

RUI AMÉRICO MENDES

ESTUDOS DE PROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE *Manihot glaziovii* Muell.  
Arg. (*Euphorbiaceae*) PARENTE SILVESTRE DA MANDIOCA

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Pós-graduação em Agronomia, área de concentração em Fitotecnia, para obtenção do título de Doutor.

Orientador

Prof. MOACIR PASQUAL

LAVRAS  
MINAS GERAIS  
1995



RUI AMÉRICO MENDES

ESTUDOS DE PROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE *Manihot glaziovii* Muell.  
Arg. (Euphorbiaceae) PARENTE SILVESTRE DA MANDIOCA

Tese apresentada à Universidade Federal de  
Lavras, como parte das exigências do Curso de  
Pós-graduação em Agronomia, área de  
concentração em Fitotecnia, para obtenção do  
título de Doutor.

Orientador

Prof. MOACIR PASQUAL

LAVRAS  
MINAS GERAIS  
1995

Ficha Catalográfica preparada pela Seção de Classificação e Catalogação da  
Biblioteca Central da UFLA

Mendes, Rui Américo

Estudos de propagação *in vitro* de *Manihot glaziovii* Muell. Arg. (Euphorbiaceae) parente silvestre da mandioca / Rui Américo Mendes.--Lavras : UFLA, 1995.

113 p. : il.

Orientador: Moacir Pasqual.

Curso (Doutorado) - UFLA.

Bibliografia.

1. *Manihot glaziovii* - Propagação. 2. Maniçoba. 3. Melhoramento. 4. Micro-enxertia. 5. Embriogénia somática. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-633.4

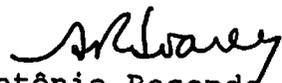
RUI AMÉRICO MENDES

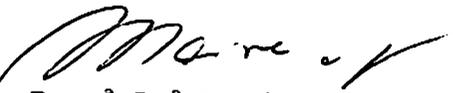
ESTUDOS DE PROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE *Manihot glaziovii* Muell.  
Arg. (Euphorbiaceae) PARENTE SILVESTRE DA MANDIOCA

Tese apresentada à Universidade Federal de  
Lavras, como parte das exigências do Curso de  
Pós-graduação em Agronomia, área de  
concentração em Fitotecnia, para obtenção do  
título de Doutor.

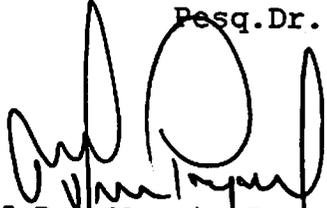
APROVADA EM 17/11/1995

  
Prof. Dr. Antônio Carlos Fraga

  
Prof. Dr. Antônio Resende Soares

  
Pesq.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Marisa de Goes

  
Pesq. Dr. João Batista Teixeira

  
Prof. Dr. Moacir Pasqual  
(Orientador)

DEDICO

*In memoriam de:*

Inayá Ferreira Mendes  
Jaime Mendes Castanheira  
Jaime Humberto Mendes

As minhas "mulheres":

Carmem Lucia Soares Mendes  
Carolina Soares Mendes  
Juliana Soares Mendes  
Daniela Soares Mendes

A todos os mandioqueiros

## AGRADECIMENTOS

O autor agradece a Deus a oportunidade de ter feito o curso de Doutorado, na certeza de que tudo Dele procede. Agradecendo a Ele, está agradecendo a sua família, aos seus professores, às instituições que tornaram este treinamento possível (UFLA e EMBRAPA) e a todas pessoas que direta ou indiretamente colaboraram para o êxito deste seu trabalho.

## SUMÁRIO

	página
LISTA DE TABELAS .....	vi
LISTA DE FIGURAS .....	vii
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS .....	viii
RESUMO .....	x
SUMMARY .....	xii
CAPÍTULO 1 .....	1
1 INTRODUÇÃO GERAL .....	1
1.1 Introdução .....	2
1.2 Erosão genética/vulnerabilidade genética .....	6
1.3 Enriquecimento da variabilidade por espécies silvestres .....	11
1.4 Importância da mandioca .....	16
1.5 O uso de recursos genéticos do gênero <i>Manihot</i> ...	24
CAPÍTULO 2 .....	36
2 CULTIVO DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS DE <i>Manihot glaziovii</i> .....	36
2.1 Introdução .....	37
2.2 Referencial teórico .....	38
2.3 Hipótese .....	44
2.4 Material e métodos .....	44
2.5 Resultados e discussão .....	47
2.6 Conclusões .....	52
CAPÍTULO 3 .....	54
3 MICRO-ENXERTIA EM <i>Manihot glaziovii</i> .....	54
3.1 Introdução .....	55
3.2 Referencial teórico .....	58
3.3 Hipótese .....	63
3.4 Material e métodos .....	63
3.4.1 Produção das gemas para enxerto .....	64
3.4.2 Produção das plântulas para porta-enxerto .....	66
3.4.3 Preparo dos porta-enxertos .....	66
3.4.4 Preparo dos enxertos .....	67
3.4.5 Execução da micro-enxertia .....	67

3.5 Resultados e discussão .....	68
3.6 Conclusões .....	72
CAPÍTULO 4 .....	75
4 EMBRIOGENIA SOMÁTICA EM <i>Manihot glaziovii</i> .....	75
4.1 Introdução .....	76
4.2 Referencial teórico .....	78
4.3 Hipótese .....	84
4.4 Material e métodos .....	85
4.5 Resultados e discussão .....	87
4.6 Conclusões .....	93
RECOMENDAÇÕES .....	95
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	100
ANEXOS .....	111
ANEXO A .....	112
ANEXO B .....	113

## LISTA DE TABELAS

	página
TABELA 1. Características de algumas espécies do gênero <i>Manihot</i> que poderiam ser utilizadas em programas de melhoramento genético da mandioca. CENARGEN/EMBRAPA, Brasília - DF. 1995. ....	34
TABELA 2. Meio nutritivo WPM (McCown e Lloyd, 1981 e Wood, 1982) modificado usado nos experimentos de cultivo de embriões zigóticos e de micro-enxertia, com pH corrigido para 5,7. CENARGEN/EMBRAPA, Brasília - DF. 1995. ....	45

## LISTA DE FIGURAS

	página
<p>FIGURA 1. Ocorrência de <i>Manihot esculenta</i> subsp. <i>flabellifolia</i> (mapa superior) e <i>M.esculenta</i> subsp. <i>peruviana</i> (mapa inferior) na Região Centro Oeste do Brasil, modificado de Allem (1994). CENARGEN/ EMBRAPA, Brasília - DF. 1995. ...</p>	20
<p>FIGURA 2. Porcentagem de germinação de embriões de <i>Manihot glaziovii</i> em três temperaturas. CENARGEN/EMBRAPA, Brasília - DF. 1995. ....</p>	49
<p>FIGURA 3. Porcentagem de germinação de embriões de <i>Manihot glaziovii</i> em três temperaturas aos 20 dias. CENARGEN/EMBRAPA, Brasília - DF. 1995. ....</p>	51
<p>FIGURA 4. Resultado de micro-enxertia dos genótipos 4 e 5 sobre mandioca cv. Cavalo aos 130 dias. CENARGEN/EMBRAPA, Brasília - DF. 1995. ....</p>	71
<p>FIGURA 5. Calos produzidos nos tratamentos de indução aos 20 e 120 dias da inoculação de parte do hipocótilo de <i>M. glaziovii</i>. UFLA, Lavras - MG. 1994. ....</p>	89
<p>FIGURA 6. Peso fresco de calo induzido de parte do hipocótilo de <i>M.glaziovii</i> em gramas aos 120 dias. UFLA, Lavras - MG. 1994. ....</p>	91
<p>FIGURA 7. Peso seco de calo induzido de parte do hipocótilo de <i>M.glaziovii</i> em gramas aos 120 dias. UFLA, Lavras - MG. 1994. ....</p>	92

## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

2,4-D	Ácido 2,4 Dicloro-fenoxiacético
AG	Ácido giberélico
AIA	Ácido indol acético
ANA	Ácido naftaleno acético
B5	Meio de Gamborg et al. (1968)
BAP	Benzil amino purina
CBB	Cassava bacterial blight - bacteriose
CENARGEN	Centro Nacional de Pesquisas em Recursos Genéticos e Biotecnologia
CIAT	Centro Internacional de Agricultura Tropical
CMD	Cassava mosaic disease - mosaico africano
CPATSA	Centro de Pesquisas Agropecuárias do Trópico Semi-Áridos
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
e/p	Número de explantes por plântula
F <sub>1</sub>	Descendentes originados do primeiro cruzamento experimental
IAC	Instituto Agronômico de Campinas
IITA	International Institute of Tropical Agriculture
KIN	Cinetina
Lux	Medida de intensidade luminosa

MS	Meio de Murashige e Skoog (1962)
Picloram	Ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico
p/v	Peso por volume
UnB	Universidade de Brasília
WPM	Meio para plantas lenhosas (McCown e Lloyd, 1981)
$\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$	Micro mol por metro quadrado por segundo de fluxo de fotons fotossintéticos

## RESUMO

MENDES, RUI AMÉRICO. Estudos de propagação *in vitro* de *Manihot glaziovii* Muell. Arg. (Euphorbiaceae) parente silvestre da mandioca. Lavras: UFLA, 1995. 113p. (Tese - Doutor em Fitotecnia).

A população mundial tem aumentado à medida que chegamos ao terceiro milênio. Países em desenvolvimento têm sofrido com a deficiência na oferta de alimentos em quantidade e qualidade adequadas e parte de suas populações estão morrendo de fome. As modernas técnicas agrícolas com o conseqüente aumento da produtividade e oferta de novos produtos, surgem como solução para fazer frente a essa grave situação. O resgate, a conservação e a utilização de espécies cultivadas e seus parentes silvestres são importantes para todas as culturas, especialmente para a mandioca (*M. esculenta* Crantz), que constitui o alimento de subsistência para cerca de 10% da população mundial nos trópicos. Várias ações foram desenvolvidas usando *Manihot glaziovii* como modelo, para estabelecer protocolos que permitissem sua propagação, com vistas à conservação e utilização em programas de melhoramento genético para a produção de linhagens pré melhoradas, com características de interesse agrônômico, tais

---

Orientador: Moacir Pasqual. Membros da Banca: Antônio Carlos Fraga, Antônio Resende Soares, João Batista Teixeira e Marisa de Goes.

como resistência a pragas e doenças, melhoria da qualidade do amido e modificações na arquitetura da planta. Embriões zigóticos foram cultivados *in vitro*, sob as temperaturas de 20, 25 e 30°C, usando meio de cultura WPM com e sem carvão ativado. A temperatura de 30°C revelou ser mais eficiente na germinação dos embriões, porém 25°C também apresentou bons resultados. A utilização da técnica da micro-enxertia *in vitro*, desenvolvida originalmente para a limpeza clonal de espécies frutíferas lenhosas atacadas por viroses, é uma técnica promissora para a conservação e propagação de espécies silvestres parentes da mandioca, com problemas de conservação *ex situ*. Gemas micro-propagadas em fendas laterais em mini-estacas de mandioca *in vitro* ainda estavam vivas aos 130 dias da cultura. O cultivo de partes dos hipocótilos originados de embriões que não germinaram, em meio de cultura MS suplementado com 2,4-D em três concentrações de KIN e BAP em uma concentração padrão, produziu uma grande quantidade de calo, sem a formação de embriões somáticos aos 120 dias. A elevada concentração de 2,4-D foi prejudicial aos cultivos quando em combinação com KIN ou BAP e deletério quando usado sem adição de uma citocinina.

