 12 culturas, onde os valores seguidos pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

Para uma melhor visualização dos resultados apresentados nas **Tabelas 8 e 9**, as **Figuras 13 e 14 (Apêndices)** demonstram, respectivamente, a capacidade de brotamento e enraizamento dos diferentes tipos de explantes. Observa-se que, a capacidade de resposta, evidenciadas, tanto pela velocidade de brotamento e enraizamento quanto pela capacidade máxima de formação, tanto de brotos quanto de raízes em segmentos apicais, foi superior, em relação aos demais explantes. Constata-se ainda que a resposta fisiológica de formação de raízes nos explantes, independente do tipo, ocorreu posteriormente ao estímulo de brotamento. Verifica-se, também, que houve uma relação proporcional entre o brotamento, a formação da primeira folha e o surgimento do primórdio radicular e posterior formação de raízes em segmentos nodais basais e apicais, em percentuais similares aos de brotamento. Para os segmentos nodais medianos, contudo, não houve esta similaridade entre percentuais de explantes brotados (72,08%) e enraizados (55,83%), o que restringiu os percentuais de formação de microplantas completas em relação aos segmentos apicais e nodais basais.

### 3.1.3.2 Efeito de diferentes concentrações de BAP sobre a indução do brotamento de gemas e formação de raízes em segmentos nodais de mandioca de mesa (*Manihot esculenta* – Acesso 52)

Os efeitos de diferentes concentrações da citocinina sintética BAP sobre a frequência de indução de brotamento e/ou enraizamento em segmentos nodais de mandioca de mesa (*M. esculenta* - acesso 52), cultivados em meio de cultura MS semi-sólido, acrescido de 4% de sacarose, são apresentados nas **Tabelas 10 e 11**, bem como demonstrados nas **Figuras 15 e 16 (Apêndices)**. Observa-se que concentrações crescentes de BAP inibiram mais drasticamente o brotamento da gema axilar dos segmentos nodais, sendo que as taxas de brotamento total, ao final de dezesseis dias de cultivo foram de 72,08; 100; 100; 86,66; 57,77; 33,33 e 2,22%, respectivamente, para os meios de cultura com concentração de 0,0; 0,01; 0,05; 0,12; 0,25; 0,50 e 1,00 mg/l de BAP. Nos tratamentos em que houve maior grau de inibição do brotamento os explantes apresentaram um aspecto vitrificado. Os percentuais máximos de indução de brotamento (100%), ocorreram nos meios de cultura com 0,01 e 0,05 mg/l de BAP diferindo significativamente dos demais.

**Tabela10:**Efeito de diferentes concentrações de BAP sobre a indução de brotamento (%) das gemas de segmentos nodais de mandioca de mesa (*M. esculenta* – acesso 52) cultivados *in vitro* em meio MS semi-sólido acrescido de 4% de sacarose durante um período de 16 dias. Avaliações ocorreram diariamente durante dezesseis dias a partir do quinto dia de inoculação.

BAP (mg/l)	Tempo (dias)											
	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
0,00	<sup>z</sup> 54,58	54,58	58,33	60,42	65,83	65,83	65,83	67,91	70,0	70,0	70,0	72,08 b
0,01	68,88	73,33	77,78	88,88	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0 a
0,05	46,67	64,44	73,33	86,66	97,78	97,78	97,78	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0 a
0,12	17,78	35,55	37,77	73,33	75,55	75,55	75,55	75,55	80,0	84,44	86,66	86,66 b
0,25	8,88	15,55	15,55	48,88	51,11	53,33	53,33	53,33	57,77	57,77	57,77	57,77 bc
0,50	2,22	4,44	11,11	13,33	17,77	24,44	28,88	31,11	33,33	33,33	33,33	33,33 c
1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,22	2,22	2,22	2,22	2,22	2,22	2,22	2,22 d

<sup>z</sup>Valores (N=36) são proporções médias obtidas de 3 repetições de no mínimo 12 culturas, onde os valores seguidos pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

Da mesma forma como ocorreu com o enraizamento de diferentes explantes em meio de cultura MS, desprovido de reguladores de crescimento, os explantes enraizados nos meios de cultura contendo 0,0 e 0,01 mg/l de BAP apresentaram incremento significativo a partir do efetivo brotamento das gemas e formação da primeira folha dos segmentos nodais. O maior percentual de enraizamento (95,55%) ocorreu no meio contendo 0,01 mg/l de BAP. De maneira contrária, esta resposta morfogênica foi totalmente inibida (0,0%) no meio com 1,00 mg/l deste regulador de crescimento. De maneira geral, nos meios de cultura com concentrações de BAP superiores a 0,05 mg/l houve inibição bastante acentuada da formação de raízes nos explantes. Nestes meios de cultura ocorreu a formação de calos rígidos, vitrificados, na base dos explantes e a parte aérea das microplantas apresentava-se com sintomas de hiperhidricidade. Salienta-se que o engrossamento da base dos explantes e posterior formação do referido calo, bem como o aspecto vitrificado da parte aérea (hiperhidricidade) foi perceptível desde as primeiras avaliações, que ocorreram a partir do quinto dia após a inoculação.

**Tabela 4:** Efeito de diferentes concentrações de BAP sobre o enraizamento (%) de segmentos nodais de mandioca de mesa (*M. esculenta* – acesso 52) cultivados *in vitro* em meio MS semi-sólido acrescido de 4% de sacarose durante um período de 16 dias. Avaliações ocorreram diariamente durante dezesseis dias a partir do quinto dia de inoculação.

BAP (mg/l)	Tempo (dias)											
	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
0,00	<sup>z</sup> 0,0	2,08	2,08	12,5	18,33	18,33	27,08	29,17	35,0	45,41	48,75	55,83 b
0,01	0,0	2,22	15,55	44,44	66,67	88,89	91,11	95,55	95,55	95,55	95,55	95,55 a
0,05	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,22	4,44	6,66	6,66	8,88	11,11	11,11 c
0,12	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0f
0,25	0,0	0,0	0,0	0,0	2,22	2,22	2,22	2,22	4,44	4,44	4,44	4,44 d
0,50	0,0	0,0	0,0	0,0	2,22	2,22	2,22	2,22	2,22	2,22	2,22	2,22 e
1,00	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0f

<sup>z</sup>Valores são proporções médias obtidas de 3 repetições de no mínimo 12 culturas, onde os valores seguidos pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

### 3.1.4 Aclimação

A porcentagem de sobrevivência *ex vitro* das plântulas de mandioca de mesa micropropagadas em meio de cultura MS semi-sólido acrescido de 4% de sacarose e 0,01 mg/l de BAP foi de 100%, após 45 dias de transferência, em todos os substratos de aclimação testados. No entanto, ao final de 45 dias as plântulas transplantadas no substrato areia apresentavam-se bastante debilitadas em relação ao vigor, tendo ocorrido a senescência quase que completa das folhas, permanecendo somente a folha apical, de tamanho bastante reduzido e de coloração amarelada, enquanto que em substrato comercial e mistura de areia e substrato comercial (1:1) as plântulas apresentavam-se com coloração verde e aspecto vigoroso.

Os pesos médios iniciais de matéria fresca das microplantas no momento em que foram transferidas para areia, areia e substrato comercial e substrato comercial foram de 0,20; 0,18 e 0,16 gramas, enquanto que as alturas médias foram de 2,98; 3,26 e 2,44 cm, e o número de nós de 4,6; 4,46 e 4,0 respectivamente. Os resultados de crescimento e desenvolvimento das microplantas em areia, areia e substrato comercial (1:1) e substrato comercial, ao longo do período de 45 dias, são apresentados na **Tabela 12**, bem como representados nas **Figuras 17 e 18 (Apêndices)**. Observa-se que o crescimento das microplantas em areia lavada esterilizada, aos 45 dias de cultivo, foi bastante reduzido, ao ponto de comprometer a sobrevivência das mesmas, apresentando incremento nulo, em relação ao peso da matéria fresca e de somente 75,33%, em altura e 76,08%, em número de nós. Entretanto, nos substratos compostos de areia e substrato comercial e de somente substrato comercial os incrementos em peso da matéria fresca (195,69% e 189,85%, respectivamente), altura (117,17% e 108,81%, respectivamente) e em número de folhas (100,11% e 105,75%, respectivamente) foram significativamente superiores em relação aos obtidos em areia lavada esterilizada. Em relação a valores absolutos (**Tabela 12**), para todos os parâmetros de crescimento avaliados, de forma geral o substrato composto pela mistura de areia e substrato comercial (1:1) possibilitou, de forma significativa, a obtenção dos melhores resultados. Para os parâmetros de crescimento, em peso da matéria fresca e altura, os valores indicaram que o crescimento das microplantas durante 45 dias de aclimação, nos substratos compostos pela mistura de areia e substrato comercial (1:1) e em substrato comercial foram significativamente superiores (peso da matéria fresca de 0,72 g e 0,65 g, respectivamente e número de folhas/planta de 8,93 e

8.46, respectivamente) aos obtidos no substrato areia, e semelhantes entre si. Somente no substrato composto pela mistura de areia e substrato comercial (1:1) a altura das plantas ( $7,64 \pm 2,05$  cm) foi significativamente superior em relação aos demais substratos.

**Tabela 5:** Parâmetros de crescimento *ex vitro* de plântulas micropropagadas de mandioca de mesa (*M. esculenta* – acesso 52), após 45 dias de cultivo em diferentes substratos de aclimação.

Substrato	Massa fresca (g)	Altura (cm)	Número de folhas/planta
Areia	$0,18 \pm 0,06$ b	$4,49 \pm 1,21$ b	$7,00 \pm 0,75$ b
Areia + substrato comercial (1:1)	$0,72 \pm 0,17$ a	$7,64 \pm 2,05$ a	$8,93 \pm 0,70$ a
Substrato comercial	$0,65 \pm 0,15$ a	$5,31 \pm 1,18$ b	$8,46 \pm 0,83$ a

<sup>Z</sup>Valores (N=15) representam a média±desvio padrão de 15 repetições por tratamento, onde os valores seguidos pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

Em relação à formação de raízes, aparentemente não houve a morte e/ou substituição das raízes formadas *in vitro*, durante o processo de aclimação. Houve um incremento do número de raízes e crescimento das mesmas, com a formação de emaranhado de raízes secundárias, de forma mais intensa nas microplantas aclimatadas nos substratos compostos pela mistura de areia e substrato comercial e por substrato comercial, enquanto que no substrato areia não houve a formação de novas raízes, havendo apenas um pequeno crescimento das mesmas (dados não apresentados).

## 3.2 CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DE GERMOPLASMA DE MANDIOCA DE MESA (*Manihot esculenta* CRANTZ)

### 3.2.1 Efeito de diferentes concentrações de sacarose no meio de cultura sobre a conservação *in vitro* de microplantas de mandioca de mesa

O crescimento e desenvolvimento de microplantas de mandioca de mesa cultivadas *in vitro* em meio de cultura MS semi-sólido, acrescido de diferentes concentrações de sacarose estão apresentados nas **Tabelas 13** (altura) e **14** (número de nós), bem como representados nas **Figuras 19** e **20**, respectivamente. Observa-se que o aumento gradativo na concentração de sacarose adicionada ao meio de cultura MS promoveu uma redução significativa do crescimento em altura das microplantas,  $11,74 \pm 1,774$  cm,  $5,76 \pm 1,147$  cm,  $3,56 \pm 0,622$  cm e  $2,12 \pm 0,546$  cm para as concentrações de 4, 6, 8 e 10% de sacarose respectivamente, perfeitamente perceptível após 3 meses de cultivo. Esta significativa redução no crescimento em altura se repetiu ao longo dos 12 meses de cultivo, nestas condições.

Após o terceiro mês de cultivo as plântulas inoculadas no meio de cultura com 4% de sacarose atingiram tamanho acima dos limites máximos dos frascos de cultura, inviabilizando a manutenção das mesmas nestas condições e conseqüentemente as avaliações posteriores a este período. As plântulas crescidas no meio de cultura com 6% de sacarose cresceram de forma mais rápida a partir do terceiro mês de cultivo, no entanto a altura máxima das plântulas ( $11,60 \pm 2,164$  cm) foi atingida ao redor do sexto mês de cultivo, permanecendo de certa forma constante aos 9 e 12 meses, atingindo altura máxima de  $12,90 \pm 1,105$  e  $11,92 \pm 1,149$  cm, respectivamente. Assim, em média as plântulas crescidas nesta concentração de sacarose atingiram altura máxima de em torno de 12,1 cm, ao longo de todo período de cultivo (12 meses), permanecendo estabilizadas. No meio de cultura com concentração de sacarose de 8% este padrão de crescimento e desenvolvimento também se repetiu, ao longo do período de 12 meses, no entanto a altura máxima atingida foi significativamente menor em relação ao tratamento anterior, ficando a média em 4,9 cm, ao longo de todo período. O mesmo ocorreu com o padrão de crescimento/desenvolvimento das microplantas em meio de cultura contendo 10% de sacarose. Ou seja, a altura máxima foi atingida após o sexto mês de cultivo, mantendo-se praticamente constante até o final do período (12 meses), porém atingindo uma altura

média no período (6 a 12 meses) de 2,7 cm, uma redução de tamanho das plântulas altamente significativa perante os demais tratamentos.

**Tabela 6:** Crescimento em altura (cm) de plantas micropropagadas de mandioca de mesa (*M. esculenta* – acesso 52) inoculadas e cultivadas durante 3, 6, 9 e 12 meses em meio de cultura MS semi-sólido acrescido de diferentes concentrações de sacarose.

Sacarose (%)	Tempo de cultivo <i>in vitro</i> (meses)			
	3	6	9	12
4	<sup>Z</sup> 11,74±1,774 a	**	**	**
6	5,76±1,147 b	11,60±2,164 a	12,90±1,105 a	11,92±1,149 a
8	3,56±0,622 c	4,43±0,820 b	5,26±0,863 b	5,18±0,649 b
10	2,12±0,546 d	2,35±0,907 c	2,92±0,916 c	2,97±0,695 c

<sup>Z</sup>Valores (N=15) representam a média±desvio padrão de 15 repetições (microplantas) por tratamento, sendo que os valores seguidos pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). \*\*Dados não coletados, pois as microplantas cultivadas neste meio de cultura, após 3 meses de cultivo, cresceram além do tamanho máximo dos frascos de cultura, inviabilizando a coleta de dados após este período.