## SUMMARY

*IN VITRO PROPAGATION STUDIES OF Manihot glaziovii* Muell.Arg.  
(Euphorbiaceae), A WILD RELATIVE OF CASSAVA.

The world population has been increased as we arrive to the third millenium. Developing countries suffer from a shortage of food and the populations of some of them go through starvation from time to time. Modern agricultural techniques and practices lead to the release of new cultivars and an increase in yields, what attenuates the problem. Genetic resources conservation and use are valuable resources in the improvement of crop species. Cassava is no exception to this since it is a subsistence crop for 10% of the world population, particularly in the tropics. Actions have been developed using *M.glaziovii* as a model to set up protocols for *in vitro* plant propagation focusing its conservation, exchange and use on cassava breeding programs in order to search for the development of pre-breeding lines with desirable agronomic traits such as disease and pests resistance, plant quality and architecture improvement. The zygotic embryos were cultured *in vitro* at 20, 25 and 30°C using WPM medium with or without charcoal. The results showed the temperature of 30°C to be the best for embryo germination. The temperature of 25°C also turned out efficient and produced good results. The *in vitro* micrografting technique which was originally developed for fruit

tree virus clonal clean is a promising technique for cassava wild relatives conservation and propagation when conditions proved impossible to keep them *ex situ*. *M.glaziovii* buds micrografted into cassava lateral cut internode and cultured *in vitro* were still alive after 130 days. The culture of hypocotyl parts originated from non germinated embryos, on MS media supplied with 2,4-D on three concentrations and KIN and BAP on just one concentration, produced a great amount of calluses; however, it did not lead to the formation of somatic embryos even after 120 days. Besides, high concentrations of 2,4-D proved detrimental to the culture.

## CAPITULO 1

### 1 INTRODUÇÃO GERAL

## 1.1 INTRODUÇÃO

A população mundial hoje está acima dos 5 bilhões de pessoas e por estimativas poderá chegar a 8 ou 15 bilhões no próximo século. É previsto que o maior aumento populacional ocorra nos países em desenvolvimento nesse final de milênio. O grande desafio que os agrônomos, políticos e economistas estão enfrentando é alimentar uma população mundial cada vez mais crescente. Daqui a 40 anos, os produtores rurais terão que produzir três vezes mais alimento somente para acompanhar o crescimento e as necessidades nutricionais da população mundial. A contribuição que os melhoristas de plantas poderão dar é no sentido de desenvolver culturas com capacidade de elevada produtividade em uma gama muito grande de ambientes e com redução drástica na necessidade de utilização de insumos como fertilizantes e pesticidas. Para que esses objetivos sejam atingidos, é indiscutível o valor da utilização da diversidade genética. Dificilmente os melhoristas de plantas conseguirão algum resultado sem trabalhar e explorar todos recursos genéticos disponíveis (Ford-Lloyd e Jackson, 1986; Hails et al., 1990 e Kartha e Roca, 1993).

Uma característica fundamental da presença dos seres vivos no planeta, desde o seu surgimento, tem sido o grande aumento no número de espécies em um processo de constante

diversificação, devido principalmente à grande promiscuidade que caracteriza a Mãe Natureza. Essa diversidade genética, submetida à seleção e adaptação, em função das mudanças nas condições ambientais, constitui hoje os recursos genéticos ou germoplasma do planeta. Toda essa diversidade genética acumulada permite um eficaz aproveitamento dos recursos genéticos da Terra e a grande capacidade de adaptação e ajustes às diferentes situações conferem harmonia e estabilidade ao sistema como um todo.

Segundo dados arqueológicos, a agricultura começou independentemente em vários locais da Terra, sendo que na América Central e Oriente Próximo o processo é melhor conhecido. Nos últimos dez a quinze mil anos, a domesticação das plantas e seu "melhoramento genético" sofreram um avanço muito grande, o que coincide com a evolução da própria agricultura. No entanto, foram os agricultores primitivos que domesticaram a maioria das plantas que hoje são cultivadas essencialmente para produção de alimentos. Foi principalmente a maneira de propagação sexual das plantas, em uma seqüência de ...plantio-colheita-plantio-colheita... associada a uma pressão de seleção imposta pelos agricultores e melhoristas, que possibilitou a evolução das plantas de baixa produtividade para as atuais cultivares de elevada produtividade (Hoyt, 1988).

Por muitos séculos de agricultura, a interação entre espécies silvestres, ervas daninhas e plantas domesticadas foi responsável pelo surgimento da maioria dos conjuntos de plantas atualmente cultivadas. As primeiras plantas domesticadas foram os cereais e as leguminosas, seguidas de algumas outras utilizadas pelos frutos e raízes. As plantas domesticadas foram então espalhadas às várias regiões do mundo acompanhando principalmente as rotas comerciais e se adaptando às novas condições ambientais dos novos locais.

Muitas comunidades agrícolas foram isoladas por barreiras geográficas, o que permitiu que variantes genéticas evoluíssem independentemente. Algumas variantes genéticas cresceram como plantas indesejáveis nos cultivos ou ao seu redor, originando populações com maior variabilidade genética, capazes de suportar estresses bióticos e abióticos.

Depois da seleção natural inicial e com a interferência do homem por milhares de anos, surgiram então os genótipos locais adaptados a determinados ecossistemas e práticas culturais. O melhoramento científico de plantas, baseado em cruzamentos dirigidos e não na simples seleção de genótipos que aconteciam nos plantios, começou na Europa nos séculos XVIII e XIX. O desenvolvimento e utilização de técnicas de melhoramento genético de plantas possibilitaram a elevação da produtividade, superando

muitos problemas ligados à qualidade, doenças, pragas e facilidade de colheita. Hoje em dia, para preencher as lacunas que aparecem em cultivares melhoradas devido ao estreitamento da base genética, há necessidade de lançar mão dos recursos genéticos ainda não completamente explorados como as espécies silvestres e desenvolver metodologias criativas para transferir as características mais importantes para as plantas cultivadas (Esquinas-Alcazar, 1981; Ford-Lloyd e Jackson, 1986; Hoyt, 1988 e Stalker, 1980).

A hibridização interespecífica teve começo no início do século XVIII. O primeiro registro aparece em 1717, quando Thomas Fairchild descreveu o sucesso de um cruzamento entre cravo e cravina. O principal interesse sobre esse fato foi a comprovação que as plantas eram também organismos sexuados. O resultado de Fairchild despertou interesse entre os horticultores e pouca atenção entre os cientistas da época. Atualmente a hibridização interespecífica tem sido utilizada principalmente com o objetivo de transferência de genes específicos de uma espécie para outra por meio do cruzamento, retrocruzamento e seleção. Dessa maneira, características da espécie silvestre aparentada a uma espécie cultivada puderam ser transferidas a ela, conferindo-lhe resistência a determinados estresses, melhoria nas suas qualidades nutricionais e uma arquitetura que se adaptasse melhor ao sistema de cultivo utilizado (Allard, 1960).

## 1.2 EROSÃO GENÉTICA/VULNERABILIDADE GENÉTICA

Atualmente, muito se discute sobre erosão genética devido a modificação e destruição do meio ambiente. Porém, quando analisamos em termos de recursos genéticos, não são só a construção e expansão de cidades nem tão pouco a destruição das matas e construção de barragens com a inundação de grandes áreas, que causam a erosão genética, com perdas irreparáveis de alelos. O próprio sistema agrícola de produção, que vem sendo usado e desenvolvido desde que o primeiro "agricultor" observou que as sementes que caíam ao solo, próximo ao local onde tinham o seu "ninho", germinavam e davam origem a plantas semelhantes àquelas das quais haviam sido catadas, tem contribuído sensivelmente para uma diminuição da variabilidade genética das plantas cultivadas.

A erosão genética teve um impacto maior na Europa e nos EUA a partir dos anos 30, quando programas de melhoramento de plantas começaram a produzir novas cultivares, que substituíram as cultivares tradicionais sem o devido cuidado na conservação dessas. A partir de 1950, um amplo programa internacional de desenvolvimento agrícola causou uma diminuição nas áreas cultivadas com variedades tradicionais, que estavam há muito tempo nas mãos dos agricultores e camponeses. Com isto, a necessidade de conservar a variabilidade genética em perigo de

perda total, começou a ser reconhecida nos meios científicos e acadêmicos. O panorama piorou nos anos 60, quando com a "revolução verde", muitas cultivares tradicionais deixaram de ser plantadas sendo substituídas por variedades uniformes de elevada produtividade, porém possuindo uma base genética muito estreita (Esquinas-Alcazar, 1981; Ford-Lloyd e Jackson, 1986 e Mooney, 1987).

É espantoso constatar que atualmente, 95% da nutrição humana tem como fonte não mais que 30 espécies de plantas e 8 delas contribuem com 3/4 da participação vegetal para energia humana. Informações arqueológicas mostram que os povos na pré-história obtinham seu sustento de mais de 1500 espécies de plantas silvestres e que pelo menos 500 espécies vegetais foram utilizadas na agricultura primitiva (Mooney, 1987).

A erosão genética ou perda da variabilidade de plantas cultivadas tem reduzido perigosamente a base genética sobre a qual atua a seleção natural, aumentando de forma alarmante a vulnerabilidade de nossos cultivos, frente ao aparecimento de novas pragas e/ou doenças e às mudanças ambientais inesperadas. Alguns exemplos podem ser citados para confirmar o perigo da estreita base genética ou baixa variabilidade das diversas culturas:

a - Nas décadas de 1840 e 1850, o violento ataque de *Phytophthora infestans* em batata, principal base alimentar da Irlanda, causou a morte de mais de dois milhões de irlandeses por inanição, obrigando outros tantos a imigrar para os EUA. A razão principal dessa catástrofe foi a estreita base genética das cultivares de batata plantadas naquele país, oriundas de material uniforme levado da América Latina no século XVI. O problema foi contornado com a incorporação às variedades plantadas de alelos para resistência conseguidos de variedades primitivas e populações silvestres coletadas na Região Andina (Esquinas-Alcazar, 1981 e Rhoades, 1994).

b - Com a introdução, em 1863, da praga filoxera *Daktulosphaira vitifoliae* em variedades de uva *Vitis vinifera*, na França, a produção de vinho caiu a ponto desse país tradicional produtor ter que importar vinho de seus vizinhos. Essa praga foi introduzida da América do Norte e todas variedades viníferas francesas eram suscetíveis a ela. A produção de mudas usando-se como porta-enxerto a espécie silvestre *Vitis lambrusca*, oriunda do continente Americano e resistente à praga, permitiu a recuperação da indústria vinícola daquele país (Rhoades, 1994 e Smith, 1992).

c - No Brasil, após a introdução em 1937, do vírus da tristeza em citros, cerca de dez milhões de pés de laranja foram arrancados no estado de São Paulo e transformados em lenha. Isto porque os laranjais eram formados quase na sua totalidade com mudas enxertadas sobre Laranja Azeda, muito suscetível àquela doença. A solução foi mudar para porta-enxertos de Limão Cravo, que se mostrou resistente à doença (Moreira e Moreira, 1991).

d - Em 1970, uma doença provocada pelo fungo *Helminthosporium maydis* em milho chegou a causar queda de 50% na produção, nos estados do sul dos EUA. A suscetibilidade a essa doença estava diretamente associada ao citoplasma macho estéril "Texas", que naquela época havia sido introduzido em quase todos os híbridos de milho produzidos (Esquinas-Alcazar, 1981).

e - Em Cuba, nos anos 1979/80, a cana-de-açúcar foi atacada pela ferrugem provocada pelo fungo *Puccinia melanocephala*, causando perda de mais de um milhão de toneladas de açúcar. Isso foi devido à elevada suscetibilidade da cultivar Barbados 4362, que ocupava 40% dos plantios da ilha. O problema foi contornado pela substituição por variedades resistentes à ferrugem (Esquinas-Alcazar, 1981).

Quando algum novo problema, principalmente doença e praga, ocorre em uma cultura, é nas variedades primitivas e em espécies com elas relacionadas que os melhoristas vão buscar fontes de resistência (Burdon e Jaroz, 1989 e Frey, 1976). Segundo Esquinas-Alcazar (1987) e Hoyt (1988), um exemplo clássico da utilização de numerosas espécies silvestres no melhoramento genético ocorreu com o tomate (*Lycopersicon esculentum*). Para a incorporação de vários alelos desejáveis às cultivares de tomate, foram utilizadas com êxito espécies doadoras de alelos para adaptação à elevada salinidade (*L.cheesmanii*), fonte de vitamina C (*L.pennellii* e *L.peruvianum*), melhoria de qualidade (*L.chmielewskii*), resistência a fungos (*L.hirsutum*, *L.peruvianum* e *L.pimpinellifolium*), resistência a insetos (*L.hirsutum*), resistência a nematóides (*L.peruvianum*), resistência a vírus (*L.chilense* e *L.peruvianum*) e tolerância a elevadas temperatura e umidade (*L.esculentum* subsp. *cerasiforme*).

Espécies silvestres e cultivares primitivas continuam sendo importantes no desenvolvimento de novas cultivares de batata (*Solanum tuberosum*) resistentes a estresses bióticos e abióticos. São usados os termos "introgressão de germoplasma" ou "pré melhoramento" para descrever o processo de transferência de alelos, que controlam características desejáveis de espécies silvestres, para cultivares avançadas agronomicamente e melhor

adaptadas, passíveis de serem usadas em programa de melhoramento e sistemas de produção sustentável. Na Europa, 8 em 10 cultivares de batata têm em seus ancestrais espécies primitivas. Nos EUA, 1 em 3 cultivares liberadas pelos melhoristas tem germoplasma silvestre na sua constituição. O uso de germoplasma silvestre tem desempenhado um papel crucial no desenvolvimento de cultivares altamente produtivas, em países industrializados. Porém, o sucesso no uso de espécies silvestres de batata em programa de melhoramento genético depende de vários fatores como compatibilidade de cruzamento, pareamento meiótico e processo de introgressão, além de técnicas avançadas como resgate do embrião e manipulação cromossômica (Iwanaga e Schmiediche, 1989).

### 1.3 ENRIQUECIMENTO DA VARIABILIDADE POR ESPÉCIES SILVESTRES

De maneira geral observa-se que em programas de melhoramento sempre houve uma grande tendência dos melhoristas em utilizar germoplasma proveniente de uma base genética muito estreita. Algumas culturas, como café na América do Sul e seringueira e dendê na Malásia, foram originadas desse modo. Com o avanço dos conhecimentos da genética é cada vez mais evidente que, apesar desse processo de seleção e endocruzamento, existe um limite na capacidade do germoplasma de continuar fornecendo resultados desejáveis, dificultando a produção de cultivares com características excepcionais. O que determina esse limite é a

baixa variabilidade genética. Por essa razão, grande ênfase tem sido dada para a coleta de germoplasma com o objetivo de ampliar a base genética das espécies domesticadas. Atualmente, a idéia generalizada é de que o ideal seria o melhorista de determinada cultura dispor de toda variabilidade genética existente na espécie trabalhada.

Tradicionalmente, os melhoristas têm dado grande ênfase na identificação de germoplasma coletado que possua características fenotípicas desejáveis. Assim, a amostra coletada pode ser imediatamente selecionada e colocada à disposição do produtor, não passando por um processo rigoroso de avaliação. Isto acontece comumente com gramíneas que são destinadas a forragem animal.

Com a realização de muitas coletas de germoplasma das principais culturas em várias partes do mundo, grandes coleções foram formadas. Em consequência, coletas adicionais dessas culturas estão cada vez menos produtivas, porque os novos acessos coletados estão carregando os mesmos alelos e características que já são encontradas nas coleções existentes. Assim, os parentes silvestres das plantas cultivadas se apresentam como fonte de novos alelos e novo recurso genético da cultura. A grosso modo, os parentes silvestres das culturas possuem uma variabilidade genética maior quando comparadas com as plantas

cultivadas, mesmo estando representados por pequenas amostras, o que ocorre normalmente. Para várias culturas, atualmente, tem sido dada atenção especial a seus parentes silvestres, visando aumentar a base genética e coloca-la disponível aos melhoristas de plantas. A transferência de alelos de espécies silvestres para plantas cultivadas é, em alguns casos, muito problemática, por exigir técnicas sofisticadas. Porém, com o desenvolvimento da biotecnologia, a troca de alelos de parentes silvestres mais distantes das plantas cultivadas poderá ser possível. Também, muito provavelmente, será possível a incorporação de genes de outras fontes que não as espécies relacionadas, dando origem a plantas "transgênicas" (Chapman, 1989).

Para resgatar o germoplasma, as coletas de espécies silvestres devem ser direcionadas para populações com elevada variabilidade genética, que normalmente são encontradas nos centros de distribuição das espécies. Quanto a coleta, podem ser distinguidas algumas categorias dentre as espécies vegetais coletadas, que apresentam interesse para o melhorista na atualidade ou no futuro:

a - Populações silvestres - constituídas por um conjunto de plantas de mesma espécie encontradas em estado natural, são geneticamente variável de acordo com a sua distribuição geográfica. A variabilidade genética é essencial ao processo

de adaptação das espécies a diferentes ecossistemas. As espécies silvestres podem ser classificadas em:

- De uso direto, espécies silvestres que o homem utiliza de forma extrativista, sem o trabalho de plantio e cultivo. A erosão genética, nesse caso, normalmente se processa no germoplasma mais valioso e desejado.
  - De uso indireto, espécies silvestres ou semi-domesticadas, cujos caracteres desejáveis podem ser transferidos à espécie cultivada via cruzamento sexual.
  - De uso potencial, espécies silvestres que não são usadas hoje, mas que pelas suas características ou composição há possibilidades de seu uso no futuro.
- b - Raças locais - constituem populações de plantas cultivadas em equilíbrio com o meio ambiente e que se mantêm relativamente estáveis por longos períodos. Barreiras físicas, culturais e políticas isolaram essas populações, evitando assim a introgressão. Porém a estrutura genética dessas populações contém o potencial para mudanças adaptativas, especialmente quando há oportunidade para troca de alelos. Enquanto o melhoramento genético convencional

acarreta um estreitamento de base genética, causado pela perda de alelos, raças locais não sofrem esse estreitamento.

c - Cultivares melhoradas obsoletas - são cultivares que foram obtidas há muito tempo através dos diversos métodos de melhoramento por instituição de pesquisa e que atualmente só são encontradas nas mãos de poucos agricultores tradicionais. É um germoplasma de grande valor pelo tempo em que vem sendo cultivado e por não ter, na grande maioria das vezes, duplicata junto aos melhoristas e instituições de pesquisa.

d - Linhagens e híbridos - são subprodutos do melhoramento genético, geralmente encontrados nas mãos dos melhoristas e que, de maneira geral, são eliminados durante os trabalhos de seleção. É um germoplasma que pode ser útil e passível de utilização no futuro e por isso deve ser coletado e conservado.

e - Linhagens introgressivas - são plantas ou populações obtidas pelo cruzamento natural entre cultivares e plantas invasoras, com chances de possuir resistência a pragas e doenças. Esse germoplasma deve ser incorporado a programa de melhoramento para a transferência de suas características

desejáveis às novas cultivares (Esquinas-Alcazar, 1981; Hoyt, 1988; Lleras, 1982 e Vilela-Morales e Mendes, 1983).

O aproveitamento de plantas silvestres é tão antigo quanto a espécie humana, que usou das vantagens da variação genética na domesticação das plantas (Prescott-Allen e Prescott-Allen, 1983). Durante o processo de desenvolvimento que deu origem à agricultura, o ser humano introduziu um número grande de plantas silvestres em cultivo, obtendo muitos benefícios com isso. Porém, somente uma pequena porção de um total estimado de trezentas mil espécies de plantas tem sido utilizada pelo homem, com um número muito grande de espécies desconhecidas, principalmente no Neotrópico (Zhong-Ping, 1992).

#### 1.4 IMPORTÂNCIA DA MANDIOCA

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é uma planta que pertence à família *Euphorbiaceae*, que congrega também outras espécies tropicais de valor econômico como a seringueira (*Hevea brasiliensis*), a mamona (*Ricinus communis*), além de aproximadamente cem outras espécies também pertencentes ao gênero *Manihot*. Dados arqueológicos mostram que a mandioca foi cultivada na Amazônia Peruana a cerca de 4000 anos e, no México a cerca de 2000 anos atrás (Purseglove, 1968 e Rogers e Appan, 1973).