Em relação ao número de nós formados por plântula houve diferenças significativas entre os tratamentos, em todos os períodos avaliados (**Tabela 14**). De forma semelhante ao ocorrido com o crescimento em altura das plântulas também houve uma redução significativa da quantidade de nós formados nas plântulas cultivadas em meios com aumento gradativo na concentração de sacarose. Aos 3 meses de cultivo os números médios de nós/microplanta foram de 8,66±0,816, 8,80±0,774, 8,13±0,833 e 7,14±0,864, nos meios de cultura com concentração de sacarose de 4, 6, 8 e 10%, respectivamente. Mesmo considerando que em termos de valores absolutos houve diferença significativa na redução no número de nós formados/microplanta entre os tratamentos. Pode-se afirmar que esta redução não se deu de forma tão intensa quanto à observada em relação ao tamanho das microplantas. Deve-se considerar também que a quantidade máxima de nós formados nos diferentes tratamentos foi

atingida aos 9 meses de cultivo, a partir do qual estas quantidades permaneceram estabilizadas, obtendo-se em média dos 9 aos 12 meses de cultivo, 11,5; 9,8 e 8,9 nós/microplanta, nos meios de cultura com concentração de sacarose de 6, 8 e 10%, respectivamente.

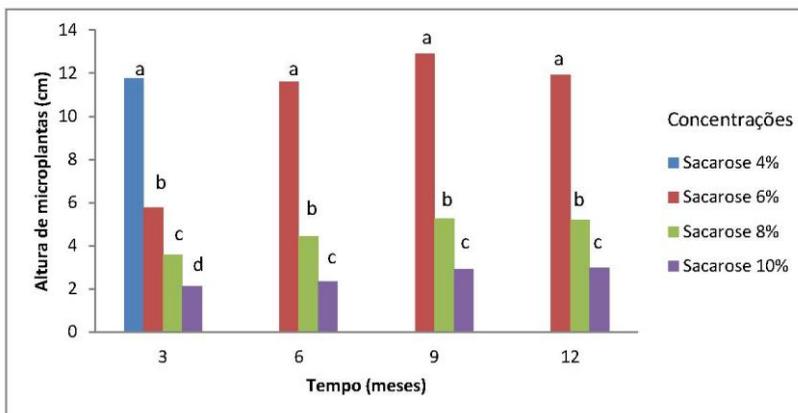
O efeito de concentrações crescentes de sacarose adicionadas ao meio de cultura em relação à sobrevivência de microplantas ao longo do tempo em cultura *in vitro* está representado na **Figura 21**. Percebe-se que houve um efeito significativamente diferente entre as diferentes concentrações de sacarose após 12 meses de cultura *in vitro*. O meio de cultura com 8% de sacarose foi o que possibilitou a maior taxa de sobrevivência de microplantas (80%) após 12 meses.

**Tabela 7:** Crescimento em número de nós de plantas micropropagadas de mandioca de mesa (*M. esculenta* – acesso 52) inoculadas e cultivadas durante 3, 6, 9 e 12 meses em meio de cultura MS semi-sólido acrescido de diferentes concentrações de sacarose.

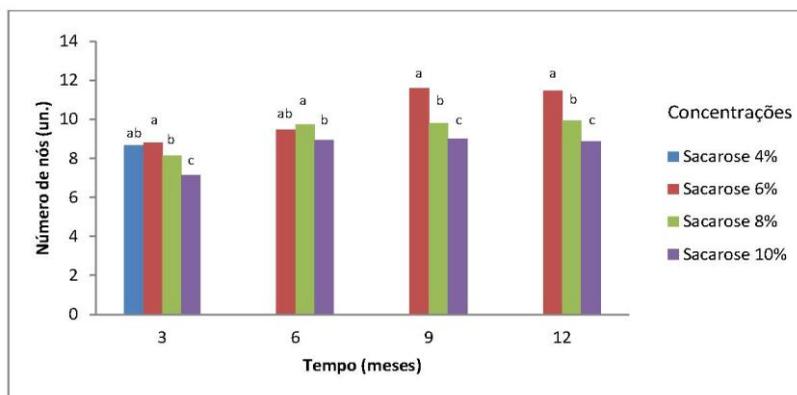
Sacarose (%)	Tempo de cultivo <i>in vitro</i> (meses)			
	3	6	9	12
4	<sup>Z</sup> 8,66±0,816 ab	**	**	**
6	8,80±0,774 a	9,46±1,125 ab	11,60±0,985 a	11,46±0,915 a
8	8,13±0,833 b	9,73±0,703 a	9,80±0,774 b	9,93±1,437 b
10	7,14±0,864 c	8,92±0,997 b	9,00±0,877 c	8,85±0,770 c

<sup>Z</sup>Valores (N=15) representam a média±desvio padrão de 15 repetições (microplantas) por tratamento, sendo que os valores seguidos pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

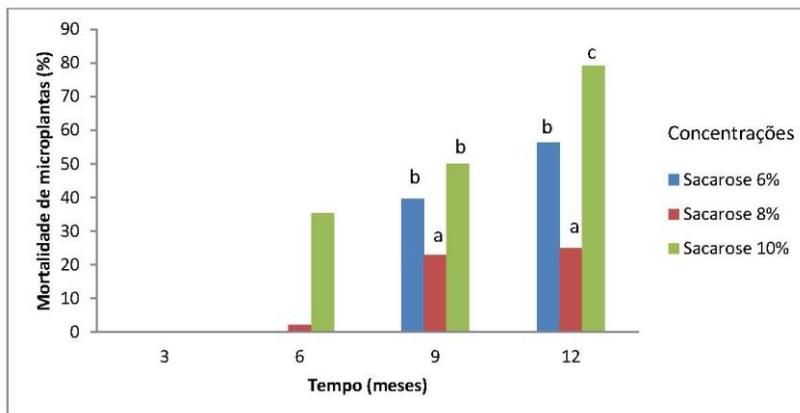
\*\*Dados não coletados, pois as microplantas cultivadas neste meio de cultura após 3 meses de cultivo cresceram além do tamanho máximo dos frascos de cultura, inviabilizando a coleta de dados após este período.



**Figura 12:** Altura média de microplantas de mandioca de mesa (*M. esculenta* – acesso 52) cultivadas durante doze meses em meio de cultura MS semi-sólido acrescidos de diferentes concentrações de sacarose. As avaliações ocorreram a cada três meses utilizando-se 3 repetições de 12 microplantas cada, por tratamento. Letras iguais sobre as colunas em cada período de tempo não diferem significativamente pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).



**Figura 13:** Número médio de nós (foliares + apical) por microplanta de mandioca de mesa (*M. esculenta* – acesso 52) cultivadas durante doze meses em meio de cultura MS semi-sólido acrescido de diferentes concentrações de sacarose. As avaliações ocorreram a cada três meses utilizando-se 3 repetições de 12 microplantas cada, por tratamento. Letras iguais sobre as colunas em cada período de tempo não diferem significativamente pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).



**Figura 14:** Percentagem de mortalidade de microplantas de mandioca de mesa (*M. esculenta* – acesso 52) cultivadas durante doze meses em meio de cultura MS semi-sólido acrescido de diferentes concentrações de sacarose. As avaliações ocorreram a cada três meses, durante 12 meses, utilizando-se 4 repetições de 12 microplantas cada, por tratamento. Letras iguais sobre as colunas em cada período de tempo não diferem significativamente pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

A capacidade de retomada do crescimento e desenvolvimento normal (e.g. brotamento e enraizamento) em meio de regeneração/multiplicação (MS semi-sólido acrescido de 4% de sacarose e 0,01 mg/l de BAP) de ápices e segmentos nodais oriundos de plantas cultivadas *in vitro*, em meio de cultura MS, semi-sólido, acrescido de diferentes concentrações de sacarose (4, 6, 8 e 10%), durante 3, 6, 9 e 12 meses está apresentada na **Tabela 15** (brotamento) e **Tabela 16** (enraizamento). Salienta-se que as avaliações referentes à capacidade de retomada do crescimento e desenvolvimento de ápices inoculados em meio de regeneração/multiplicação somente foi possível a partir de plantas cultivadas até o sexto mês, nos meios com diferentes concentrações de sacarose, uma vez que a partir do nono mês de cultivo nestes meios houve a morte de grande parte dos ápices das plantas. Associado a este fator houve indução do brotamento das gemas axilares e formação de brotações, no entanto a capacidade de brotamento de ápices oriundos de plantas cultivadas, até o sexto mês, em meios com diferentes concentrações de sacarose foi de 100% para todos os tratamentos. Entretanto, para os segmentos nodais a capacidade de brotamento foi de 100%, até o nono mês de cultivo, independente da

concentração do meio de origem dos explantes. Após o período de 12 meses de cultivo obteve-se 96,66; 100,0 e 96,66% de frequência de brotamento dos segmentos nodais oriundos de plantas cultivadas em meio de cultura com 6, 8 e 10% de sacarose, respectivamente.

**Tabela 8:** Taxa de brotamento (%) de ápices e segmentos nodais de mandioca de mesa (*M. esculenta* – acesso 52) obtidos de microplantas cultivadas durante 3, 6, 9 e 12 meses em meio MS com diferentes concentrações de sacarose. Avaliação após 30 dias de cultivo em meio MS acrescido de 4% sacarose e 0,01 mg/l de BAP.

Explantes	Sacarose (%)	Tempo de conservação (meses)			
		3	6	9	12
Ápices	6	<sup>z</sup> 100,0	100,0		
	8	100,0	100,0		
	10	100,0	100,0		
Seg. Nodais	6	100,0	100,0	100,0	96,66
	8	100,0	100,0	100,0	100,0
	10	100,0	100,0	100,0	96,66

<sup>z</sup>Valores (N=36) representam a média de proporções obtidas de 3 repetições de 12 explantes por tratamento. Os tratamentos não diferiram significativamente pela aplicação do teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

A capacidade de enraizamento dos ápices obtidos de plantas com três meses de cultivo, em meios com 6, 8 e 10% de sacarose, foi de 96,66; 100,0 e 100,0%, respectivamente, enquanto que, aos seis meses, houve redução na capacidade de enraizamento destes explantes, obtendo-se 66,66; 96,66 e 70,0% de ápices enraizados nos meios de cultura com 6, 8 e 10% de sacarose, respectivamente. Por outro lado os segmentos nodais mantiveram alta capacidade de enraizamento, com destaque para os explantes oriundos de microplantas cultivadas em meio com 8% de sacarose, obtendo-se 100,0% de enraizamento dos explantes obtidos de plântulas após 3, 6, 9 e 12 meses de cultivo *in vitro*.

**Tabela 9:** Taxa de enraizamento (%) de ápices e segmentos nodais de mandioca de mesa (*M. esculenta* – acesso 52) obtidos de microplantas cultivadas durante 3, 6, 9 e 12 meses em meio MS com diferentes concentrações de sacarose. Avaliação após 30 dias de cultivo em meio MS acrescido de 4% sacarose e 0,01 mg/l de BAP.

Explante	Sacarose (%)	Tempo de conservação <i>in vitro</i> (meses)			
		3	6	9	12
Ápices	6	<sup>z</sup> 96,66	66,66 b	--	--
	8	100,0	96,66 a	--	--
	10	100,0	70,00 b	--	--
Seg. Nodais	6	93,33	93,33	93,33 a	86,66 b
	8	100,0	100,0	100,0 a	100,0 a
	10	100,0	100,0	93,33 a	93,33 ab

<sup>z</sup>Valores (N=36) representam a média de proporções obtidas de 3 repetições de 12 explantes por tratamento, sendo que os valores seguidos pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

#### 4.2.2 Efeito de diferentes concentrações de Phitigel no meio de cultura sobre o armazenamento de ápices e segmentos nodais de mandioca de mesa (*M. esculenta* – acesso 52) encapsulados em alginato de cálcio

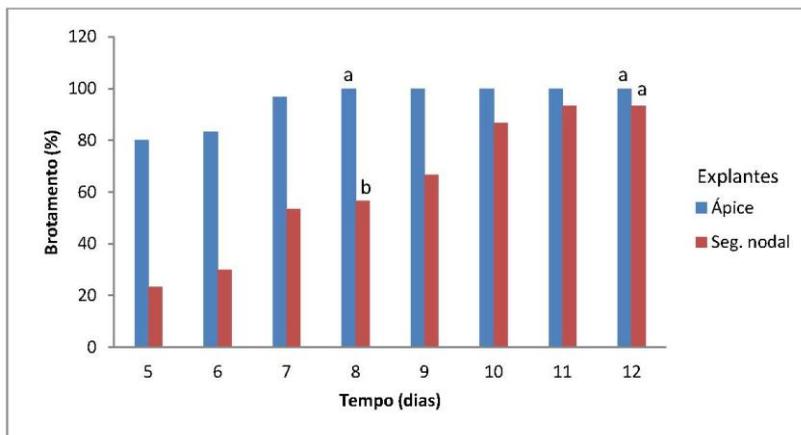
A técnica de encapsulamento de explantes (segmentos nodais e ápices) e inoculação em meios de armazenamento com diferentes concentrações de ágar e/ou fitigel, restritivos ao crescimento e desenvolvimento *in vitro* durante os períodos de 3, 6, 9 e 12 meses foi testada como forma de viabilizar um sistema de conservação de germoplasma. Após cada período os explantes encapsulados seriam avaliados quanto a sua capacidade de retomada do crescimento, inoculando-os em meio de regeneração/multiplicação. Os testes realizados demonstraram que já aos 3 meses de armazenamento os explantes encapsulados, independente de serem ápices e/ou segmentos nodais, foram incapazes de retomar seu crescimento/desenvolvimento (brotamento e enraizamento) normalmente, senescendo precocemente em sua grande maioria (dados não apresentados). No entanto, observou-se que os explantes, após serem encapsulados e na sequência inoculados no meio de multiplicação/regeneração tiveram capacidade de romper as cápsulas e retomarem seu crescimento/desenvolvimento normalmente. Na **Tabela 17** estão apresentados os percentuais de brotamento, ao longo de 12 dias de cultivo, de ápices e segmentos nodais encapsulados

e inoculados em meio de regeneração/multiplicação, também representados na **Figura 22**. Observa-se que os ápices encapsulados atingiram 100% de brotamento já aos 8 dias após a inoculação, enquanto que os segmentos nodais atingiram percentual máximo de brotamento (93,33%), a partir do décimo dia de cultivo. Estes resultados foram muito semelhantes aos obtidos, com os mesmos tipos de explantes sem encapsulamento, quando inoculados no mesmo meio de cultura, em que, os ápices atingiram o máximo de brotamento (100%) por volta do sexto dia e os segmentos nodais, por volta do nono dia.