A mandioca é um arbusto cultivado principalmente pela capacidade que tem de acumular amido nas raízes. É uma planta eminentemente tropical. Pode ser cultivada entre os paralelos 30°N e 30°S em várias regiões do mundo, em altitudes que podem chegar a 2000 metros acima do nível do mar, em regiões equatoriais formando o "cinturão da mandioca", que inclui países desenvolvidos e em desenvolvimento (Jones, 1959).

A planta não suporta o frio intenso e geada, mas pode ser cultivada em regiões com a precipitação pluviométrica entre 500 e 5000mm por ano. Com exceção da época de plantio, a mandioca pode sobreviver a prolongado período de seca, quando perde suas folhas, que se recuperam rapidamente com a chegada das chuvas. É uma cultura muito importante em áreas onde a pluviosidade é pequena e variável.

É uma planta que se desenvolve melhor em solos de textura entre arenosa e argilo arenosa com razoável fertilidade. Pode ser cultivada economicamente em solos próximos da exaustão, imprestáveis para produção de outras culturas. Normalmente é a última cultura a ser plantada no sistema de cultivo itinerante (Purseglove, 1968).

Em adição, a sua tolerância à seca e sua habilidade de se desenvolver em solos pobres e ácidos, sua relativa resistência

a ervas daninhas, doenças e pragas fazem da mandioca uma cultura de grande valor (Cock, 1985 e Nestel, 1973). Jones (1959), referindo-se à mandioca, afirmou que "a planta se desenvolve em solos tão pobres e sob ataque de seca e pragas tão severas que todas outras culturas perecem". Estimativas da FAO (1989) indicam que a mandioca constitui-se em uma das mais importantes fontes de calorias para cerca de 500 milhões de pessoas nos trópicos. Da produção mundial, 65% é usado para o consumo humano, 19%, para alimentação animal, 6%, na indústria de transformação para fécula e o restante, 10% é perdido (Cock, 1985).

Rogers (1963) enfatiza que *Manihot esculenta* teve pelo menos dois centros geográficos de especiação: uma região compreendendo as áreas secas do oeste e sul do México e porção da Guatemala e outra compreendendo áreas semi-áridas do nordeste do Brasil. Cultivares de mandioca podem ser encontradas nessas áreas e se estendem dentro de todas as porções de terras baixas tropicais da América Central e do Sul. Existem algumas evidências que cultivares de mandioca têm hibridizado com espécies nativas, que ocorrem em cada um desses centros geográficos formando vários complexos gênicos. Partindo de evidências etnológicas, fica claro que cultivares de mandioca com baixo teor de glicosídeo cianogênico estão distribuídas mais profusamente que cultivares com altas concentrações. Do ponto de vista cultural, parece que as civilizações antigas usavam cultivares com baixo teor de ácido

cianídrico e que mais tarde o cultivo incluiu aquelas com elevada concentração. A ocorrência de mandioca mansa e mandioca brava em áreas distintas sugere que não houve apenas um centro no qual a *Manihot esculenta* possa ter se desenvolvido. Há outros centros, incluindo uma região correspondendo a áreas do México e da América Central, não mencionadas anteriormente por estudiosos interessados na origem de plantas cultivadas. Dados mais recentes contrariam essa posição e Allem (1987) sugere que o mais lógico para a constatação da origem da mandioca é procurar os parentes silvestres mais próximos e propõe que a mandioca evoluiu dessas espécies. Como parentes silvestres que deram origem à espécie cultivada, esse autor define e relaciona duas sub-espécies: *M.esculenta* subsp. *flabellifolia* de distribuição mais ampla na América do Sul e *M.esculenta* subsp. *peruviana* de distribuição mais restrita, limitada à Região Centro Oeste do Brasil (Figura 1).

A distribuição dessas sub-espécies por ser muito ampla, não permite estabelecer com precisão o local de domesticação da mandioca (Allem, 1994). No entanto, quando são sobrepostas as áreas de ocorrência das diversas seções do gênero, segundo Rogers e Appan (1973), é definida uma área onde a ocorrência da maioria das seções se sobrepõem estabelecendo o "quadrilátero do gênero *Manihot*", localizado no Brasil Central. Com base nessas evidências, tudo leva a crer que a mandioca teve sua origem e



FIGURA 1. Ocorrência de *Manihot esculenta* subsp. *flabellifolia* (mapa superior) e *M. esculenta* subsp. *peruviana* (mapa inferior) na Região Centro Oeste do Brasil, modificado de Allem (1994). CENARGEN/EMBRAPA, Brasília - DF. 1995.

evolução mais provavelmente no Centro Oeste do Brasil, concordando com a tese levantada por Allem (1987).

Todas as cultivares de mandioca contêm, em menor ou maior quantidade, ácido cianídrico em seus tecidos. São classificadas como mandioca doce, mandioca mansa, aipim ou macaxeira de baixo teor de ácido cianídrico nas raízes e mandioca ou mandioca brava de elevado teor de ácido cianídrico nas raízes. Essa característica na mandioca brava pode algumas vezes limitar sua utilização, principalmente para alimento animal.

A variação da concentração de glicosídeos cianogênicos nas raízes de mandioca varia grandemente e depende da variedade, condições ecológicas e de cultivo. A amplitude normal está entre 15 e 400mg de ácido cianídrico por quilograma de raízes frescas (ocasionalmente o teor pode ser tão baixo como 10 ou tão alto como 2000mg/kg), mas a maioria das cultivares está entre 30 e 150mg/kg.

As raízes de mandioca também contêm a enzima linamarase que quando entra em contato com o glicosídeo cianogênico, pela deterioração dos tecidos ou injúria mecânica quando da colheita, libera o cianeto livre. Pela inativação da linamarase, há evidências que a toxicidade da mandioca está associada mais à

ingestão de cianeto livre do que ao glicosídeo não hidrolizado. Outras partes vegetais da planta podem conter enzima capaz de promover a liberação do cianeto a partir do glicosídeo cianogênico, particularmente se são consumidas frescas (Cousey e Halliday, 1974).

As raízes da mandioca podem ser usadas diretamente para alimentar animais depois da eliminação do ácido cianídrico por diferentes processos ou, por transformação dos resíduos das fábricas, que usam a mandioca para a produção de amido e de alimento humano (Barrios e Bressani, 1967).

A forma como a mandioca é consumida como alimento humano varia com os países e as regiões dentro de um mesmo país. Na África, a mandioca é consumida como uma hortaliça, assada ou cozida ou também na forma de massa ou papa feita com farinha de mandioca. Outras preferências regionais incluem o consumo de folhas e massa obtida de raízes fermentadas. Na América do Sul, a mandioca é consumida como hortaliça ou como sopa, depois de ser deixada de molho por uma noite, ou cozida. No Brasil ela é consumida em pratos salgados e sobremesas e processada em farinha de mandioca, que serve de complemento para o prato principal é a forma mais popular. Nas Regiões Norte e Nordeste do Brasil existem pratos típicos em que são usadas as folhas da mandioca como componente principal. No Zaire, o consumo das folhas de

mandioca é tão difundido que elas são comercializadas em feiras livres. Na Colômbia e no Brasil, a fécula de mandioca é misturada ao queijo para produzir o pão de queijo. Ela pode também ser cozida em calda de açúcar e servida como sobremesa ou fermentada para produzir bebida (Cock, 1985 e Jones, 1974).

O Brasil é o maior produtor mundial de mandioca. Produziu 22.652.000 toneladas em 1992, que representou 14,9% da produção mundial, em uma área de 1.884.000 hectares e uma produtividade de 12.021 kg/ha (FAO, 1993). A maior parte da produção sempre foi destinada ao consumo doméstico.

A Tailândia é o principal exportador mundial de produtos de mandioca, exportando principalmente para a Comunidade Econômica Européia. A produção de mandioca naquele país aumentou cerca de 5 vezes entre os anos de 1973 e 1982. Sua produção foi de 21.130.000 toneladas em 1992, o que representou 13,9% da produção mundial, para uma área plantada de 1.442.000 hectares e uma produtividade de 14.653 kg/ha (FAO, 1993; Hails et al., 1990 e Walker, 1966). A quantidade exportada pela Tailândia provavelmente seria impossível se a mandioca constituísse a principal fonte de energia da dieta dos tailandeses. Os fazendeiros da Tailândia, constituídos de pequenos agricultores do leste e nordeste do país, plantam a mandioca somente como cultura comercial, diferindo dos outros países onde a mandioca é

produzida principalmente para consumo local (Hails et al., 1990 e Manson, 1974).

Apesar do potencial da mandioca como alimento energético para populações de países em desenvolvimento e como matéria prima para a indústria, até recentemente a comunidade científica deu pouca atenção para a mandioca. Provavelmente por ser ela considerada uma cultura de subsistência ou cultura de famintos, na maior parte das regiões tropicais do mundo, onde ela é cultivada. Porém, mais recentemente essa visão tem sido modificada e há dois centros internacionais trabalhando com a cultura de mandioca: o CIAT na Colômbia e o IITA na Nigéria. Além disso, muitos países dentro do "cinturão da mandioca" têm estabelecido programas nacionais para desenvolver e incentivar o seu uso principalmente como alimento energético (Hammond, 1977 e Roca, 1984). Também ela é uma cultura que tem despertado a atenção de muitos cientistas pelas suas características peculiares; a ênfase tem sido dada à utilização da biotecnologia para superar muitos dos problemas relacionados com a cultura (Raemakers, 1993).

### 1.5 O USO DE RECURSOS GENÉTICOS DO GÊNERO *Manihot*

A ênfase maior nesse trabalho foi dada à espécie *M. glaziovii* conhecida como maniçoba e encontrada principalmente

na Região Nordeste do Brasil, onde vegeta espontaneamente. É uma árvore que pode atingir até 12 metros de altura com D.A.P. (diâmetro a altura do peito) de mais de 30 cm. Como característica econômica, já foi utilizada como produtora de látex até antes do fim da II Guerra Mundial, quando essa exploração extrativista foi abandonada. Sua borracha é um produto considerado de baixa qualidade, devido à forma como o látex é coletado, em pequenos buracos revestidos de argila junto ao colo da planta. Somado a isso, a maneira como é feita a sangria e a intensidade da mesma, cobrindo praticamente todos os galhos da planta, leva ao esgotamento e morte muito rápida da mesma.

Outras duas espécies de *Manihot* foram exploradas pelo látex que produzem: *M.dichotoma* e *M.cærulescens*. Hoje, populações dessas espécies estão sendo derrubadas para aproveitamento da madeira para confecção de tamancos e, segundo os agricultores, por se tratar de uma planta muito tóxica aos animais domésticos (Figueiredo, 1989). No entanto, em trabalhos desenvolvidos no CPATSA/EMBRAPA em Petrolina-PE, os ruminantes que consumiram as ramas frescas, murchas ou fenadas de maniçobas não apresentaram sintomas de intoxicação (Soares, 1989). Além desses fatores, as alterações dos centros de diversificação do gênero *Manihot* causadas pela expansão da fronteira agrícola, têm resultado na erosão genética das espécies silvestres e cultivares tradicionais da mandioca (Pereira, 1989).

A expansão da fronteira agrícola, com a incorporação de novas áreas para a agricultura moderna, principalmente para a formação de pastagens, tem resultado para muitas plantas pertencentes ao gênero *Manihot*, bem como outras espécies vegetais, na eliminação indiscriminada que pode levar à extinção (Allem, 1978 e Nassar, 1978a).

Atualmente é possível observar as chamadas mandiocas silvestres em quintais e mesmo jardins, como plantas ornamentais ou cercas vivas, uma utilidade que ainda não foi devidamente explorada e que pode ser mais um fator de conservação do germoplasma *ex situ*.

É limitado o uso de espécies de *Manihot* silvestres em programas de melhoramento genético por elas não estarem disponíveis para os melhoristas ou não se estabelecerem fora do seu ambiente natural. Além disso, pouco se conhece sobre os aspectos de biologia reprodutiva, constituição genômica e relação filogenética.

Tentativas bem sucedidas na produção de híbridos foram realizadas em várias partes do mundo, visando cruzar a mandioca com algumas espécies de *Manihot* (Asiedu et al., 1992). A *M. glaziovii* atualmente pode ser considerada, junto com outras

espécies do mesmo gênero, útil a programas de melhoramento de mandioca para a inclusão de outras características como resistência a pragas e doenças.

Outras espécies poderiam ser aproveitadas para modificar a arquitetura da planta de mandioca, aproveitando-se características de plantas herbáceas de baixo porte e de espécies em que as folhas se inserem ao pecíolo na posição vertical, com um melhor aproveitamento da luz solar.

Na África e na Ásia, experiências foram realizadas visando à utilização da *M.glaziovii* e de outras espécies silvestres, como progenitores em programas de melhoramento. Porém, poucos trabalhos de hibridizações interespecíficas da mandioca com seus parentes silvestres têm sido descritos. Essa situação parece estar relacionada com a ampla variabilidade genética ainda encontrada na *M.esculenta* e principalmente com a falta de conhecimento das características das parentes silvestres da mandioca (Pereira, 1989).

Nichols (1947) dá informação que, aparentemente até o ano de 1947, Koch, em Java, foi o único pesquisador que tentou hibridizações interespecíficas da mandioca, alcançando limitado sucesso no cruzamento de *M.esculenta* com *M.glaziovii* e insucesso total quando tentativas foram realizadas para cruzar *M.esculenta*

com *M.dichotoma*. Os trabalhos de Koch foram continuados por Bolhuis com a inclusão da *M.saxicola*, que é sinônimo de *M.melanobasis* segundo Allem e Goedert (1991), no programa de melhoramento, na tentativa de incorporar alelos que permitissem o aumento do teor de proteína nas raízes de mandioca (Bolhuis, 1953 e Bolhuis, 1969).

Devido à doença virótica mosaico africano (CMD) que ataca a mandioca na África, um grande projeto para obter variedades resistentes começou em 1937 em Amani, na Tanzânia, onde pesquisadores desenvolveram vários trabalhos envolvendo a hibridização da *M.esculenta* com as espécies *M.melanobasis*, *M.glaziovii* e *M.saxicola* (Jennings, 1970). Esses trabalhos mostraram que cultivares de mandioca oriundas do Brasil, Índias Britânicas, Congo Belga, Mauritânia e Oeste da África, com poucas exceções, se mostraram altamente suscetíveis à infecção por vírus, tendo sido interrompida, por isso, a introdução de germoplasma exótico. Foi então decidido enfrentar o problema utilizando-se aspectos práticos do melhoramento de plantas. Assim, a curto prazo, foi adotada a estratégia de cruzamentos controlados das variedades mais resistentes disponíveis na área e, a longo prazo, o estudo da resistência de outras espécies do gênero *Manihot* às estirpes do vírus do Leste da África e, ao mesmo tempo, a incorporação das espécies selecionadas em programa de hibridização interespecífica.

Com a eclosão da II Guerra Mundial, os trabalhos de melhoramento em Amani foram desacelerados e pequeno programa foi continuado em uma escala muito reduzida. Testes de resistência ao vírus foram realizados, utilizando-se a enxertia de plantas doentes sobre plantas supostamente sadias; a falha da transmissão da doença por esse processo foi aceita como prova da imunidade. O método de enxertia utilizado com sucesso por muitos anos é conhecido como fenda de topo.

Os cruzamentos interespecíficos de *M.dichotoma* X *M.esculenta* e recíprocos foram os mais interessantes do ponto de vista do melhoramento genético, porque evidenciaram-se que alguns clones individuais  $F_1$  e a progênie do primeiro retrocruzamento foram, com certeza, imunes àquela estirpe de vírus. Três genótipos de *M.dichotoma* e vários de mandioca foram inicialmente usados nos cruzamentos, com sucesso da hibridização em ambas direções. *M.saxicola* cruzada com mandioca produziu híbridos de pouco valor porque *M.saxicola* se mostrou muito suscetível ao mosaico. A grande vantagem no uso dessa espécie seria o aumento do teor de proteína das raízes. A completa esterilidade de híbridos  $F_1$  originados de cruzamentos interespecíficos foi de ocorrência comum, mas ela pode ser superada de forma artificial ou casual, permitindo a obtenção de gerações avançadas.

Os resultados indicaram que retrocruzamentos continuados do híbrido interespecífico resistente poderiam restaurar o sistema de raízes acumuladoras de amido sem a perda da resistência. Com base nesses resultados, a elevada resistência e não a completa imunidade foi o que se obteve nos cruzamentos entre mandioca X mandioca árvore (supostamente um híbrido de *M.esculenta* X *M.glaziovii*, que é encontrado em vários lugares da África) e entre *M.esculenta* e *M.glaziovii* (Nichols, 1947). Ainda na África, em Madagascar, Cours (1951) tentou, por volta de 1940, a utilização de cruzamentos de *M.esculenta* com *M.pringlei*, sem contudo conseguir bons resultados.

Na Índia, mais especificamente na Universidade Kerala em Trivandrum, teve início um programa de melhoramento de mandioca em 1944. A hibridização interespecífica usando-se *M.glaziovii* como mãe e *M.esculenta* como pai, não apresentou resultando na produção de frutos. O cruzamento recíproco apresentou algum sucesso, porém a produção de frutos foi muito baixa, somente um por cento. Mesmo assim foram obtidos 40 genótipos diferentes  $F_1$ , que foram multiplicados vegetativamente para a continuidade dos trabalhos de melhoramento. Após o quarto retrocruzamento, apareceram algumas características desejáveis da mandioca na descendência obtida (Abraham, 1957).

No Brasil, em 1968, foram realizados no IAC, Campinas-SP, cruzamentos de *M.esculenta* com *M.glaziovii*, *M.anomala*, *M.dichotoma* e outros três genótipos, presumivelmente, híbridos interespecíficos naturais de *M.esculenta*. Essa linha de pesquisa foi interrompida (Normanha, 1972 e Valle, 1991).

Em programas de melhoramento de plantas, a técnica da utilização de espécies silvestres relacionadas à espécie cultivada, tem proporcionado sucessos para algumas culturas econômicas como: algodão, aveia, batata, cana-de-açúcar, mandioca, milho, tomate e trigo (Esquinas-Alcazar, 1987; Frey, 1976; Jennings, 1972; Rick et al., 1977 e Stalker, 1980). A utilização de uma espécie exótica no melhoramento se torna necessária quando no germoplasma da espécie cultivada não se encontram os alelos para a característica desejada. Na grande maioria dos casos, a sua utilização é feita quando não se encontra fonte de resistência a determinadas pragas ou doenças, ou a sua ocorrência é em um grau muito baixo, quando comparada à reação de resistência das espécies silvestres. Um caso clássico do uso de espécie silvestre no melhoramento genético em trabalhos realizados na Tanzânia, na Costa Leste da África, foi a utilização de cruzamento de *M.esculenta* X *M.glaziovii* com três retrocruzamentos, com o objetivo de incorporar a resistência à doença mosaico africano (CMD) à mandioca. Amostras de sementes híbridas foram distribuídas para vários países da África sem

muito sucesso. Porém, na Estação Experimental "Moor Plantation" em Ibadan na Nigéria, um clone, identificado pelo número 58308, originado de um lote de sementes se mostrou resistente.

Esse clone foi multiplicado e conservado por 20 anos em um processo de multiplicação vegetativa sob uma forte pressão de infecção (Ekandem, 1970; Hahn et al., 1979; Jennings, 1959 e Jennings, 1972). Com a instalação do IITA naquela cidade, esse clone passou a ser o pilar do programa de melhoramento, visando à resistência da mandioca ao CMD. Descobriu-se, posteriormente, que esse clone era também resistente à bacteriose (CBB) (Hahn e Howland, 1972).

Com toda certeza, os melhoristas de mandioca nunca utilizarão parentes silvestres para conseguir a variabilidade genética desejada, se essa variabilidade pode ser facilmente encontrada no germoplasma da *M. esculenta*. Porém, apesar da utilização de parentes silvestres no melhoramento genético não ser uma prática comum atualmente, esse panorama mostra claras tendências de mudanças em futuro próximo. A utilização de parentes silvestres em programas de melhoramento genético poderia ser aprimorada se houvesse paralelamente um programa para a produção de linhagens pré melhoradas, com a incorporação das características desejadas da silvestre e eliminação das características indesejáveis (Ladizinsky, 1989).

Chavéz (1990); Gulick et al. (1983); Hershey (1987); Nassar (1978b,c); Nassar (1979b) e Nassar e Costa (1977) sugerem a utilização de outras espécies silvestres do gênero *Manihot* em programas de melhoramento genético da mandioca, visando à incorporação de algumas características específicas. Também relacionam algumas espécies cujas características poderiam ser usadas (Tabela 1).

A manutenção do germoplasma de *Manihot* em seu habitat natural tem sido um desafio. Muitas populações desse gênero têm desaparecido sistematicamente. Além disso, a maior parte das espécies é encontrada no Brasil, que por ser o país de origem deve ter a responsabilidade pela sua conservação, para que futuras gerações possam fazer uso delas. Por isso, esforços de agências governamentais e não governamentais devem ser realizados para que esse material não seja perdido para sempre. Assim, um bom programa de coleta e conservação *ex situ* desse material, possibilitará um estudo mais detalhado das características e potencialidades dessas espécies, favorecendo a produção de linhagens pré melhoradas a sua utilização em programas de melhoramento genético da mandioca. Paralelamente, genótipos das espécies que possuem características de boas produtoras de látex deveriam ser mais racionalmente exploradas, para possibilitar

TABELA 1 - Características de algumas espécies do gênero *Manihot* que poderiam ser utilizadas em programas de melhoramento genético da mandioca. CENARGEN/EMBRAPA, Brasília - DF. 1995.