**Tabela 10:** Taxa de brotamento (%) de ápices e segmentos nodais de mandioca de mesa (*M. esculenta* – acesso 52) encapsulados e inoculados em meio de regeneração/multiplicação (MS acrescido de 4% sacarose e 0,01 mg/l de BAP). Avaliação durante 12 dias a partir do quinto dia após a inoculação.

Explantos	Brotamento diário (%)							
	5	6	7	8	9	10	11	12
Ápices	<sup>z</sup> 80,00	83,33	96,66	100,0 a	100,0	100,0	100,0	100,0 a
Seg. nodais	23,33	30,00	53,33	56,66 b	66,66	86,66	93,33	93,33 a

<sup>z</sup>Valores representam a média de proporções obtidas de 3 repetições de no mínimo 10 explantes por tratamento, sendo que os valores seguidos pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).



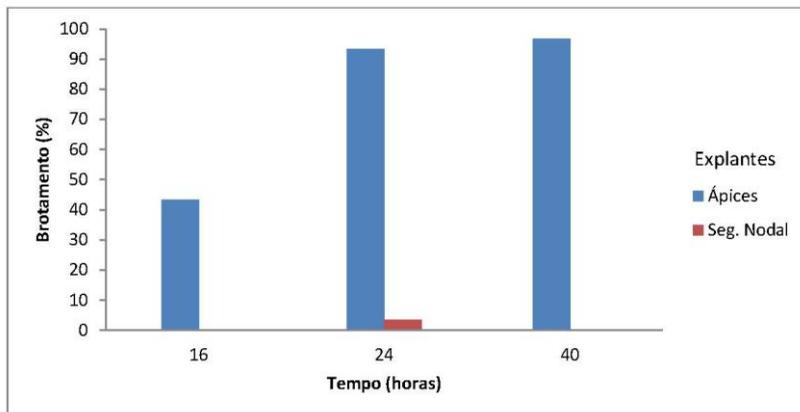
**Figura 15:** Percentagem de brotamento de ápices e segmentos nodais de mandioca de mesa (*M. esculenta* – acesso 52) encapsulados em alginato de cálcio e inoculados em meio de regeneração/multiplicação. As avaliações ocorreram diariamente durante 12 dias a partir do quinto dia de cultivo, utilizando-se 3 repetições de 10 explantes cada. Letras iguais sobre as colunas em cada período de tempo não diferem significativamente pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

### 3.2.3 Desenvolvimento de métodos para criopreservação de segmentos nodais de mandioca de mesa (*M. esculenta* – acesso 52)

Os resultados apresentados a seguir referem-se principalmente aos efeitos provocados pela desidratação química (vitrificação) sobre a sobrevivência de ápices e segmentos de mandioca de mesa submetidos ao procedimento de vitrificação proposto por Charoensub *et al.* (2003) e algumas modificações do mesmo.

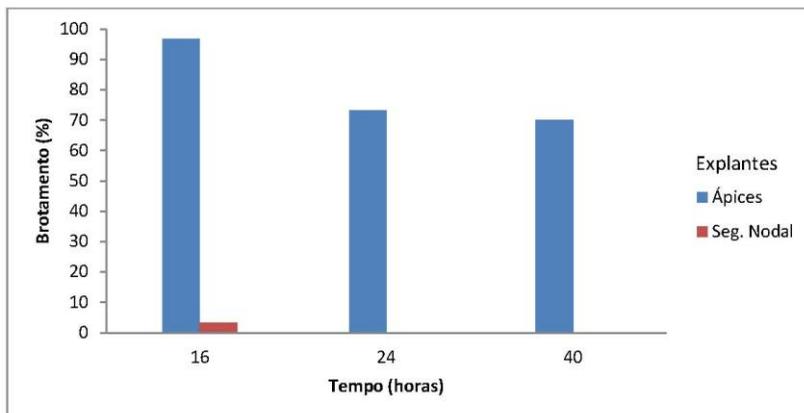
O efeito da desidratação química sobre a sobrevivência dos explantes foi determinado avaliando-se a capacidade de brotamento das gemas em ápices e segmentos nodais de mandioca de mesa (*M. esculenta* – Acesso 52), submetidos à desidratação/vitrificação, por imersão em meio de cultura MS e sacarose a 0,3 M (**solução 1** item 8.4.2 materiais e métodos), durante 16, 24 e 40 horas. Os resultados demonstrados na **Figura 23** indicam que o efeito da desidratação química sobre os segmentos nodais foi bastante nocivo, comprometendo a viabilidade destes explantes, mesmo sem submetê-los ao congelamento em nitrogênio líquido, uma vez que as taxas de sobrevivência, após 16, 24 e 40 horas de desidratação, foram,

respectivamente, de 0,0; 3,33 e 0,0%. Por outro lado, a capacidade de sobrevivência dos ápices permaneceu bastante alta, principalmente quando permaneceram sob desidratação durante 24 e 40 horas, em que a sobrevivência foi de 93,33 e 96,66%, respectivamente.



**Figura 16:** Percentagem de Brotamento de explantes (ápices e/ou segmentos nodais) de mandioca de mesa (*M. esculenta* – acesso 52) submetidos à desidratação química em solução líquida de MS e sacarose 0,3 M durante 16, 24 e 40 horas. A avaliação ocorreu aos sete dias após a inoculação em meio de multiplicação. Média de 3 repetições de 10 explantes por período.

Na **Figura 24** está representada a capacidade de sobrevivência, determinada pela capacidade de brotamento (%) de ápices e segmentos nodais submetidos à desidratação, sobre papel filtro, embebido com solução de sacarose 0,3 M em meio de cultura MS, durante 16, 24 e 40 horas. Nesta condição o efeito nocivo da desidratação sobre a sobrevivência de segmentos nodais também foi bastante intensa, reduzindo a sobrevivência dos mesmos para 3,33%, após 16 horas e causando a perda de viabilidade total destes, após 24 e 40 horas. Os ápices também tiveram sua viabilidade reduzida nesta condição, de forma crescente, ao longo do período de desidratação, passando de 96,66 para 73,33 e 70,0% de sobrevivência, após 16, 24 e 40 horas de desidratação, respectivamente.



**Figura 17:** Percentagem de brotamento de explantes (ápices e/ou seguimentos nodais) de mandioca de mesa (*M. esculenta* – acesso 52) submetidos à desidratação química sobre papel embebido em solução de MS e sacarose 0,3 M durante 16, 24 e 40 horas. A avaliação ocorreu aos sete dias após a inoculação em meio de multiplicação. Média de 3 repetições de 10 explantes por período.

Salienta-se que os explantes que foram imersos em nitrogênio líquido não sobreviveram, independentemente dos tratamentos preliminares de desidratação, vitrificação e osmoproteção aplicados.



## 4. DISCUSSÃO

### 4.1 MICROPROPAÇÃO DE MANDIOCA DE MESA (*Manihot esculenta* CRANTZ)

#### 4.1.1 Obtenção de culturas axênicas

##### 4.1.1.1 Indução de brotamento de gemas em sistema semi-asséptico

Para viabilizar os trabalhos de cultivo e conservação *in vitro* propostos neste estudo foi necessário, inicialmente, estabelecer uma forma eficiente e prática de obtenção do maior número possível de brotações em segmentos de ramos de plantas matrizes de mandioca de mesa (*M. esculenta* Crantz.) dos acessos em estudo, com vigor e com alto grau de limpeza de microrganismos contaminantes.

Como a desinfecção/isolamento de explantes e obtenção de culturas axênicas é uma etapa crucial para o desenvolvimento de sistemas eficazes de cultivo *in vitro*, foram conduzidos experimentos para estabelecer um sistema eficiente de obtenção de brotações em condições semi-assépticas para produção inicial de brotações jovens, das quais seriam excisados os explantes (ápices e segmentos nodais), para a etapa de desinfecção/isolamento *in vitro*. Neste sentido, buscou-se otimizar a produção de brotações, a partir de gemas pré-existentes em segmentos de ramos, desenvolvendo um protocolo em condições semi-assépticas, conforme descrito no item 8.2.1 dos materiais e métodos.

Estes experimentos indicaram que o melhor substrato para indução de brotamento das gemas em condições semi-assépticas foi aquele em que se usou somente areia de rio lavada e esterilizada, pois nesta condição o aparecimento de eventuais contaminações foi insignificante. Por outro lado à utilização de papel toalha como substrato se mostrou insatisfatória, principalmente pelo intenso aparecimento de contaminantes, principalmente fúngicos, ao longo do período de crescimento das brotações.

Testando-se a eficiência de indução de brotamento em segmentos de ramos contendo de 3 a 5 gemas de diferentes Acessos, verificou-se que a brotação dos mesmos ocorreu em percentuais que variaram de 72,63 a 90,70% dependendo do acesso. Esta amplitude nas taxas de brotamento pode evidenciar que houve diferenças na capacidade de brotamento das gemas associadas aos diferentes acessos e as condições fisiológicas (vigor) das plantas matrizes. Salienta-se ainda que a brotação, neste tipo de ramo, ocorreu somente na gema mais distal de

cada segmento, inibindo a brotação das demais que perdurou ao longo do tempo. Este comportamento demonstrou que também houve um efeito de dominância apical para os acessos testados quando se utilizam segmentos de ramos com número de nós superior a três. De forma contrária, quando se utilizaram segmentos de ramos com tamanhos menores, contendo de uma a duas gemas somente, este efeito inibitório não foi observado, havendo brotação homogênea de todas as gemas viáveis pré-existentes.

Na condição mais adequada de indução de brotamento, ou seja, utilizando-se areia como substrato no sistema de indução semi-asséptico, os segmentos de ramos que se mostraram mais eficientes na formação de maior número de brotações a partir das gemas pré-existentes foram aqueles contendo de 1 a 2 nós, portanto uma ou duas gemas pré-existentes por segmento, atingindo 70,33% de brotamento do total de gemas existentes viáveis ou não. Utilizando-se este tipo de segmento todas as gemas viáveis brotaram uniformemente e formaram, após 7 dias de implantação, brotações com tamanho e qualidade adequadas, para serem utilizadas na etapa de isolamento. Salienta-se que este sistema possibilitou a realização de até 3 coletas de brotações novas, a partir da coleta inicial. Estas coletas foram possíveis, a cada 7 dias de intervalo entre uma e outra. Normalmente, após a coleta formava-se somente uma nova brotação, no entanto, em várias ocasiões formaram-se até duas novas brotações a partir de gemas basais remanescentes.

Ressalta-se ainda que cada brotação coletada a cada 7 dias permitiu a obtenção de em média 5 explantes, sendo quatro segmentos nodais e um apical, para serem utilizados na etapa de desinfecção e isolamento. A partir da terceira coleta, no entanto, as brotações formadas apresentavam-se menos vigorosas, pouco alongadas, com entrenós muito curtos e aparecimento significativo de contaminantes, não sendo recomendável a utilização dos mesmos na etapa subsequente, de desinfecção e isolamento *in vitro*. Todavia, este sistema possibilitou o brotamento da totalidade de gemas viáveis e a conseqüente obtenção de brotações a partir das mesmas. Salienta-se que com os cuidados de limpeza e desinfecção aplicados aos segmentos de ramos empregados nesta etapa, houve acentuada redução no aparecimento de contaminações, no decorrer do processo de crescimento e desenvolvimento das brotações, no sistema semi-asséptico empregado. Desta forma, este protocolo possibilitou a obtenção de brotações em maior quantidade e com melhor qualidade fitossanitária, facilitando e

umentando a eficiência do processo posterior de desinfecção/isolamento de explantes *in vitro*.

Em outros trabalhos de micropropagação de mandioca desenvolvidos, principalmente por pesquisadores brasileiros, foram utilizados sistemas diferentes de indução de brotações jovens em segmentos de ramos, notadamente baseados nos trabalhos de Silva (2004) e/ou fundamentados em pequenas adaptações deste (BARRUETO CID *et al.*, 2007). Nestes a etapa de indução foi realizada em casas de vegetação, telados e/ou em câmaras de propagação acelerada (SOUZA *et al.*, 2009), a partir da qual as brotações foram coletadas e submetidas aos procedimentos de assepsia, no laboratório. No caso do trabalho em tela, as brotações foram induzidas em sistemas implantados em sala de crescimento, em condições semi-assépticas, de onde as brotações foram coletadas em intervalos de tempo menores e com maior qualidade fitossanitária, agilizando e otimizando os procedimentos de assepsia, isolamento dos explantes e obtenção de culturas axênicas.

#### 4.1.1.2 Desinfecção e isolamento *in vitro* a partir de segmentos nodais e apicais de brotações de mandioca de mesa obtidas em condições semi-assépticas

Entre os tratamentos de desinfecção testados aquele que se mostrou mais eficiente e de menor efeito tóxico foi o tratamento 3, que constou inicialmente da imersão das brotações em álcool 70% durante um minuto e trinta segundos, seguida da imersão em hipoclorito de sódio (2,5% cloro ativo), por três minutos. Utilizando-se este protocolo obteve-se 90% de culturas assépticas (axênicas). Por outro lado observou-se que os tratamentos com tempo de imersão superior a 3 minutos em hipoclorito de sódio afetaram a viabilidade dos explantes, provocando a incidência de maior percentual de morte dos mesmos. Salienta-se que o sucesso deste simples e prático processo de desinfecção deveu-se também à qualidade fitossanitária das brotações obtidas no sistema semi-asséptico preconizado, uma vez que em protocolos de desinfecção utilizados em outros estudos, para diferentes acessos de mandioca, foi necessária também a utilização de substâncias com efeito antifúngico, antibacteriano e/ou alto poder biocida (e.g. Claforam, Benlate e PPM<sup>TM</sup>- Plant Preservative Mixture - Plant Cell Technology - Washington DC USA), tanto nos procedimentos de desinfecção das brotações quanto adicionados aos meios de cultivo utilizados no isolamento destes explantes. Mesmo assim, tais

procedimentos mais complexos não garantiram a assepsia total das culturas (BARRUETO CID & JORDAN, 2006; BARRUETO CID *et al.*, 2007) enquanto, que no presente estudo os explantes foram isolados, com sucesso, após a desinfecção e inoculação em meio de cultura MS semi-sólido, acrescido de 3% sacarose.