Características	Espécies
Adaptada a condições de seca	<i>M. cærulescens</i> , <i>M. carthaginensis</i> , <i>M. dichotoma</i> , <i>M. pseudoglaziovii</i>
Adaptada a diferentes ecossistemas	<i>M. alutaceae</i>
Adaptada a solos ácidos	<i>M. irwinii</i> , <i>M. orbicularis</i>
Adaptada a solos alcalinos	<i>M. chlorostica</i> , <i>M. pentaphylla</i> , <i>M. pruinosa</i>
Adaptada a solos drenados	<i>M. falcata</i>
Adaptada a solos pobres	<i>M. cærulescens</i> , <i>M. paviæfolia</i> , <i>M. procumbens</i>
Com baixo teor de HCN	<i>M. pringlei</i>
De porte baixo	<i>M. falcata</i> , <i>M. paviæfolia</i> , <i>M. oligantha</i> subsp. <i>nesteli</i>
Alto teor de amido	<i>M. anomala</i> , <i>M. tripartita</i> , <i>M. oligantha</i> subsp. <i>nesteli</i> , <i>M. tristis</i> , <i>M. zehntneri</i>
Produtora de látex	<i>M. cærulescens</i> , <i>M. dichotoma</i> , <i>M. glaziovii</i>
Resistente às pragas comuns	<i>M. dichotoma</i> , <i>M. glaziovii</i>
Tolerante ao frio	<i>M. anisophylla</i> , <i>M. attenuata</i> , <i>M. grahamii</i> , <i>M. rubricaulis</i> , <i>M. stipularis</i>

mais uma oportunidade para os pequenos agricultores que vivem em áreas do semi-árido nordestino.

## CAPITULO 2

### 2 CULTIVO DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS DE *Manihot glaziovii*

## 2.1 INTRODUÇÃO

Sementes de espécies silvestres da mandioca sempre foram obtidas na natureza em um número muito reduzido pelas expedições de coleta. Isso se deve a dois fatos: primeiro, as espécies do gênero *Manihot*, por sua própria característica, produzem poucos frutos, que acontecem quando há a ramificação da planta, o número de sementes por fruto não passa de três; segundo, os frutos sendo deiscentes, quando de sua maturação as sementes são liberadas em forma de explosão.

O fruto de *Manihot* é uma cápsula que se abre de duas maneiras simultâneas em deiscência septicida e deiscência loculicida (CIAT, 1981). As sementes são atiradas a grandes distâncias das plantas, chegando em algumas espécies e em algumas situações até a 20 metros de seu tronco, se perdendo na vegetação nativa.

Também em coleta de germoplasma, os frutos podem ainda estar imaturos quando a expedição chega a uma população autóctone e mesmo assim são coletados, conseguindo-se em consequência sementes imaturas, de baixa qualidade e embriões não completamente desenvolvidos.

Em teste de germinação de 21 espécies de *Manihot*, Chavéz (1990) encontrou resultados que variaram de 0 a 15% de germinação e houve uma correlação entre a idade das sementes e a sua viabilidade. Além da germinação de embriões de espécies silvestres de *Manihot*, em programas de hibridização interespecífica, muitas vezes há necessidade do resgate dos embriões que de outra forma não se desenvolveriam. Por essas razões, o estabelecimento da técnica de cultivo de embriões zigóticos é muito importante para as espécies do gênero *Manihot*.

De maneira geral as sementes das diferentes espécies de *Manihot* são muito semelhantes. Normalmente as sementes variam de tamanho e formato que pode ser um pouco arredondado, mas apresentam as mesmas características como a presença da carúncula que fica inserida na extremidade mais escavada da semente e manchas irregulares de coloração escura brilhante com o fundo acinzentado, que ocorrem tanto na face dorsal como na face ventral da semente. Na germinação, a testa se abre por uma sutura lateral divisória das duas faces da semente. A estrutura da testa da semente é muito dura e difícil de ser quebrada.

## 2.2 REFERENCIAL TEÓRICO

O cultivo de embriões zigóticos teve início em 1904 com trabalhos de Hanning. Utilizando essa técnica foi possível obter

plântulas partindo de embriões maduros da hibridização de duas espécies de crucíferas (Collins e Grosser, 1984 e Pasqual e Pinto, 1988).

A aplicação mais comum da técnica de cultivo de embriões tem sido o resgate de híbridos inviáveis, oriundos de cruzamentos interespecíficos e intergenéricos (Hu e Ferreira, 1990 e Raghavan, 1977). Porém, essa técnica tem outras aplicações como: resgate de plantas ameaçadas de extinção; superar auto esterilidade das sementes; quebra de dormência das sementes; encurtamento de ciclo da planta em programa de melhoramento; teste para comprovar a viabilidade das sementes; produção de plantas monoplóides; realização de estudos básicos das condições nutricionais e físicas para o desenvolvimento dos embriões (Bridgen, 1994; Collins e Grosser, 1984; Pasqual e Pinto, 1988 e Townsend, 1979).

Embriões maduros não são muito exigentes em termos de meio de cultura, que pode ser composto de sais inorgânicos e uma fonte de energia. Auxinas e citocininas não são usadas em cultivo de embriões pela possibilidade de causar anomalias. Giberelina em algumas situações é usada para quebra de dormência. Porém, embriões imaturos exigem a adição de diferentes fito-hormônios, vitaminas, amino ácidos e em alguns casos extrato de endosperma (Bridgen, 1994 e Collins e Grosser, 1984). Como fonte de energia

no meio de cultura, a mais utilizada é a sacarose, que além do fornecimento de energia, atua na manutenção do potencial osmótico do meio de cultura (Bridgen, 1994). Carvão ativado adicionado ao meio de cultura pode ter efeito sobre o desenvolvimento dos embriões pela capacidade que ele possui de absorver substâncias inibidoras do meio de cultura (Pasqual e Pinto, 1988).

Em semente de mandioca, o endosperma funciona como tecido de reserva nutricional e proteção do embrião, sendo composto de células parenquimatosas de formato poliédrico. Do lado de dentro do endosperma estão as duas folhas cotiledonares no tamanho que corresponde à área interna da semente, tendo o formato elíptico com uma nervura primária central bem desenvolvida e com nervuras laterais menores (Viégas, 1976).

A técnica da cultura de embriões de *Manihot* para o resgate de embriões originados da hibridização de mandioca com espécies silvestres se apresenta como uma importante ferramenta na produção de híbridos e linhagens pré melhoradas (Asiedu et al., 1992 e Roca, 1984).

O cultivo de embriões é uma estratégia para aumentar a germinação das espécies silvestres, facilitando a sua conservação e utilização, pois as plântulas obtidas de cultivo de embriões podem ser micropropagadas *in vitro* pelo cultivo de nós

individuais ou mini manivas e transplantadas para o campo depois de devidamente aclimatadas. Para sementes de sete cultivares de mandioca houve uma melhoria na obtenção de plântulas, quando foi feito o cultivo de embriões *in vitro*. Porém, alguns eixos embrionários não se desenvolveram em plantas completas e, dos embriões excisados e inoculados em meio de cultura, 12 a 19% só produziu raízes e não houve crescimento da parte aérea. Os eixos embrionários excisados de sementes que boiaram, quando colocadas em água antes dos trabalhos de cultivo de embriões, se desenvolveram em plantas, mas em uma frequência muito baixa. Normalmente as sementes que flutuam em água não germinam, provavelmente por não estarem com os embriões formados ou o endosperma não ter se desenvolvido completamente (Chavéz, 1990).

O cultivo de embriões é também uma técnica simples para a quebra da dormência das sementes e aumenta a recuperação de plantas a partir de sementes de mandioca. Além disso, em programas de melhoramento genético, essa técnica permite também a obtenção de plântulas assépticas que podem ser multiplicadas rapidamente *in vitro*, antes de serem levadas para o campo para testes de produtividade e avaliação de suas características agronômicas (Biggs, Smith e Scott, 1986).

A técnica de isolamento, cultivo e desenvolvimento de embrião zigótico tem sido usada para recuperar plantas originadas

de cruzamentos interespecíficos usados em projeto de mapeamento molecular. Também pela sua utilização têm sido superadas as dificuldades de germinação de sementes de mandioca e de espécies silvestres de *Manihot*, nas quais embriões imaturos separados dos cotilédones puderam ser cultivados entre 25 a 45 dias depois da polinização, ainda no estágio de torpedo (CIAT, 1993).

O Jardim Botânico de KEW, na Inglaterra, utiliza procedimentos da cultura de tecidos *in vitro* para o resgate de plantas ameaçadas de extinção e oriundas de coletas caras em países em desenvolvimento. Para plantas lenhosas a cultura de embriões tem se mostrado promissora com a elevação da taxa de 5% para 20% de sucesso na recuperação de plantas. A germinação de embriões *in vitro* fornece os melhores resultados (Townsend, 1979).

Estudos conduzidos para adequar meios nutritivos para cultivar embriões maduros de mandioca e de espécies relacionadas revelaram três meios que suportam elevado desenvolvimento das plântulas: meio MS suplementado com 3% de sacarose, 7% de água de coco e 0,7% de agar; meio  $\frac{1}{2}$  MS com 3% de sacarose e 0,7% de agar e meio  $\frac{1}{2}$  MS com 3% de sacarose, 7% água de coco e 0,2% de gelrite. O crescimento das plântulas foi mais vigoroso no segundo meio utilizado no cultivo de embriões dissecados de sementes das espécies de *Manihot*: *M.anomala*, *M.cecropiæfolia*, *M.epruinosa*,

*M.glaziovii*, *M.reptans* e *M.tristis* (Ng, 1992). Embriões imaturos de mandioca cresceram e desenvolveram plântulas em meio B5 (Gamborg, Miller e Ojima, 1968) ou metade do meio MS suplementado com sacarose, água de coco ou caseína hidrolizada, AIA e agar ou gelrite para solidificar o meio. Com esse procedimento, barreiras de incompatibilidade podem ser superadas e embriões híbridos de cruzamentos entre mandioca e outras espécies de *Manihot* podem ser resgatados (Ng, 1990). Além disso, a cultura de embriões pode ser vantajosa para a obtenção de plantas adultas, quando o endosperma degenera ou quando as sementes não atingem a maturidade fisiológica. Essa técnica tem sido muito usada para a obtenção de híbridos interespecíficos e híbridos intergenéricos viáveis (Ng, 1992).