Ressalta-se ainda que no procedimento descrito acima, a inoculação nos meios contendo as várias substâncias citadas, com ação desinfetante foi somente a primeira etapa no processo de obtenção de culturas assépticas, que durou somente 15 dias. Os explantes após este período foram retirados desta condição e submetidos a uma nova etapa de desinfecção com hipoclorito de sódio (2.5% de cloro ativo), por 10 minutos e em seguida reintroduzidos em meio de cultura fresco. Estes autores não relataram a ocorrência de toxicidade do hipoclorito de sódio sobre os explantes, mesmo considerando o longo período de tempo de imersão nesta solução quando comparado ao protocolo preconizado no presente estudo.

Já Beyene (2009) utilizou em seu trabalho, com dois acessos de mandioca, a imersão dos explantes durante 1 minuto em álcool 70% e após imersão em solução de hipoclorito de sódio a 1% durante 7 minutos, não relatando efeito fitotóxico nesta condição. Logo o efeito nocivo do hipoclorito de sódio sobre os explantes deve estar associado à concentração da solução usada, bem como ao tempo de imersão dos explantes nestas soluções e também ao menor ou maior grau de sensibilidade dos explantes, associados às diferenças genotípicas e mesmo à condição fisiológica dos mesmos, em cada situação específica.

Sendo assim, conclui-se que quando se trabalha com determinada espécie, neste caso específico *M. esculenta*, visando o isolamento e estabelecimento inicial *in vitro*, deve-se considerar as possíveis diferenças genotípicas, os diferentes tipos de explantes e suas peculiaridades fisiológicas, as diferenças em relação à procedência e o sistema de produção das plantas matrizes, bem como seu estágio fisiológico de desenvolvimento no momento da coleta. Todos estes fatores em conjunto e/ou isoladamente poderão determinar, em maior ou menor grau, o sucesso dos sistemas de assepsia na desinfecção, isolamento e estabelecimento *in vitro*, no que se refere à eficiência de desinfecção e à possibilidade de ocorrência de toxicidade das soluções desinfetantes utilizadas sobre os explantes. Dentro deste contexto, sabendo-se que esta etapa inicial poderá comprometer as etapas subsequentes de micropropagação, há necessidade de que os procedimentos básicos de assepsia definidos para uma determinada

espécie sejam ajustados, em casos específicos, de forma a garantir maior eficiência do sistema.

Para o acesso usado neste estudo, o protocolo definido se mostrou o mais eficiente e menos nocivo aos explantes. Após 45 dias de isolamento e cultivo *in vitro*, as microplantas axênicas produzidas apresentaram crescimento suficiente para serem utilizadas como fonte de explantes (e.g. ápices e segmentos nodais), para dar continuidade aos experimentos de micropropagação (multiplicação, enraizamento e aclimação) e de conservação *in vitro*. Salienta-se que, durante este período, e nas repicagens subsequentes as culturas não apresentaram contaminações. Outra constatação importante foi que, neste período de crescimento e desenvolvimento *in vitro*, as plantas formadas não apresentaram anormalidades em seu desenvolvimento, que eventualmente poderiam ser provocadas pelo processo de desinfecção adotado, pela composição do meio de cultura de isolamento e mesmo pelas condições ambientais de crescimento. Ou seja, houve uma adequada adaptação dos explantes e das microplantas formadas a todos os fatores envolvidos no sistema apresentado.

Obviamente, deve-se considerar que este protocolo de isolamento, que não utilizou meristemas, como a maioria dos protocolos preconiza, é perfeitamente aplicável, desde que as plantas matrizes não apresentem contaminações, principalmente por viroses, que inviabilizem a utilização de ápices e/ou segmentos nodais. Desta forma, o manejo do cultivo das plantas matrizes deverá permitir a produção de plantas isentas de viroses e que não permitam a sua contaminação (e.g. cultivo em telados anti-afídeos), além do que as plantas matrizes devem ser monitoradas constantemente e diagnosticadas quanto à contaminação por viroses (e.g. método ELISA e/ou métodos moleculares). Por outro lado, mesmo constatando-se que determinado material esteja contaminado por viroses, há a possibilidade de aplicação do protocolo proposto, desde que o material vegetal (ramos) passe por um tratamento de termoterapia anterior à fase de indução de brotações em condições semi-assépticas e posterior desinfecção/isolamento de ápices e segmentos nodais.

## 4.2 CULTURA *IN VITRO*: ESTABELECIMENTO, MULTIPLICAÇÃO E ENRAIZAMENTO

### 4.2.1 Estabelecimento de cultura *in vitro* de mandioca de mesa (*Manihot esculenta* Crantz – acesso 52)

Adequar condições ideais de crescimento e desenvolvimento para o estabelecimento e consequente multiplicação *in vitro* são condições imprescindíveis para obter um sistema eficaz e robusto para a micropropagação de determinada espécie. Neste sentido, torna-se necessário definir as concentrações adequadas de cada componente dos meios de cultura, para cada etapa do processo de micropropagação, como a formulação salina de macro e micronutrientes, a fonte e concentração de carboidratos, bem como os tipos e concentrações dos reguladores de crescimento.

No presente trabalho, optou-se inicialmente por um meio de cultura básico bastante simplificado em sua composição (MS semi-sólido, acrescido de 4% de sacarose e ausência de reguladores de crescimento), buscando averiguar como seria o comportamento dos diferentes explantes (e.g. ápices, segmentos nodais medianos e segmentos nodais basais) em relação às respostas morfogênicas que cada explante apresentaria nesta condição. Os ápices inoculados nesta condição apresentaram, já no sexto dia de cultivo, 100% das gemas brotadas e no décimo dia, 100% dos explantes com raízes formadas. Os segmentos nodais medianos apresentaram maior dificuldade em relação à velocidade de brotamento das gemas e consequente formação de raízes, sendo que o percentual máximo de gemas brotadas (72,08%) foi atingido aos dezesseis dias de cultivo e somente 55,83% destes formaram raízes. Já para os segmentos nodais basais aos dezesseis dias de cultivo obteve-se percentual máximo de gemas brotadas (71,67%) e 73,33% de explantes enraizados. Salienta-se que, para todos os explantes, a formação de raízes somente se iniciou, efetivamente, a partir do brotamento das gemas pré-existentes e formação da primeira folha. Estes resultados indicam que mesmo sendo cultivadas *in vitro*, nas condições descritas, as microplantas de mandioca de mesa (acesso 52) mantiveram a característica fisiológica de efeito de dominância apical, induzida pela produção de auxinas na região da gema apical das microplantas e que se reflete endogenamente na inibição do brotamento das gemas dos segmentos nodais (TAIZ & ZEIGER, 2009). Sendo assim, as gemas de segmentos nodais, tanto as da porção mediana das microplantas quanto às da porção mais basal apresentaram menor

capacidade de brotamento, quando inoculadas em meios de cultura sem suplementação hormonal e, conseqüentemente, menor capacidade de formação de microplantas. Smith *et al.* (1986) também relataram a ocorrência de dominância apical nos acessos genéticos avaliados. Já Oliveira *et al.* (2000) afirmaram não ter identificado, em seu trabalho, nenhuma variedade com dominância apical acentuada.

Como um dos principais objetivos da micropropagação é a produção em larga escala, a constatação da ocorrência deste efeito hormonal endógeno sobre os diferentes explantes, permitiu se pensar na adequação do meio de cultura (discutida no item 10.2.2 abaixo) como forma de superar este efeito inibitório que poderia se tornar um entrave relevante para um processo de micropropagação eficiente. Adicionalmente a constatação da existência deste efeito hormonal em brotações jovens de mandioca de mesa sugere a possibilidade de produção massiva (propagação acelerada) em casas de vegetação, de biomassa de determinados acessos genéticos de mandioca para extração e purificação de auxinas (i.e. AIB – ácido indol-3-butírico) a partir dos ápices.

#### **4.2.2 Indução do brotamento de gemas e formação de raízes em segmentos nodais de mandioca de mesa (*Manihot esculenta* – Acesso 52) cultivados *in vitro* sob efeito de diferentes concentrações BAP**

Pelos resultados obtidos nos experimentos anteriores constatou-se que explantes apicais não apresentaram dificuldades de brotamento e enraizamento. Porém, em segmentos nodais foi constatado o efeito de dominância apical, pela produção de auxinas na região apical das microplantas e sua distribuição endógena, que promoveram certo nível de inibição do brotamento das gemas pré-existentes nestes explantes. Partindo desta constatação buscou-se formas de superar este efeito inibitório, uma vez que o uso destes explantes em sucessivas repicagens promoveria um aumento extremamente significativo nas taxas de multiplicação *in vitro* e, conseqüentemente, na produção em larga escala de microplantas. Portanto, dever-se-ia buscar uma forma de equilibrar, o balanço endógeno entre auxinas e citocininas, que sabidamente afetam os padrões de respostas morfogênicas dos explantes cultivados *in vitro* (TAIZ & ZEIGER, 2009). Desta forma, foram testadas diferentes concentrações da citocinina BAP (6-Benzilaminopurina), adicionadas ao meio de cultura MS semi-sólido acrescido de 4% de sacarose.

Na concentração de 0,01 mg/l de BAP ocorreu 100% de indução de brotamento das gemas pré-existentes nos segmentos nodais, ao

mesmo tempo em que 95,55% destes formaram raízes normalmente. Considerando-se que Acedo (1994) e Broomes & Lacon (1994) obtiveram somente 61% e 80% respectivamente de plantas com formação de raízes, o percentual de 95,55% obtido no presente trabalho, se mostrou foi muito expressivo.

Brotamento máximo também foi obtido na concentração de 0,05 mg/l de BAP, no entanto, ocorreu uma drástica redução no enraizamento, onde somente 11,11% dos explantes formaram raízes. Concentrações acima de 0,05 mg/l causaram efeito inibitório, tanto no desenvolvimento de brotações a partir das gemas pré-existentes, quanto sobre o enraizamento. Para exemplificar este efeito obteve-se, na concentração de 1,0 mg/l de BAP a redução na taxa de brotamento para somente 2,22% e inibição total na formação de raízes.

Concentrações de BAP acima de 0,05 mg/l, além de ocasionarem uma drástica inibição das respostas organogênicas (e.g. brotamento e enraizamento) promoveram o aparecimento de sintomas de hiperhidricidade (vitrificação) da parte aérea e formação de calos na base dos explantes. Estas respostas se intensificaram em concentrações crescentes de BAP no meio de cultura. Roca (1984) e Guo & Liu (1994) também associaram a formação de calos aos níveis elevados de BAP (maiores que 0,1 mg/l). Para Roca (1984), o surgimento de calos associados aos sistemas organogênicos e/ou embriogênicos na cultura *in vitro* de mandioca é indesejável, pela possibilidade de aumentar a probabilidade de surgimento de variantes somaclonais.

Trabalhando com outros acessos de *M. esculenta*, Onuoch & Onwubiku (2007) também constataram efeitos semelhantes de inibição de BAP em altas concentrações (acima de 0,25 mg/l) sobre todos os parâmetros de crescimento avaliados (altura, número de folhas e número de nós), quando comparados com o meio de cultura sem BAP. Ressaltaram ainda que, na concentração 1,25 mg/l ocorreu uma alta porcentagem de formação de calos, no entanto não descreveram os efeitos sobre o enraizamento dos explantes, concluindo que para mandioca, a utilização de meios de cultura sem hormônios pareceu ser o método mais prático e efetivo para maximizar o crescimento e desenvolvimento *in vitro* dos explantes de mandioca. Como estes pesquisadores não testaram concentrações menores, como as realizadas no presente estudo, obrigatoriamente deve-se discordar da conclusão final do referido trabalho. Os resultados apresentados em tela demonstram, claramente, que há um ganho substancial, em termos de maximização na indução de formação de brotações sem, no entanto, inibir o enraizamento de segmentos nodais de mandioca, quando se

acrescenta 0,01 mg/l de BAP ao meio de cultura, sendo esta concentração suficiente para restabelecer um equilíbrio entre os níveis endógenos de auxinas e citocininas, nestes explantes, revertendo o efeito da dominância apical remanescente das microplantas doadoras dos explantes. Logo, a utilização de BAP na concentração de 0,01 mg/l otimizou a micropropagação em larga escala de mandioca *in vitro*, uma vez que possibilitou a utilização dos diversos explantes produzidos por microplantas, de forma mais eficiente, nas sucessivas etapas de repicagem. Assim, viabiliza-se a produção em larga escala de microplantas completas, sem a necessidade de etapas distintas de multiplicação (crescimento de parte aérea) e de enraizamento. Além do caráter estritamente quantitativo ressalta-se que este protocolo contribuirá para a redução de uma etapa dentro do processo de micropropagação, promovendo a redução de custos e a otimização do uso de áreas de cultivo e de mão de obra.

Apesar de já existirem na literatura inúmeros trabalhos que versam sobre a micropropagação de mandioca (ROCA, 1984; NAIR *et al.*, 1986; SMITH *et al.*, 1986; OLIVEIRA *et al.*, 2000; SOUZA *et al.*, 2009) estes se reportam à utilização de meios de cultura para a micropropagação em cuja composição são utilizados, um meio básico de macro e micronutrientes, acrescido de uma fonte de carbono (sacarose em concentração entre 3 e 4% normalmente) e, invariavelmente, sempre acrescidos de mistura de diferentes reguladores de crescimento. Os reguladores de crescimento, ANA (ácido naftalenoacético), BAP (6-benzilaminopurina) e GA<sub>3</sub> (ácido giberélico) são concomitantemente utilizados, tanto para meios de cultura utilizados na micropropagação (multiplicação/enraizamento) bem como para o isolamento/estabelecimento, variando, obviamente a concentração de cada regulador de crescimento, para cada objetivo específico. Portanto, não há protocolos que levem em consideração a possibilidade de racionalizar a utilização de reguladores de crescimento de forma a eliminar e/ou reduzir minimamente a concentração necessária deles, no sentido de evitar o surgimento de possíveis efeitos não desejáveis, ocasionados pelo desequilíbrio no balanço hormonal endógeno (e.g. variação somaclonal, hiperhidricidade/vitrificação). Há uma tendência, atualmente, de se evitar, na medida do possível, a utilização e a dependência destes compostos, principalmente pela possibilidade de surgimento de variantes somaclonais ao longo de sucessivas repicagens, mas também para simplificar a formulação dos meios nutritivos, para cada etapa de micropropagação.

Para o acesso genético em estudo foi possível desenvolver um protocolo de micropropagação baseado num meio de cultura bastante simplificado, porém eficiente, que possibilitou a multiplicação e enraizamento em uma única etapa. No entanto deve-se considerar que as repostas morfogênicas em culturas de mandioca *in vitro* são também dependentes do acesso genético trabalhado (ROCA, 1984; OLIVEIRA, 2000). Desta forma, algumas variedades apresentam menor capacidade de adaptação e de responder adequadamente aos estímulos induzidos pelas condições de cultura *in vitro* (SMITH *et al.*, 1986). Assim, para diferentes acessos genéticos pode haver necessidade de ajuste e adequação da composição do meio de cultura, em maior ou menor grau, para estimular determinadas respostas morfogênicas, como descrito por Broomes & Lacon (1994). Estas adequações são possíveis testando-se modificações nas concentrações de sacarose, nitrogênio e também dos diferentes reguladores de crescimento em conjunto e/ou isoladamente. Deve-se considerar ainda que o tipo de explante a ser utilizado também está associado a esta capacidade de resposta aos estímulos do meio de cultura, bem como do ambiente de crescimento (i.e. temperatura, luminosidade), uma vez que diferentes explantes apresentam células com maior e/ou menor grau de totipotência, que terá consequências também na capacidade organogênica destes.

#### 4.3 ACLIMATAÇÃO

O processo adaptativo envolvido na transferência das plantas produzidas *in vitro* para as condições *ex vitro* é fundamental e imprescindível num processo de multiplicação clonal de determinada espécie, pois este processo irá refletir a capacidade de sobrevivência das plantas às condições naturais de campo. Durante este processo, as plantas sofrem de forma gradativa, mudanças na anatomia e fisiologia de folhas e raízes, que em última análise influenciarão a sobrevivência nas condições *ex vitro*, que normalmente apresentam baixa umidade relativa e altos níveis de intensidade luminosa (COLÓN-GUASP *et al.*, 1996). Logicamente, este processo de transição deve ser adaptado, dependendo da espécie trabalhada, uma vez que em muitas situações, mesmo quando os procedimentos básicos de aclimação são executados, a sobrevivência à transferência para as condições *ex vitro*, para algumas espécies, pode ser bastante reduzida, em função da incapacidade das plantas em se adaptarem fisiologicamente à manutenção das relações hídricas adequadas e/ou à perfeita transição do modo de nutrição mixotrófico para fotoautotrófico (COLÓN-GUASP

*etal.*, 1996). Neste sentido, Normand et al. (1996) e Martins *et al.* (1996), trabalhando com espécies de árvores, *Pinus sylvestris* e *Castanea sativa* respectivamente, demonstraram que a inoculação de fungos micorrízicos em estacas enraizadas *in vitro* ou *ex vitro* após a micropropagação, aumentaram a sobrevivência das plantas, durante o período de aclimação, como também influenciaram positivamente o crescimento das plantas após a transferência. Para a espécie *M. esculenta* mais especificamente, Azcón-Aguilar *et al.* (1997) verificaram que, a inoculação de fungos micorrízicos arbusculares (e.g. *Glomus deserticola*, *G. clarum* e *G. fasciculatum*), promoveu um melhor enraizamento, aumentando o percentual de sobrevivência e melhorando a tolerância ao estresse originado pela transferência das plantas micropropagadas para a condição *ex vitro*. Estes autores salientam, no entanto, que estas respostas de adaptação e crescimento das plantas são dependentes da interação acesso (clone) e do fungo micorrízico arbuscular utilizado. Portanto, há a necessidade de se estudar e selecionar o fungo micorrízico a ser utilizado, para cada acesso de mandioca, verificando qual combinação mais recomendável.

O sistema de aclimação utilizado neste estudo se mostrou altamente eficiente, independentemente do substrato utilizado, uma vez que possibilitou a sobrevivência de 100% das plantas após 45 dias de transferência das microplantas da condição *in vitro* para *ex vitro*. Este alto índice de sobrevivência foi relativamente superior aos obtidos nos trabalhos de Broomes & Lacon (1994), Guo & Liu (1994) e Oliveira *et al.* (2000), que obtiveram respectivamente 82, 95 e 92% de sobrevivência. Cabe salientar que estes trabalhos foram conduzidos com outros acessos de mandioca. No entanto, estas referências em conjunto, demonstram claramente que não houve dificuldades no processo de aclimação das mudas de mandioca produzidas *in vitro*.

No processo de aclimação de mudas produzidas *in vitro*, tão importante quanto as condições ambientais, principalmente relativas à umidade tanto do substrato quanto do ar, é a adequação do substrato, que permita além de altas taxas de sobrevivência das plantas, um crescimento rápido e vigoroso, de forma que as mesmas atinjam um tamanho mínimo suficiente, no menor período de tempo possível, para a transferência definitiva para as condições de campo. Neste sentido, no trabalho ora apresentado, o substrato que se mostrou mais adequado, após 45 dias de cultivo, foi aquele formado pela mistura de areia de rio e substrato comercial (1:1), em que se obteve para a maioria dos parâmetros de crescimento avaliados, com destaque para o peso da matéria fresca (0,72 g) e altura (7,64 cm), valores superiores em relação

aos substratos compostos somente por areia lavada e/ou substrato comercial isoladamente. Este substrato também possibilitou que as plantas tivessem maior vigor, haja vista que a velocidade de crescimento em altura, foi ao longo de todo período de aclimação, sempre superior aos valores obtidos nos demais substratos, além de permitir a formação de um denso e vigoroso sistema radicular. Esta análise indica que, a escolha do substrato adequado pode, não necessariamente, estar associada diretamente à sobrevivência das plantas transplantadas, mas também à capacidade de crescimento inicial e durante todo período de aclimação. Estes aspectos terão reflexo na sobrevivência e crescimento após o transplante das mudas em condições de campo.

Cabe salientar que as plantas crescidas em substrato composto somente por areia lavada, ao final de 45 dias de aclimação, apresentavam-se extremamente debilitadas, apresentando senescência quase que total de suas folhas, aspecto amarelado e sistema radicular bastante debilitado. Por outro lado, as plantas aclimatadas em substrato formado pela mistura de areia lavada e substrato comercial (1:1) e/ou somente substrato comercial após 45 dias nestas condições, apresentavam-se vigorosas, não apresentando qualquer sintoma de senescência foliar e com sistema radicular bem formado e vigoroso.

Quanto ao crescimento e desenvolvimento do sistema radicular é importante enfatizar que, independentemente do substrato utilizado, as raízes formadas *in vitro* não foram substituídas durante a aclimação. As raízes somente sofreram modificações, em termos morfológicos, pela emissão de raízes secundárias e pelo crescimento vigoroso, principalmente nos substratos compostos pela mistura areia e substrato comercial e/ou somente substrato comercial. Esta constatação indica que, as raízes formadas *in vitro* em plantas micropropagadas de *M. esculenta*, permaneceram funcionais durante a aclimação, favorecendo o processo de adaptação à condição *ex vitro*. Observou-se também que, as condições de aclimação desenvolvidas neste trabalho, obviamente associadas ao tipo de substrato, foram fundamentais para o pleno sucesso obtido, sugerindo que, para esta condição e para o acesso testado, a introdução eventual de fungos micorrízicos no processo de aclimação seria desnecessária.

#### 4.4 CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DE GERMOPLASMA DE MANDIOCA DE MESA (*Manihot esculenta* CRANTZ)

A cultura de células e tecidos vegetais associadas às técnicas de micropropagação e de criopreservação são estratégias aplicadas à

conservação *in vitro* de plantas. No entanto, para que a técnica de micropropagação seja viável, esta deverá ser adaptada de maneira que as sucessivas repicagens das culturas, em períodos relativamente curtos de tempo, que normalmente são necessários para a grande maioria das espécies, sejam evitadas e/ou realizadas em intervalos de tempo relativamente maiores. Repicagens constantes podem inviabilizar a manutenção de germoplasma *in vitro*, por longo período, devido às questões operacionais e de custos. Desta forma a conservação de germoplasma *in vitro*, via micropropagação, deve basear-se em sistemas que restrinjam o crescimento das culturas, o que normalmente ocorre através da manipulação das condições ambientais de crescimento das culturas (e.g. redução da temperatura, redução dos níveis de oxigênio de cultivo), das alterações na composição normal dos meios de cultura, seja pela adição de inibidores de crescimento, pelo aumento na concentração de sacarose, redução na quantidade de nutrientes minerais e/ou pela aplicação de estratégias (e.g. encapsulamento em alginato de cálcio), que dificultam o acesso das células e tecidos dos explantes aos fatores de crescimento presentes no meio de cultura (DOODS & ROBERTS, 1995; MARUYAMA *et al.*, 1997; OCA & NINO, 1997; SOUZA *et al.*, 2009).

#### **4.4.1 Efeito de diferentes concentrações de sacarose no meio de cultura sobre a conservação *in vitro* de microplantas de mandioca de mesa**

Neste estudo foram testados os efeitos das diferentes concentrações de sacarose (4, 6, 8 e 10%), acrescidas ao meio de cultura básico (MS semi-sólido sem reguladores de crescimento) sobre o crescimento das microplantas *in vitro*. Nestas condições, as microplantas inoculadas foram mantidas em sala de crescimento, durante 12 meses, sendo avaliadas a cada 3 meses.

O aumento na concentração de sacarose adicionado ao meio de cultura promoveu uma redução significativa do crescimento das microplantas, principalmente em altura, plenamente perceptível já aos 3 meses de cultivo e que perdurou durante os períodos subsequentes. No meio com concentração de sacarose de 10% esta redução se mostrou bastante drástica, sendo que as microplantas atingiram altura máxima muito inferior em relação às demais concentrações, enquanto que as cultivadas em meio com 4% de sacarose alcançaram as maiores alturas e nos meios com 6 e 8% de sacarose as microplantas atingiram altura intermediária entre estes dois extremos. De maneira geral as

microplantas inoculadas nos meios de cultura com 6, 8 e 10% de sacarose mantiveram um pequeno crescimento em altura, até o sexto mês de cultivo, período que atingiram sua altura máxima e que esta se manteve praticamente estabilizada até o décimo segundo mês de cultivo. Já as microplantas inoculadas em meio de cultura com 4% de sacarose mantiveram seu crescimento além do sexto mês de cultivo, inviabilizando sua manutenção *in vitro*, pois a altura atingida até este período ultrapassou o limite máximo de altura dos frascos de cultura. Além do que nesta situação as microplantas necessariamente tiveram que ser repicadas, uma vez que apresentavam início de senescência das folhas basais.

O aumento da concentração de sacarose adicionada ao meio de cultura reduziu a formação de nós (segmentos nodais e apicais) nas microplantas em comparação às menores concentrações. No entanto, esta inibição não se deu de forma tão intensa quanto à observada em relação à altura destas. Após 3 meses de cultivo, o menor número de nós ocorreu no meio de cultura com 10% de sacarose, enquanto que nos meios de cultura com 4, 6 e 8% de sacarose o número de nós formados foi muito semelhante. Os resultados indicaram que para os meios com concentração de sacarose de 8 e 10% o número máximo de nós formados foi atingido no sexto mês de cultivo, permanecendo estável até o final de 12 meses, enquanto que para o meio de cultura com concentração de sacarose de 6% o número máximo de nós formados se estabilizou a partir do nono mês de cultivo.

De fato o aumento na concentração de sacarose no meio de cultura, restringiu o crescimento e desenvolvimento das microplantas *in vitro*, mostrando-se ser uma boa alternativa para manutenção e conservação *in vitro* de microplantas de mandioca de mesa por períodos mais longos de tempo, até 12 meses, sem a necessidade de subculturas. No entanto, constatou-se também que este aumento na concentração de sacarose ao longo do tempo pode levar a um aumento na mortalidade das microplantas. Nos meios com concentração de 6 e 10% de sacarose, após 9 meses de cultivo, ocorreram maiores taxas de mortalidade das microplantas, quando comparadas com a mortalidade ocorrida no meio com 8% sacarose. Esta mortalidade foi mais acentuada no meio de cultura com 10% de sacarose, onde a mortalidade atingiu valores próximos de 80%, aos 12 meses de cultivo, enquanto que com 8% de sacarose a mortalidade de microplantas foi em torno de 25%, no mesmo período. Ressalta-se que, a partir do sexto mês de cultivo, ocorreu o início da morte da parte apical das microplantas cultivadas, independentemente da concentração de sacarose no meio de cultura. No

entanto, ressalta-se que com a ocorrência da morte do ápice, concomitantemente ocorreu indução de brotamento das gemas basais das microplantas, havendo formação de novos ramos por microplanta, que também foram utilizados como fonte de explantes (ápices e segmentos nodais) nas repicagens subsequentes.

Constatou-se também que a utilização de altas concentrações de sacarose não afetou a capacidade de brotamento dos explantes (segmentos nodais e/ou apicais) excisados de microplantas, que permaneceram viáveis durante o cultivo nos meios de cultura com diferentes concentrações de sacarose, ao longo de 12 meses, quando inoculados em meio de regeneração/multiplicação. Destacaram-se os explantes oriundos de microplantas crescidas no meio de cultura com 8% de sacarose, que mantiveram capacidade de brotamento de 100%, ao longo de todo período de 12 meses de cultivo, enquanto que para os explantes (principalmente segmentos nodais) oriundos de microplantas crescidas em meio de cultura com 6 e 10% sacarose o brotamento ocorreu em 96,66% destes. No entanto, a capacidade de enraizamento destes explantes, principalmente de ápices foi reduzida, já a partir do sexto mês de cultivo, principalmente dos ápices oriundos de microplantas crescidas nos meios de cultura com 6 e 10% de sacarose. De forma contrária, os ápices oriundos de microplantas crescidas durante 6 meses em meio de cultura com 8% de sacarose mantiveram uma alta taxa de enraizamento (96,66%). Por outro lado, Fogaça *et al.* (2010) usando meio de cultura com 8% de sacarose acrescido de 0,4  $\mu\text{M}$  de BAP e 1,6  $\mu\text{M}$  de ANA, demonstraram que esta foi a melhor condição para indução e formação de raiz tuberiforme *in vitro*, tanto para meio semi-sólido quanto para meio líquido. Os segmentos nodais oriundos de microplantas cultivadas em meios de cultura com diferentes concentrações de sacarose não apresentaram dificuldade de enraizamento, para todos os períodos testados e para as diferentes concentrações de sacarose. Destacam-se os explantes oriundos de plântulas cultivadas em meio de cultura com 8% de sacarose, em que se obteve 100,0% de enraizamento dos explantes, de plântulas com 3, 6, 9 e 12 meses de cultivo. No entanto para os oriundos de meios de cultura com 6 e 10% de sacarose o enraizamento foi reduzido para 86,66 e 93,33%, respectivamente, após 12 meses de cultivo.