Para a comprovação da viabilidade das sementes, o teste de tetrazólio (cloreto de 2,3,5 trifenil tetrazólio), conhecido desde a década de 40, é de grande utilidade. Esse teste é rápido e estima a viabilidade das sementes com base na sua coloração. Tecidos vivos em contato com solução de sal de tetrazólio reduzem o sal, formando o composto insolúvel de cor vermelha denominado formazan. A reação se processa no interior das células onde o pigmento vermelho não se difunde, formando uma delimitação bem definida entre o tecido vivo que respira e o tecido morto que fica descolorido (França Neto et al., 1988).

### 2.3 HIPÓTESE

Se, através de cultura *in vitro*, a sobrevivência e o resgate de embriões zigóticos estiverem assegurados, então, será possível obter plantas de sementes provenientes de coletas em populações ameaçadas de extinção e de sementes oriundas de cruzamentos interespecíficos, superar as barreiras da incompatibilidade e garantir a conservação de espécies silvestres e o sucesso de seu uso em programas de melhoramento genético.

### 2.4 MATERIAL E MÉTODOS

As sementes de *M. glaziovii* foram produzidas e gentilmente cedidas pelo Setor de Raízes e Tubérculos do IAC em Campinas-SP. Os frutos maduros foram coletados de quatro árvores da espécie e postos a completar a maturação e estourar em casa de vegetação, no primeiro semestre de 1994. O lote de sementes logo que recebido foi imerso em água de torneira, onde 87% das sementes afundou, indicando sementes em boas condições fisiológicas. As sementes foram, imediatamente secas com papel toalha. O lote que afundou foi separado para fornecer os explantes para o experimento de cultivo de embriões. Uma amostra das sementes foi tomada para excisão dos embriões e verificação de sua viabilidade pelo teste de tetrazólio com solução a 1% e tempo de exposição de 2 horas sob temperatura de 30°C. A quebra

das sementes para extração dos embriões foi feita com a utilização de uma mossa de marceneiro acoplada à parte lateral da câmara de fluxo laminar contínuo marca Veco no laboratório de cultura de tecidos da ACR (Área de Conservação de Recursos Genéticos) do CENARGEN/EMBRAPA.

Foi usado meio de cultura WPM (Anexo B) modificado (Tabela 2) e desenvolvido para plantas lenhosas, com baixo poder iônico total, melhor relação Ca/Mg, baixo teor de Cl e sem elementos não essenciais, com e sem adição de carvão ativado na dosagem de 0,3% peso/volume (p/v). A esterilização do meio de cultura foi feita em autoclave a 120°C de temperatura e 1,5 atmosfera de pressão por 20 minutos. Os embriões foram distribuídos em tubos de ensaio medindo 10x120mm, com 3ml de meio

TABELA 2. Meio nutritivo WPM (McCown e Lloyd, 1981 e Wood, 1982) modificado usado nos experimentos de cultivo de embriões zigóticos e de micro-enxertia, com pH corrigido para 5,7. CENARGEN/EMBRAPA, Brasília - DF. 1995.

Componentes	Quantidade
WPM (Anexo B)	Completo
Carvão ativado	0,3% p/v
Agar	0,7% p/v

de cultura por tubo. A vedação dos tubos foi feita com filme de PVC esticável com 17 micra de espessura marca Resinite RMFA 61-HY. A esterilização das sementes foi feita com hipoclorito de sódio a 2% por 20 minutos, seguida de três enxágües em água esterilizada (destilada e autoclavada). Depois das sementes quebradas, os embriões foram retirados com o auxílio de uma pinça e de um bisturi, não carregando com ele partes do endosperma ou da folha cotiledonar e sem sofrer esterilização após a excisão.

Os tratamentos usados constituíram-se de um fatorial de três temperaturas de incubação (20, 25 e 30°C) com fotoperíodo de 12 horas e uma intensidade média de luz de 3600 lux, correspondendo a  $70,02 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  de fluxo de ftons fotosintéticos (Anexo A), versus presença ou ausência de carvão ativado na dosagem de 0,3% p/v. Foram realizadas três avaliações ao longo da duração do experimento, aos 10, 15 e 20 dias da inoculação. Os tratamentos foram aplicados em parcelas constituídas por 9 embriões e as repetições foram feitas no tempo. A análise do experimento seguiu um modelo de parcelas divididas, tomando-se na parcela as combinações do fatorial e nas sub parcelas as avaliações ao longo do tempo.

Na análise conjunta dos três tempos de avaliação foi adotado um modelo de uma parcela dividida, tendo na parcela principal o fatorial de 2 níveis (0,0 e 0,3% p/v) de carvão ativado versus 3 temperaturas (20, 25 e 30°C) e na sub-parcela as três avaliações realizadas aos 10, 15 e 20 dias da inoculação. A análise foi conduzida na escala arcoseno  $\sqrt{p}$ , sendo p a porcentagem de embriões germinados de um total de 36 embriões.

## 2.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas espécies do gênero *Manihot*, na extremidade da semente correspondente a carúncula, está inserido o embrião de cor branca entre as folhas cotiledonares apresentando tamanho variável dependendo da espécie. A maior parte do embrião está alojada e protegida em um receptáculo da testa bastante duro e córneo. Quando o embrião é extraído, pode ser identificada a extremidade correspondente à plúmula e à radícula, pela posição que ele ocupa dentro da semente. Depois de extraído o embrião, essa identificação é possível sob microscópio estereoscópico.

Os embriões da amostra de sementes submetidos ao teste de tetrazólio coloriram-se após as 2 horas na solução, a 1% e sob a temperatura de 30°C. Dos embriões testados, 53% coloriu-se completamente mostrando que estavam viáveis. Pelo teste de tetrazólio, foi possível estabelecer 4 classes para os embriões.

Uma classe de embriões completamente descoloridos, mostrando que estavam mortos, outra classe com os embriões coloridos em sua totalidade, demonstrando que estavam viáveis e, duas outras classes intermediárias, uma com a parte central colorida e as extremidades sem colorir, indicando que só o hipocótilo estava vivo e a plúmula e radícula, mortos e outra onde só uma extremidade estava colorida, coincidindo com a extremidade da radícula quando vista sob microscópio estereoscópico.

Na germinação dos embriões, a emissão das raízes apresentou o mesmo modelo de desenvolvimento da germinação de sementes da mandioca com uma raiz principal pivotante e quatro raízes secundárias laterais, que se inserem na região de transição entre o caule e a raiz, descrito por Viégas (1976).

A porcentagem de embriões germinados ao longo dos três períodos de avaliação do experimento, aos 10, 15 e 20 dias após a inoculação dos embriões, dependeu da temperatura de incubação a que foram submetidos (Figura 2). Em temperatura de 20°C a germinação dos embriões pode ser detectada somente aos 20 dias da inoculação, enquanto que sob temperaturas de 25 e 30°C a germinação teve tendência linear crescente a partir da avaliação aos 10 dias. Já o efeito médio geral do carvão ativado sobre a germinação dos embriões, considerando as três épocas de avaliação, foi da ordem de 1,36% com um intervalo de confiança de

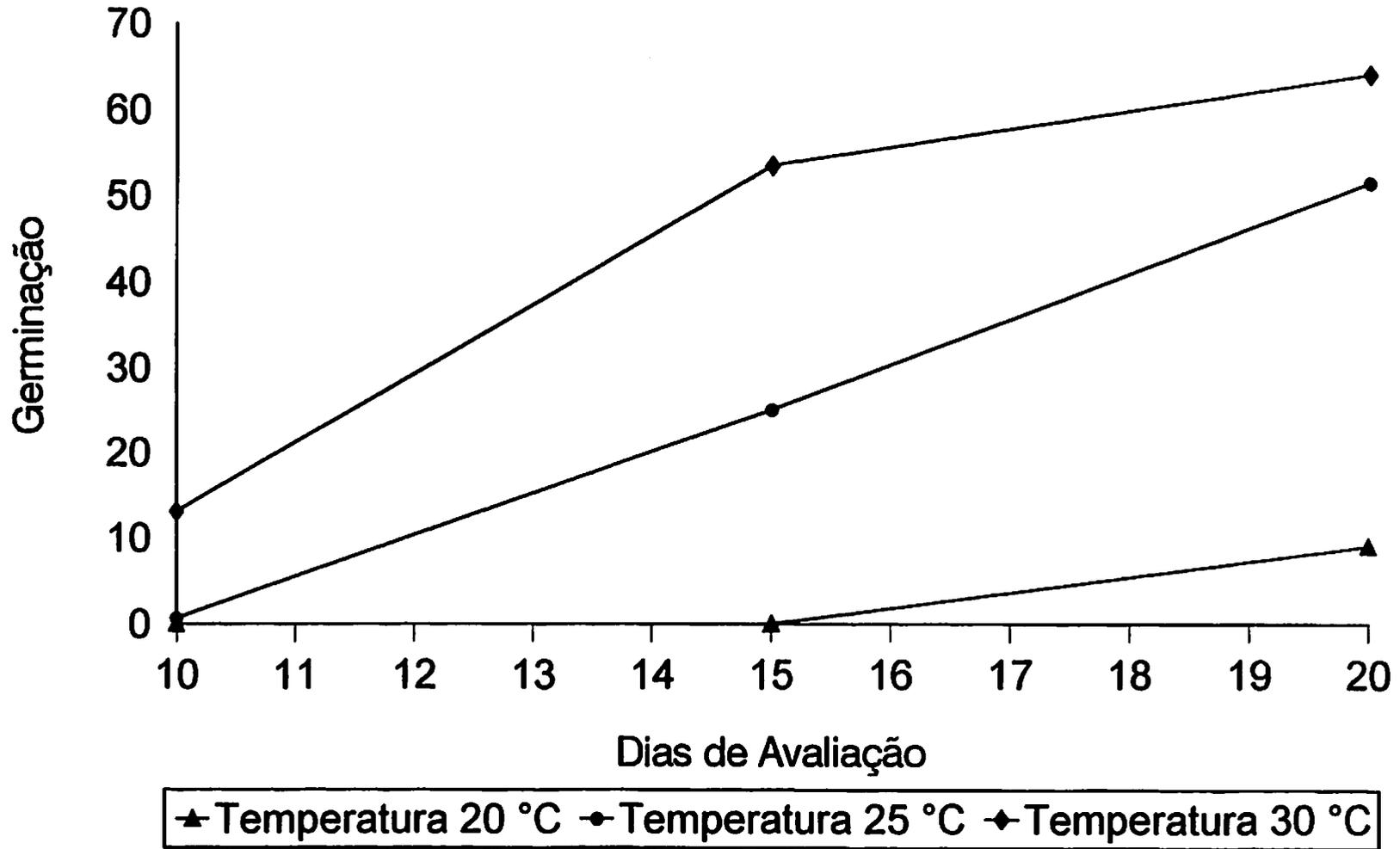


FIGURA 2. Porcentagem de germinação de embriões de *Manihot glaziovii* em três temperaturas. CENARGEN/EMBRAPA, Brasília - DF. 1995.