O aumento crescente da concentração de sacarose nos meios de cultivo interferiu nas respostas de crescimento e desenvolvimento dos explantes de mandioca de mesa, ocasionando redução na altura das plantas e do número de nós após 12 meses de cultivo. No entanto, esta redução em parâmetros de crescimento não afetou a viabilidade das

gemas e nem a capacidade de enraizamento dos explantes, principalmente daqueles obtidos de microplantas cultivadas em meio com 8% de sacarose. Desta forma esta estratégia se configura como uma boa alternativa à conservação de germoplasma para esta espécie, uma vez que limita o crescimento *in vitro* das microplantas ao mesmo tempo que não afeta a viabilidade dos explantes (e.g. capacidade de brotamento e enraizamento, principalmente de segmentos nodais), durante pelo menos 12 meses de cultura, dispensando a necessidade de repicagens durante este período. De outra forma este protocolo nos parece bastante simples e de fácil exequibilidade, uma vez que utiliza estrutura, equipamentos e reagentes comuns, facilmente encontrados em laboratórios de cultura de tecidos de plantas, não requerendo portanto estrutura e equipamentos específicos para sua adoção.

#### **4.4.2 Efeito de diferentes concentrações de Phitagel no meio de cultura sobre o armazenamento de segmentos nodais de mandioca de mesa (*M. esculenta* – acesso 52) encapsulados em alginato de cálcio**

A técnica do encapsulamento de explantes em alginato é outra metodologia baseada na limitação do crescimento utilizada como estratégia para manutenção/conservação de germoplasma de plantas *in vitro*, além de ser utilizada, mediante algumas adaptações para a produção de sementes artificiais (SORVARI *et al.*, 1997; MARUYAMA *et al.*, 1997; STANDARDI & PICCIONI, 1998; REPUNTE, TAYA & TONE, 1995; JANEIRO, BALLESTER & VIEITEZ, 1997; KHOR, NG & LOH, 1998; SUPRASANNA, GANAPATHI & RAO, 1996).

Inicialmente para verificar a possibilidade de usar a técnica de encapsulamento de explantes (segmentos nodais e ápices), foi testada a capacidade de retomada do crescimento dos explantes encapsulados em alginato de cálcio, inoculando-os em meio de regeneração/multiplicação, logo após a formação das cápsulas. Os resultados dos experimentos inicialmente conduzidos para averiguar a capacidade de retomada do crescimento (brotamento e enraizamento) dos explantes em meio de regeneração/multiplicação demonstraram que os as cápsulas não impediram o rebrotamento dos explantes (e.g. ápices e segmentos nodais), uma vez que os mesmos após serem inoculados em meio de regeneração/multiplicação, demonstraram uma rápida capacidade de brotamento, principalmente para ápices encapsulados, que atingiram já no quinto dia após a inoculação 80% de brotamento,

atingindo a taxa máxima de brotamento (100%) a partir do oitavo dia após a inoculação. Já para os segmentos nodais encapsulados a capacidade de brotamento foi significativamente mais lenta, obtendo-se aos 5 dias após a inoculação somente 23,33% de explantes brotados e taxa máxima de brotamento (93,33%), somente após o décimo dia de cultura. Estes resultados indicam que as cápsulas não causam restrições de natureza física que impeçam a retomada de crescimento dos explantes. Ou seja, as cápsulas não impediram e/ou dificultaram a difusão de nutrientes e dos fatores de crescimento presentes no meio de regeneração/multiplicação, que entrando em contato com os explantes induziram o brotamento das gemas pré-existentes, permitindo seu crescimento e desenvolvimento dentro de padrões normais, da mesma forma como acontece quando estes não são encapsulados.

No entanto nos experimentos de manutenção dos explantes encapsulados em meios de cultura limitantes ao crescimento (água destilada e fitagel nas concentrações de 0,1; 0,2 e 0,3% (w/v) os resultados indicaram que os explantes encapsulados e armazenados nos diferentes meios de cultura limitantes ao crescimento, senesceram progressivamente e mesmo antes de completar 3 meses de armazenamento estavam totalmente inviáveis. A morte dos explantes encapsulados em curto período de tempo possivelmente deveu-se ao esgotamento das reservas endógenas de carboidratos remanescente nos explantes, haja vista que nem as cápsulas e tão pouco o meio de armazenamento possuíam em sua formulação qualquer fonte de carbono e energia que pudesse ser utilizado metabolicamente pelos explantes, uma vez que tanto o alginato presente nas cápsulas (SORVARI *et al.*, 1997) quanto o fitagel presente no meio de cultura de armazenamento são inertes para a célula vegetal. Desta forma, como não há no sistema proposto uma possível fonte de carbono e energia (e.g. sacarose) este fator determinou a capacidade de manutenção do metabolismo das células, mesmo que fossem em níveis mínimos, porém suficiente para manutenção da viabilidade das células e/ou tecidos dos explantes. Maruyama *et al.* (1997) e Nunes *et al.* (2003) em seus estudos com diferentes espécies do gênero *Cedreia* obtiveram resultados bastante promissores de armazenamento e conservação *in vitro* utilizando a metodologia do encapsulamento, porém acrescentando ao meio de formação das cápsulas 2% (w/v) de sacarose e MS integral, diferentemente do testado neste estudo, onde se utilizou metade da concentração de MS sem o acréscimo de sacarose. Maruyama *et al.* (1997) obteve resultados ainda superiores quando associou a esta metodologia a redução da temperatura para 12°C, obtendo ao final de 12

meses de armazenamento taxa de rebrotamento de 80% dos explantes. Especificamente com mandioca, Souza *et al.* (2009) relatam que a conservação de germoplasma de mandioca realizada em sua instituição baseia-se na limitação do crescimento induzida pela redução da temperatura, da intensidade luminosa e do fotoperíodo na sala de crescimento, porém sem a adoção do encapsulamento de explantes. Logo, o sucesso na conservação de explantes por métodos que limitam o crescimento de explantes encapsulados depende de uma adequação na formulação de composição das cápsulas, acrescentando e/ou reduzindo fatores de crescimento (e.g. sacarose e nutrientes minerais), dependendo da espécie vegetal trabalhada, numa proporção mínima suficiente para manutenção de alta viabilidade e estabilidade genética (ROCA *et al.*, 1991) dos explantes pelo maior período possível no meio de armazenamento limitante ao crescimento. Associado a esta adequação na formulação das cápsulas a manipulação das condições ambientais, principalmente relacionadas à redução na temperatura, intensidade luminosa e fotoperíodo do ambiente de manutenção das culturas, são fatores essenciais na conservação de germoplasma ao longo do tempo.

Pelos resultados preliminares obtidos bem como pelas considerações feitas acima parece razoável concluir-se que o encapsulamento em alginato de cálcio de ápices e segmentos nodais de mandioca de mesa (*M. esculenta*), e seu posterior armazenamento em meios limitantes ao crescimento poderão ser uma alternativa futura de conservação de germoplasma desta espécie, mesmo considerando que os resultados de fato não pareçam animadores numa análise preliminar. No entanto há que se considerar a necessidade premente de aprimoramento desta técnica para esta espécie, principalmente no que concerne à adequação das condições ambientais de armazenamento das culturas, determinando-se as condições ideais de temperatura e intensidade luminosa, além de adequações em relação à concentração de alginato das cápsulas, concentração de nutrientes essenciais (e.g. sacarose e/ou outra fonte de carbono e nutrientes minerais), bem como na adequação do meio de armazenamento, além de outras condições essenciais (condições físicas do ambiente de cultivo, e.g. temperatura, intensidade luminosa e fotoperíodo) para manter viáveis os explantes em condições limitantes ao seu crescimento e assim incrementar a eficiência do sistema.

#### 4.4.3 Desenvolvimento de métodos para criopreservação de ápices e segmentos nodais de mandioca de mesa (*M. esculenta* – acesso 52)

A possibilidade de conservação *ex situ* de germoplasma vegetal por longos períodos ou mesmo indefinidamente é possível através da aplicação e adequação das técnicas de criopreservação às espécies de interesse. Inúmeras vantagens estão associadas a estas técnicas quando comparadas com os métodos convencionais de conservação através das técnicas de micropropagação. Normalmente os métodos convencionais de conservação *in vitro* apresentam como principais problemas: o alto custo de manutenção associados à constante necessidade de repicagens para manutenção das culturas; a disponibilidade de área dos laboratórios; o aumento do risco de aparecimento de contaminações associadas às constantes manipulações das culturas para repicagem e o possível aparecimento de variantes somaclonais em função das constantes repicagens durante um longo período de tempo de cultivo *in vitro*. Segundo Sakai *et al.* (1997) a criopreservação em nitrogênio líquido surge como uma estratégia de conservação por longos períodos, utilizando o mínimo de espaço físico e redução dos custos de manutenção, com diminuição do uso de mão de obra, de reagentes e de manutenção da estrutura de cultivo.

No entanto, o sucesso na criopreservação depende da quantidade de água presente nas células e/ou tecidos dos explantes a serem criopreservados. Neste sentido, algumas técnicas de desidratação por processos químicos e/ou físicos (e.g. vitrificação e encapsulamento de explantes), foram desenvolvidos para conservação de espécies tropicais (ENGELMANN, 2000; SAKAI, 1997; SAKAI, 2000) e especificamente para mandioca CHAROENSUB *et al.*, 1999 e CHAROENSUB *et al.*, 2003). Estes procedimentos promovem a desidratação dos explantes e redução da quantidade interna de água em níveis que mantêm a viabilidade das células e/ou tecidos vegetais e ao mesmo tempo torna-os mais tolerantes e resistentes aos possíveis efeitos danosos do congelamento, principalmente relacionados a formação interna de cristais de gelo que causam o rompimento das células e consequente extravasamento celular. A vitrificação consiste basicamente de um processo de desidratação osmótica pela exposição dos explantes a uma solução de vitrificação altamente concentrada antes da imersão dos mesmos em nitrogênio líquido. O sucesso da criopreservação, portanto dependerá da osmotolerância dos explantes aos procedimentos de desidratação química, mantendo sua viabilidade tanto após a desidratação quanto após o congelamento.

A aplicação do protocolo de vitrificação e congelamento em nitrogênio líquido descritos especificamente para mandioca por Charoensub *et al.* (2003) não se mostraram eficientes para a conservação do germoplasma de mandioca de mesa utilizados neste estudo. Para tanto, algumas adaptações neste protocolo foram realizadas e testadas como segue abaixo.

#### 4.4.3.1 Efeito da desidratação química sobre a sobrevivência de ápices e segmentos nodais de mandioca de mesa (*M. esculenta* – acesso 52)

Inicialmente foi testado integralmente o protocolo descrito por Charoensub *et al.* (2003). Estes pesquisadores obtiveram relativo sucesso aplicando este protocolo para 10 acessos de mandioca, obtendo percentual de sobrevivência dos explantes acima de 70%. No entanto a aplicação deste ao acesso objeto deste estudo não se mostrou minimamente eficiente, uma vez que ocorreu a morte de todos os explantes após o congelamento em nitrogênio líquido.

Como os acessos utilizados nestes estudos são diferentes, supõe-se que a diferença evidenciada nas respostas aos tratamentos poderia estar associada a menor resposta dos explantes (ápices e segmentos nodais) do acesso em estudo ao tratamento de vitrificação, mais especificamente a etapa inicial de desidratação em solução de MS e sacarose 0,3 M. Assim foram testados tempos diferentes de desidratação nesta etapa e mantendo-se as demais como descrito no protocolo citado, sem, no entanto submetê-los ao congelamento em nitrogênio líquido. Desta forma verificou-se que os ápices são mais tolerantes aos procedimentos de vitrificação adotados, enquanto que os segmentos nodais são menos tolerantes independentemente do tempo de exposição e de como os explantes foram expostos a esta solução (meio líquido ou sobre ponte de papel filtro). Em relação ao tempo de desidratação que possibilitou maior taxa de sobrevivência dos ápices constata-se que dependendo da forma como estes explantes foram expostos à solução de desidratação, a sobrevivência destes ocorreu diferentemente. Quando estes foram desidratados em solução líquida as maiores taxas de sobrevivência (acima de 93,33%) foram obtidas quando os explantes permaneceram sob desidratação durante 24 e/ou 40 horas. Porém quando os explantes foram desidratados sobre pontes de papel filtro a maior taxa de sobrevivência observada (96,66%) ocorreu com os explantes que foram desidratados durante 16 horas, resultado semelhante ao obtido por Charoensub *et al.* (2003). De maneira semelhante quando os explantes nesta mesma condição foram

desidratados durante 24 e 40 horas a taxa de sobrevivência manteve-se relativamente alta, acima de 70%.

No entanto os resultados demonstraram que mesmo aumentando-se os tempos iniciais de desidratação (24 e 40 horas) e aplicando na sequência todos os procedimentos descritos por Charoensub *et al.* (2003) inclusive a imersão dos explantes em nitrogênio líquido, ocorreu 100% de mortalidade dos explantes. Isso demonstra que possivelmente, as etapas de vitrificação e osmoproteção dos explantes sejam cruciais para o sucesso na criopreservação do acesso estudado, devendo-se proceder à readequação dos mesmos para tornar os explantes menos suscetíveis aos efeitos danosos do congelamento. Por outro lado os resultados permitem deduzir que uma readequação no processo de congelamento poderá também surtir efeito na sobrevivência. Neste sentido pode-se pensar na possibilidade de realizar o congelamento dos explantes mais lentamente e de forma gradual, ao invés de uma forma tão abrupta quanto à realizada pela imersão direta em nitrogênio líquido.



## 5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos em relação à aplicação de diferentes abordagens biotecnológicas experimentais, baseadas nas técnicas de cultura de células e tecidos vegetais estabelecidas no trabalho em tela, aplicadas à otimização de protocolos de micropropagação e conservação de germoplasma de mandioca de mesa (*Manihot esculenta* Crantz) *in vitro* permitem as seguintes conclusões:

Foi desenvolvido um sistema de indução de brotações matrizes em condições semi-assépticas capaz de permitir a obtenção de explantes (ápices e segmentos nodais) para obtenção de culturas axênicas numa etapa subsequente.

O estabelecimento de culturas axênicas foi possível em função da definição de um protocolo eficiente de desinfecção de explantes (ápices e segmentos nodais oriundos de brotações obtidas em condições semi-assépticas) composto pela imersão destes em solução de álcool 70% durante 1,5 minutos, seguida pela imersão em solução de hipoclorito de sódio durante 3 minutos e inoculação posterior em meio MS semi-sólido acrescido de 3% de sacarose.

Um protocolo completo de micropropagação, envolvendo a multiplicação e enraizamento dos explantes (segmentos nodais e ápices), numa única etapa, foi desenvolvido usando-se o meio de cultura composto por MS semi-sólido, acrescido de 4% de sacarose e 0,01 mg/l de BAP.

No processo de aclimação o substrato composto pela mistura de areia e substrato comercial (1:1) se mostrou o mais adequado, obtendo-se 100% de sobrevivência, além de um maior crescimento e desenvolvimento das microplantas após 45 dias de transplante.

Para a conservação de germoplasma em relação ao acesso genético testado, a utilização do meio de cultura composto por MS semi-sólido acrescido de 8% de sacarose possibilitou a manutenção de microplantas viáveis sob cultivo *in vitro* durante um período mínimo de 12 meses sem a necessidade de subcultivos. Esta metodologia se mostra promissora e eficiente por reduzir custos relacionados à utilização de espaço, reagentes e mão de obra no laboratório.



## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACEDO, V.Z. Meristem culture and *in vitro* maintenance of Philippine cassava. In: INTERNATIONAL SCIENTIFIC MEETING ON CASSAVA BIOTECHNOLOGY NETWORK, 2., 1994, Bogor. **Proceedings**. Bogor: Cassava Biotechnology Network, 1994. p.202-209.

ALLEM, A.C. **The origin of *Manihot esculenta* Crantz (Euphorbiaceae)**. Genetic Resource and Crop Evolution, v.41, p. 133-150, 1994.

ALLEM, A.C. The Origins and Taxonomy of Cassava, In: R.J. Hillocks, J.M. Thresh and A.C. Bellotti (Eds), **Cassava: Biology, Production and Utilization**. CABI Publishing, p. 1-16, 2002.

ALVES, A.C.; VOGT, G.A.; FANTINI, A.C.; OGLIARI, J.B.; MARASCHIN, M. Variedades locais de milho e a agricultura familiar do extreme oeste catarinense. In: CANCI, A.; VOGT, G.A.; CANCI, I. (Eds.). **A diversidade das espécies crioulas em Anchieta-SC: Diagnóstico, resultado de pesquisa e outros apontamentos para a conservação da agrobiodiversidade**. São Miguel do Oeste: McLee, 112 p. 2004.

AZCÓN-AGUILAR, C.; CANTOS, M.; TRONCOSO, A.; BAREA, J.M. Beneficial effect of Arbuscular mycorrhizas on acclimatization of micropropagated cassava plantlets. **Scientia Horticulturae**, vol. 72: 63-71. 1997.

BALAGOPALAN, C. Cassava utilization in food, feed and industry. In: HILLOCKS, R.J.; THRESH, J.M.; BELLOTTI, A.C. Cassava: Biology, production and utilization. Wallingford: **CAB International**: 2002. p.301- 317.

BARRUETO CID, L.P.; SILVA, R.E.P da. **Novas aplicações da cultura de tecidos na mandioca (*Manihot esculenta*, Crantz)**. XI Congresso Brasileiro de mandioca. Campo Grande , MS, 25-28 X, 2005. Secretaria de Estado de Planejamento e de Ciência e Tecnologia de Mato Grosso do Sul.

BARRUETO CID, L.P.; JORDAN, M.Z. **A contaminação in vitro de plantas**. Brasília,DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento/Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, ISSN 1676-1340; n.122). 2006. 20p.

BARRUETO CID, L.P.; CARVALHO, L.J.C.B.; SILVA, R.E.P. da; SORIANO, L.. **Protocolo de micropropagação e conservação de 23 gemoplasmas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz)**. Boletim de pesquisa e desenvolvimento, 187. Brasília, DF: EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia. 2007. 12 p.

BEYENE, D. **Micropropagation of selected cassava varieties (*Manihot esculenta* Crantz) from meristem culture**. Thesis for Master Science Degree (Biology-Botanical Science). Adis Ababa University- Faculty of Science - Etiópia. 2009.

BROOMES, V.F. & LACON, R. Influence of medium components on hardening of cassava after micropropagation in liquid nutrient medium. In: INTERNATIONAL SCIENTIFIC MEETING ON CASSAVA BIOTECHNOLOGY NETWORK, 2., Bogor, 1994. **Proceedings**. Bogor : Cassava Biotechnology Network, 1994. p.210-219.

BRUSH, S.B. **Genes in the field: On farm conservation of crop diversity**. Rome-Italy: IPGRI, Lewis Publishers, Boca Raton-USA-IDRC, 2001.

CARVALHO, L.J.C.B. Biodiversidade e biotecnologia em mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). In: ANAIS XI CONGRESSOBRASILEIRO DE MANDIOCA. **Resumos...** Campo Grande:Embrapa Agropecuária Oeste, 2005.

CHAROENSUB, R.; PHANSIRI, S.; YONGMANITCHAI, W.; SAKAI, A. Routine cryopreservation of in vitro-grown axillary apices of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) by vitrification: importance of a simple monodal culture. **Scientia Horticulturae**, vol. 98: p. 485–492. 2003.

CHAROENSUB, R.; PHANSIRI, S.; SAKAI, A.; YONGMANITCHAI, W. Cryopreservation of cassava in vitro-grown shoot tips cooled to -196° C by vitrification. **CryoLetters**, vol. 20: p. 89–94. 1999.

COCK, J. **Cassava. New potential for a neglected crop.** Boulder: Westview Press, 1985, 240p.

COLÓN-GUASP, W.; NELL, T.A.; KANE, M.E.; BARRET, J.E. Effect of abscisic acid on “ex vitro” acclimatization of *Aronia arbutifolia* (L.) Pers. **Journal of American Society for Horticultural Science**, 121 (suppl.1): 101-104. 1996.

DOODS, J.H. & ROBERTS, L.W. **Experiments in plant tissue culture.** 3ª ed. New York, Cambridge University Press, 1995. p. 126-135.

EMPERAIRE, L. A biodiversidade agrícola na Amazônia brasileira: recurso e patrimônio. **Revista do Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional**, v. 32, p. 23-35, 2005.

ENGELMANN, F., 2000.Importance of cryopreservation for the conservation of plant genetic resources. In: Engelmann, F., Takagi, H. (Eds.), **Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm.** JIRCAS, Tsukuba, Japan, 2000. p. 8–20.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations).Rome, Italy. Disponível em: <http://www.fao.org/ag/agp/agpc/gcnds/>. Acesso em: 10/05/2013.

FENIMAN, C. M. **Caracterização de raízes de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) do cultivar IAC 576-70 quanto à cocção, composição química e propriedades do amido em duas épocas de colheita.** Dissertação de mestrado Ciência e Tecnologia de Alimentos. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2004.

FOGAÇA, M.C.; SANT`ANNA-SANTOS, B.F.; CORDEIRO, D.C.; CORREIA, T.D.; FINGER, F.L.; OTONI, W.C.; CARGNIN, A. Microtuberização *in vitro* de cultivares de Mandioca: aspectos morfológicos e anatômicos. **Acta bot. bras.** 24(3): 624-630. 2010.

FUKUDA, W.M.G.; COSTA, I.R.S.; VILARINHOS, A.D.; OLIVEIRA, R.P. de. **Banco de Germoplasma de Mandioca: manejo, conservação e caracterização.** Cruz das Almas, BA: EMBRAPA-CNPMPF, 1996. 103p. (EMBRAPA-CNPMPF.Documentos, 68).

FUKUDA, W.M.G.; GUEVARA, C.L. **Descritores Morfológicos e agrônômicos para a caracterização de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz)**. Cruz das Almas: Embrapa- CNPMPF, 38p. 1998.

FUKUDA, W.M.G.; SILVA, S.O.E. Melhoramento de mandioca Brasil. In: CEREDA, M.P. (Org.). Agricultura: Tuberosas amiláceas latino americanas. São Paulo, **Fundação Cargil** (1ª Ed.), p. 242-257. 2002.

FUKUDA, W.M.G.; COSTA, I.R.S.; SILVA, A.S. Manejo e Conservação de Recursos Genéticos de Mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) na Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical. Cruz das Almas, Bahia **EMBRAPA**. 2005.

GUO, J.Y.; LIU, Y.Q. Rapid propagation of cassava by tissue culture and its application in rural districts in China. In: INTERNATIONAL SCIENTIFIC MEETING ON CASSAVA BIOTECHNOLOGY NETWORK, 2., Bogor, 1994. **Proceedings**. Bogor : Cassava Biotechnology Network, 1994. p.183-189.

HERSHEY, C. H. Cassava breeding-CIAT headhunters. In: HOWELER, R. H.,

KAWANO, K. (Ed.) Cassava Breeding and Agronomy Research in Asia, 1988,

Bangkok. **Proceedings**... Cali: Centro Internacional de Agricultura Tropical, 1988.

JANEIRO, L.V.; BALLESTER, A.; VIEITEZ, A.M. "In vitro" response of encapsulated somatic embryos of camellia. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, vol. 51: 119-125. 1997.

KERR, W.E.; CLEMENT, C.R. Práticas agrícolas de conseqüências genéticas que possibilitaram aos índios da Amazônia uma melhor adaptação às condições ecológicas da região. **Acta Amazônica**, v.10, p.251-261, 1980.

KHOR, E.; NG, W.F.; LOH, C.S. Two-coat system for encapsulation of *Spathoglottis plicata* (Orchidaceae) seeds and protocorms. **Biotechnology and Bioengineering**, vol. 59 (suppl. 5): 635-639. 1998.

KINOSHITA, I. & SAITO, A. Propagation of Japanese white birch by encapsulated axillary buds, regeneration of plantlets under aseptic conditions. **J. Jpn For Soc.**, vol. 72 : 166-170. 1990.

LANCASTER, P.A.; INGRAM, J.S.; LIM, M.Y.; COURSEY, D.G. Traditional cassava based foods: Survey of processing techniques. **Economy Botany**, vol. 36 (1): 12-45. 1982.

MARTINS, P.S. Biodiversity and agriculture: patterns of domestication of Brazilian native plants species. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.66, p.219-226, 1994.Suplemento 1.

MARTINS, A.; BARROSO, J.; PAIS, M.S. Effect of ectomycorrhizal fungi on survival and growth of micropropagated plants and seedlings of *Castanea sativa* Mill. **Micorrhiza**, vol. 6: 265-270. 1996.

MARUYAMA, E.; KINOSHITA, I.; ISHII, K.; OHBA, K.; SAITO, A. Germplasm conservation of the tropical Forest trees, *Cedrela odorata* L., *Guazuma crinita* Mart., and *Jacaranda mimosaeifolia* D. Don., by shoot tip encapsulation in calcium-alginate and storage at 12-25°C. **Plant Cell Report**, vol. 16: 393-396. 1997.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiology Plantarum**, n.15: 473 – 497.1962.

MURRAY, A. Cassava presentation, 2010. Disponível em: <<http://www.morris.umm.edu>>. Acesso em: 10/08/2013.

NAIR, G.M.; PRABHAKAR, M.; NAIR, N.G.; GHOSH, S.P. Production of cassava planting material in India. In: GLOBAL WORKSHOP ON ROOT AND TUBER CROPS PROPAGATION, 1983, Cali. **Proceedings**. Cali : CIAT, 1986. p.187-192.

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

NASSAR, N., ORTIZ, R. Melhorar a mandioca e alimentar os pobres. **Scientific American Brasil**, p. 72-77, 2010.

NISHIZAWA, S., SAKAI, A., AMANO, Y., MATSUZAWA, T. Cryopreservation of asparagus (*Asparagus officinalis* L.) embryogenic suspension cells and subsequent regeneration by vitrification method. **Plant Sci.** vol. 91: 67–73. 1992.

NORMAND, L.; BARTSCHI, H.; DEBAUD, J.; GAY, G. Rooting and acclimatization of micropropagated cuttings of *Pinus sylvestris* are enhanced by the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum*. **Physiologia Plantarum**, vol. 98: 759-766. 1996.

NUNES, E. C.; BENSON, E. E.; OLTRAMARI, A. C.; ARAUJO, P. S.; MOSER, J. R. and VIANA, A.M. *In vitro* conservation of *Cedrela fissilis* Vellozo (Meliaceae), a native tree of the Brazilian Atlantic Forest. **Biodiversity and Conservation**, v. 12: 837 – 848. 2003.

OBOH, G. & ELUSIYAN, C.A. Changes in the nutrient and anti-nutrient content of micro-fungi fermented cassava flour produced from low- and medium-cyanide variety of cassava tubers. **African Journal of Biotechnology**, vol. 6 (18): 2150-2157. 2007.

OKA, S. & NIINO, T. Long term storage of Pear (*Pyrus* spp.) shoot cultures “in vitro” by minimal growth method. **JARQ**, 31 (suppl.): 1- 7. 1997.

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

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

OLSEN, K.M. & SCHAAL, B.A. Microsatellite variation in cassava (*Manihot esculenta*, Euphorbiaceae) and its wild relatives: further evidence for a southern Amazonas origin of domestication, American Journal Of Botany, 88(1), p.131-142, 2001.

ONUOCH, C.I. & ONWUBIKU, N.I.C. Micropropagation of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) using different concentrations of Benzyaminiopurine (BAP). **J. of Engineering and Applied Sci.**, vol. 2(7): 1229-1231.2007.

PEREIRA, K.J.C. **Agricultura tradicional e manejo da agrobiodiversidade na Amazônia Central; um estudo de caso nos roçados de mandioca das Reservas de Desenvolvimento Sustentável Amaná e Mamirauá, Amazonas.** Tese (Doutorado em Ecologia Aplicada) Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Centro Nacional de Energia Nuclear na Agricultura, ESALQ/CENA. Piracicaba, 2008.222p

PERONI, N.; MARTINS, P. S. Influência da dinâmica agrícola itinerante na geração de diversidade de etnovarietades cultivadas vegetativamente. **Interciencia**.Caracas, v. 25, n. 1, p. 22-29, 2004.

REPUNTE, V.P.; TAYA, M.; TONE, S. Preparation of artificial seeds using cell aggregates from Horseradish Hairy roots encapsulated in alginate gel with paraffin coat. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, 79 (suppl. 1): 83-86. 1995.

ROCA, W.M. Cassava. In: SHARP, W.R.; EVANS, D.A.; AMMIRATO, P.V.; YAMADA, Y. (Ed.). **Handbook of plant cell culture: crop species.** New York: Mcmillan, 1984. p. 269-301.

ROCA, W.M.; ARIAS, D.I.; CHÁVEZ, R. Métodos de conservación in vitro del germoplasma. In: ROCA, W.M. & MROGINSK, L.A. (Ed.) **Cultivo de tejidos em la agricultura: fundamentos y aplicaciones.** Cali: CIAT, 1991. p. 697-713.

ROGER, D.J; APPAN, S.G; Manihot and Manohotoides (Euphorbiaceae). **Flora Neotropcs.**v.13, p.1-272, 1973.

SAKAI, A. Potentially valuable cryogenic procedures for cryopreservation of cultured plant meristems. In: RAZDAN, M.K., COCKING, E.C. (Eds.), **Conservation of Plant Genetic Resources In Vitro.** Scientific Publishers, New Hampshire, 1997. p. 53–66.

SAKAI, A. Development of cryopreservation techniques. In: ENGELMANN, F., TAKAGI, H. (Eds.), **Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm.** JIRCAS, Tsukuba, Japan,2000. pp. 1–7.

SAKAI, A., KOBAYASHI, S., OIYAMA, I. 1990. Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification. **Plant Cell Rep.** vol. 9, p. 30–33. 1990.

SILVA, R.P.da. **Micropropagação e indução de crescimento secundário em raízes *in vitro* de diferentes genótipos de mandioca (*Manihot esculenta*, Crantz)**. Relatório final. Brasília, DF: EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia. 2004. 12p.

SMITH, M.K.; BIGGS, B.J.; SCOTT, K.J. *In vitro* propagation of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, vol. 6, p. 221-228, 1986.

SORVARI, S.; TOLDI, O.; AHANEN, K.; VIINAMÄKI, T.; HAKONEN, T.; TAHVONEN, R. Using polyssaccharides and galactomannans as gelling agents in capsule formation of artificial seeds. **Journal American Societ Horticultural Science**, vol. 122 (suppl.6): 878-883. 1997.

SOUZA, L.D.; SOUZA, L.S.; GOMES, J.C. **Exigências edáficas da cultura da mandioca**. 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 – BA:Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, p. 170 – 214, 2006.

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

STANDARDI, A. & PICCIONI, E. Recent perspectives on synthetic seed technology using nonembryogenic “*in vitro*” derived explants. **Int. Journal Plant Science**, vol. 159 (suppl.6): 968-978. 1998.

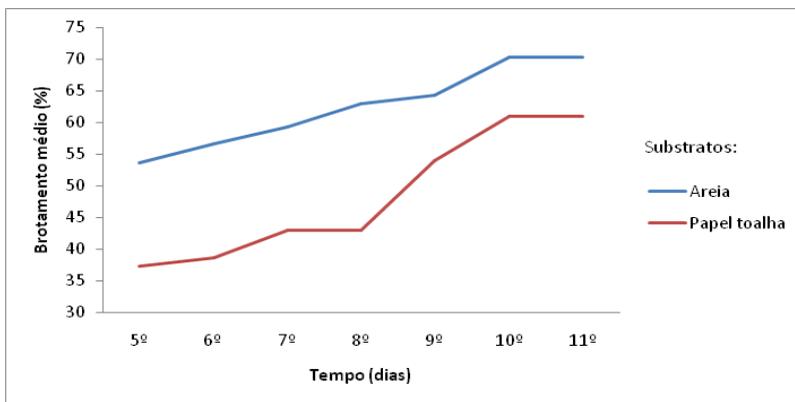
SUPRASANNA, P.; GANAPATHI, T.R.; RAO, P.S. Artificial seeds in Rice (*Oryza sativa* L.): encapsulation of somatic embryos from mature-embryo callus cultures. **Asia Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology**, vol. 4 (suppl. 2): 90-93. 1996.

TAIZ, L. & ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 4ª Ed., Artmed, Porto Alegre, 2009.

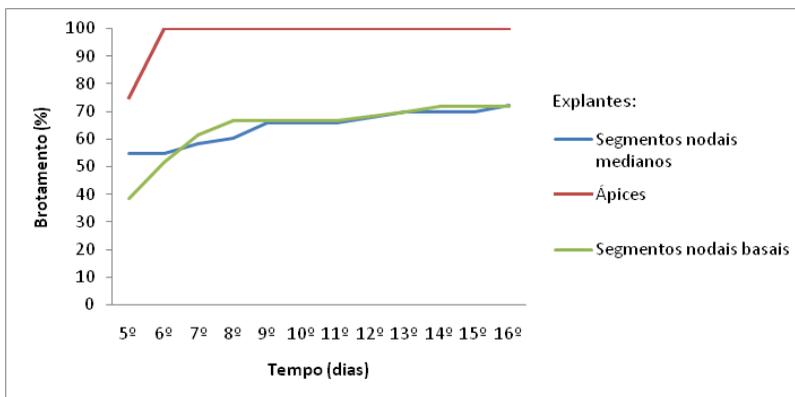
ZUIN, G.C.; VIDIGAL FILHO, O.S.; KVITSCHAL, M.V.; VIDIGAL, M.C.G.; COIMBRA G.K. Divergência genética entre acessos de

mandioca de mesa coletados no município de Cianorte, região Noroeste do Estado do Paraná. **Semina**. Ciências Agrárias (Online), 30: 21-30. 2009.

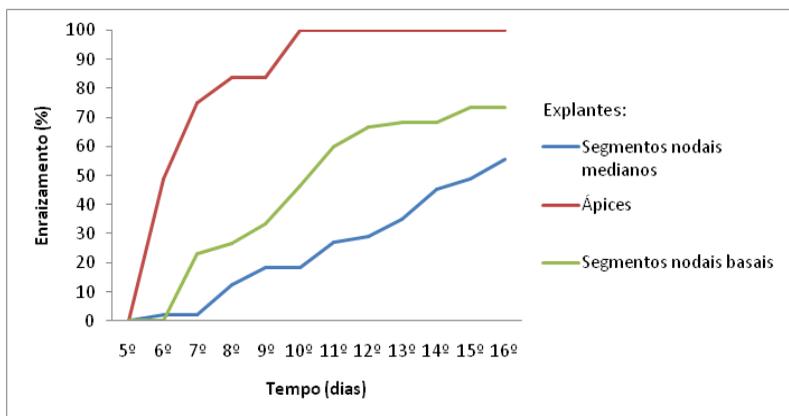
## APÊNDICES



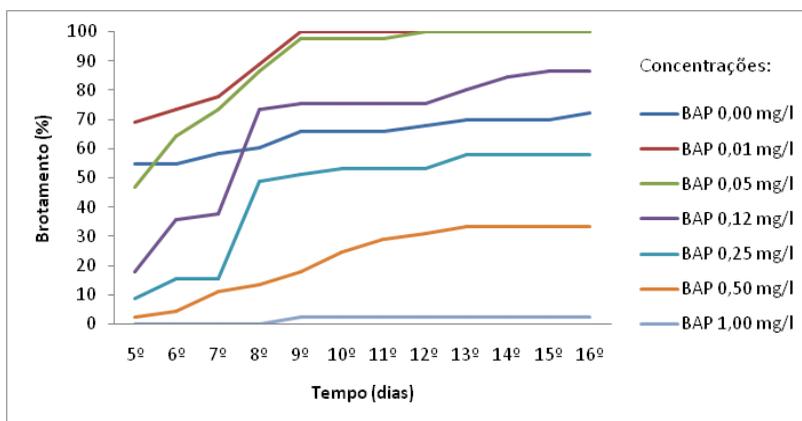
**Figura 18:** Efeito de diferentes substratos (areia e papel toalha) na indução de brotamento das gemas de segmentos de manivas de mandioca de mesa contendo uma ou duas gemas mantidas durante dez dias em condições semi-assépticas. Percentagem obtida de três repetições contendo no mínimo 23 gemas pré-existentes por tratamento.



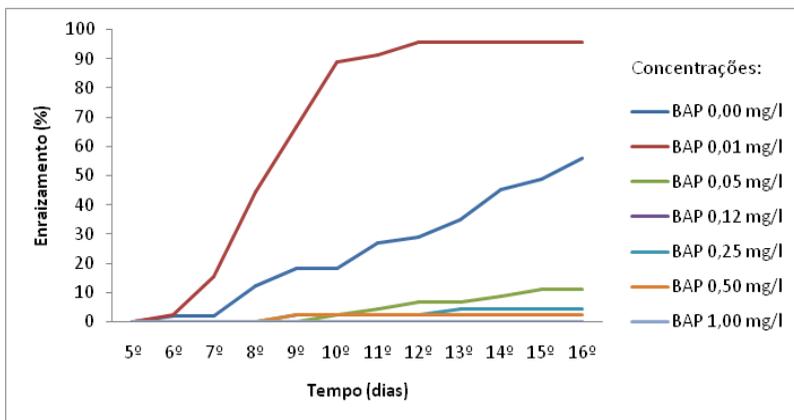
**Figura 19:** Brotamento *in vitro* de diferentes tipos de explantes, contendo uma única gema, obtidos a partir de brotações axênicas de mandioca de mesa (*M. esculenta* - acesso 52), após cultivo *in vitro* em meio de cultura MS, suplementado com 4% sacarose, 0,2% de Phytigel e isento de reguladores de crescimento. Os valores representam a média de no mínimo 3 repetições com 12 explantes por tratamento.



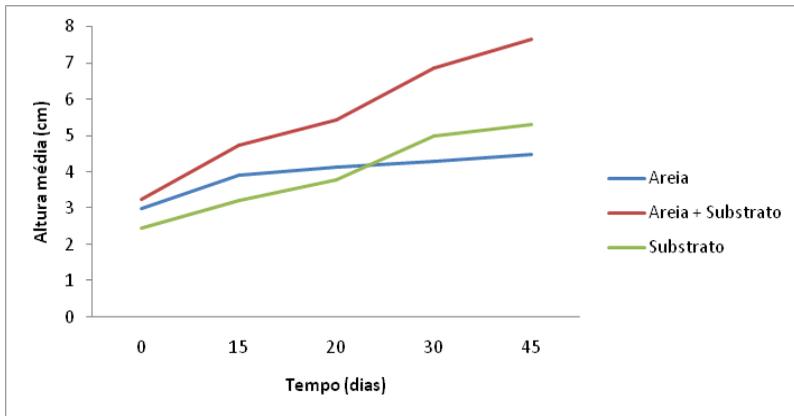
**Figura 20:** Enraizamento *in vitro* de diferentes tipos de explantes, contendo uma única gema, obtidos a partir de brotações axênicas de mandioca de mesa (acesso 52), após cultivo *in vitro* em meio de cultura MS, suplementado com 4% sacarose, 0,2% de Phytigel e isento de reguladores de crescimento. Os valores representam a média de no mínimo 3 repetições com 12 explantes por tratamento.



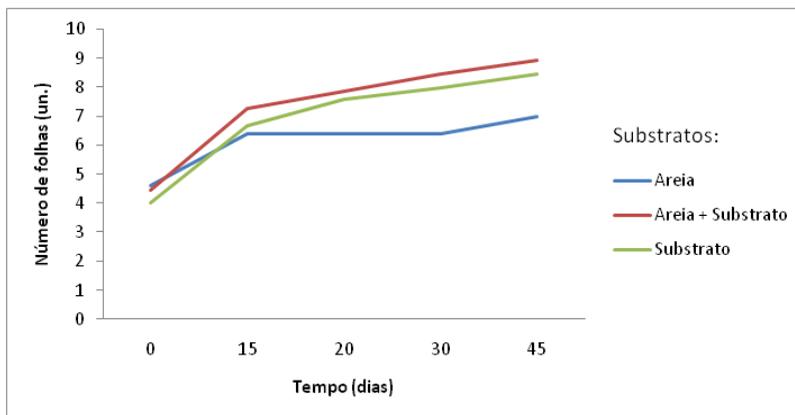
**Figura 21:** Percentagens médias de brotamento de gemas de segmentos nodais de mandioca de mesa (*M. esculenta* - Acesso 52) cultivados *in vitro* em meio de cultura MS semi-sólido, suplementado com 4% de sacarose e diferentes concentrações de BAP, no decorrer de 16 dias, avaliados a partir do quinto dia após a inoculação. Foram utilizados no mínimo 3 repetições com 12 explantes cada, por tratamento.



**Figura 22:** Percentagens médias de enraizamento de segmentos nodais de mandioca de mesa (*M. esculenta* - Acesso 52) cultivados *in vitro* em meio de cultura MS semi-sólido, suplementado com 4% de sacarose e diferentes concentrações de BAP, no decorrer de 16 dias, avaliados a partir do quinto dia após a inoculação. Foram utilizados no mínimo 3 repetições com 12 explantes cada, por tratamento.



**Figura 23:** Crescimento *ex vitro* em altura (média) de plântulas de mandioca de mesa (*M. esculenta* - acesso 52) durante 45 dias de cultivo em diferentes substratos de aclimação. Avaliações aos 0 (transplante), 15, 20, 30 e 45 dias após o transplante. Os valores médios foram obtidos a partir de 15 plântulas transplantadas por tratamento.



**Figura 24:** Crescimento *ex vitro* em número de folhas (média) de plântulas de mandioca de mesa (*M. esculenta* – acesso 52) durante 45 dias de cultivo em diferentes substratos de aclimação. Avaliações aos 0 (transplante), 15, 20, 30 e 45 dias após o transplante. Os valores médios foram obtidos a partir de 15 plântulas transplantadas por tratamento.