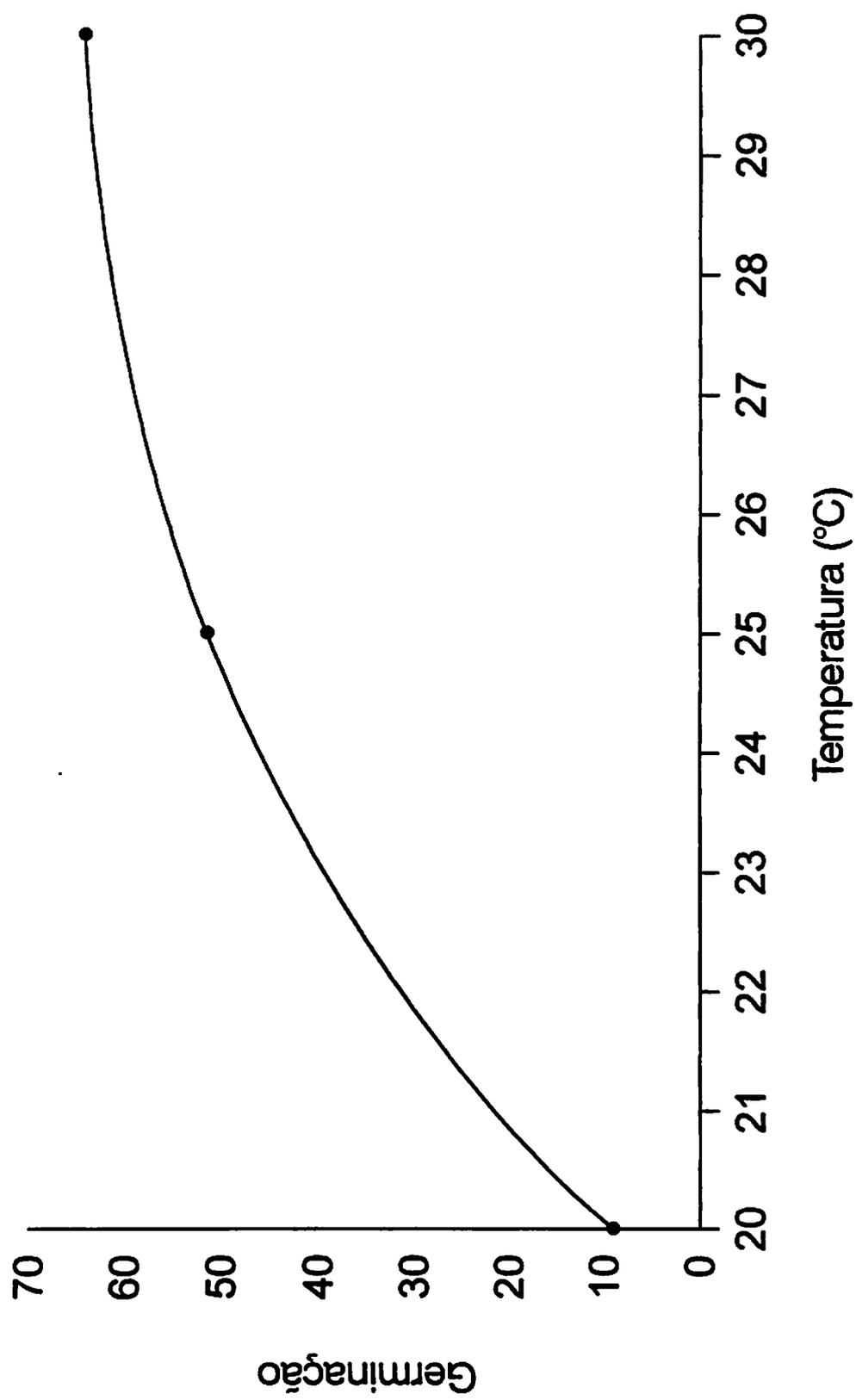
95% ( $\sim 0$ ; 5,36%), indicando que em média ele é pouco expressivo, quando comparado aos efeitos da temperatura.

Em análises conduzidas com os dados da avaliação aos 20 dias da inoculação foi detectado o efeito da temperatura e do carvão ativado aos níveis de 1 e 5%, respectivamente (Figura 3). O efeito do carvão ativado, adicionado ao meio de cultura, sobre a germinação dos embriões foi estimado em 3,75% com um intervalo de confiança de 95% ( $\sim 0$ ; 9,64). Também aos 20 dias foi detectado um efeito quadrático na porcentagem de germinação dos embriões quanto à temperatura.

As fontes de variação significativas foram os efeitos principais de carvão (ao nível de 5%), tempo de avaliação (ao nível de 1%) e temperatura (ao nível de 1%) e a interação temperatura versus tempo de avaliação (ao nível de 1%).

Observou-se que os embriões germinados em meio com carvão ativado apresentaram plântulas mais viçosas aos 20 dias de cultivo, apesar do efeito do carvão ativado ter sido estimado em somente 3,75% para a porcentagem de germinação.

A germinação dos embriões foi direta, com o crescimento inicial da radícula e logo a seguir da plúmula; não foi observado o desenvolvimento de calo junto aos embriões.



**FIGURA 3.** Porcentagem de germinação de embriões de *Manihot glaziovii* em três temperaturas aos 20 dias. CENARGEN/EMBRAPA, Brasília - DF. 1995.

## 2.6 CONCLUSÕES

Pela avaliação do teste de tetrazólio, era esperada uma porcentagem de germinação máxima dos embriões de 53% em comparação com o valor médio de 57,4%, obtido quando os embriões foram submetidos às temperatura de 25 e 30°C pelo período de 20 dias. Esses resultados mostram que o teste de tetrazólio da forma como foi executado é um bom parâmetro para avaliar a viabilidade das sementes de *M.glaziovii* e provavelmente poderá ser usado para outras espécies de *Manihot*.

Para as sementes de *M.glaziovii* a temperatura de 20°C se mostrou inadequada à germinação dos embriões.

A velocidade de germinação dos embriões foi diretamente afetada pelas temperaturas às quais foram submetidos durante o período de cultivo (Figura 2). A germinação mais elevada foi conseguida à temperatura de incubação de 30°C. O efeito quadrático (Figura 3), observado na porcentagem de germinação quanto à temperatura de germinação, indica que dentro da amplitude das temperaturas utilizadas foi detectada uma tendência à estabilização da porcentagem de germinação. É provável que haja um ganho adicional da germinação utilizando temperaturas acima de 30°C, porém o ganho será muito pequeno comparado ao observado. Ao final dos 20 dias de incubação dos embriões, a temperatura

utilizada foi o fator mais importante na porcentagem de germinação. Esse resultado confirma o esperado para uma espécie tropical cujo centro de dispersão é a Região do Nordeste brasileiro, onde as temperaturas são constantemente elevadas.

A utilização do meio de cultura WPM se mostrou eficiente no cultivo dos embriões zigóticos de *M.glaziovii*.

Carvão ativado adicionado ao meio de cultura na quantidade de 0,3% p/v mostrou uma ação muito pequena de 3,75% na germinação quando comparado ao efeito da temperatura. Porém, foi observado visualmente que as plântulas germinadas em meio com carvão ativado se mostraram mais viçosas ao fim dos 20 dias de cultivo, sugerindo o seu uso no cultivo de embriões.

Com base nesses resultados, recomenda-se que em cultivo de embriões de *M.glaziovii*, seja utilizada a temperatura de 30°C em câmara com fotoperíodo de 12 horas e intensidade luminosa de 3600 lux ( $70,02 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ), com carvão ativado adicionado ao meio de cultura WPM na dosagem de 0,3% p/v. Essa metodologia deve ser testada para outras espécies de *Manihot*.

### 3.1 INTRODUÇÃO

É muito grande a dificuldade de conservar as espécies silvestres parentes da mandioca *ex situ*. Em expedições de coleta, o número de sementes obtido é normalmente muito pequeno, além delas apresentarem diferentes estágios de maturação e a germinação das sementes sempre foi problemática. É dispendiosa e pouco eficiente a coleta de plantas ou mudas inteiras com suas raízes envoltas no próprio torrão de terra onde vegetam, protegido de destorroar com saco de aniagem ou plástico, pois são poucos os indivíduos de uma população que podem ser resgatados dessa maneira.

Não é possível a coleta de estacas ou manivas, à semelhança do que é feito para mandioca, pois as estacas não enraizam e quando são plantadas, as brotações surgem das gemas laterais e chegam a se desenvolver, dando a falsa impressão que originaria uma planta completa. No entanto, o desenvolvimento das brotações acontece até que as reservas da estaca são esgotadas, entrando todo o sistema em colapso e morte.

A propagação de *M.glaziovii* por plantio de suas estacas ou manivas diretamente no campo, à semelhança do que é feito na cultura da mandioca, não tem sido possível devido à não formação de seu sistema radicular (Figueiredo, 1989). A enxertia de

*M.glaziovii* sobre porta-enxerto de mandioca cultivada, para evitar a ocorrência severa de doença virótica, tem mostrado compatibilidade não só para a produção de raízes em fundo de quintal, pelo sistema "mukibat" desenvolvido na Indonésia, como também em pesquisa para a comprovação de resistência à infecção virótica e também visando à conservação de plantas (Dharmaputra e Bruijn, 1977; Nichols, 1947). A técnica de enxertia de várias espécies de *Manihot* sobre mandioca foi experimentada na UnB (Universidade de Brasília) em Brasília, mas só funcionou quando a *M.glaziovii* foi usada como enxerto (Nassar, 1989).

A enxertia de uma espécie sobre outra não produz em si um híbrido interespecífico. Porém, a técnica tem sido usada para aumentar a probabilidade de sucesso na hibridização, promovendo a sobrevivência de híbridos interespecíficos e na predição da compatibilidade entre as espécies, superando também a inibição ao florescimento (Ng, 1992).

Técnicas de cultura de tecidos em mandioca têm sido pesquisadas, já existindo vários protocolos definidos para: micropropagação, conservação *in vitro*, criopreservação, embriogenia somática, cultivo de pólen para produção de haplóides, cultivo de embriões zigóticos, mutação *in vitro* via irradiação, transformação de plantas usando *Agrobacterium tumefaciens* ou bombardeamento (Castaño et al., 1993; Escobar,

Roca e Mafla, 1993; Kartha e Gamborg, 1975; Mafla et al., 1993; Mbanaso, Nwachukwu e Ene, 1993; Raemakers, Jacobsen e Visser, 1993; Roca, 1979; Roca e Jayasinghe, 1982; Sarria et al., 1993; Sudarmonowati e Henshaw, 1993).

A técnica da cultura de tecidos oferece grande potencial na propagação, multiplicação, conservação e intercâmbio de recursos genéticos e mesmo como ferramenta para o melhoramento genético de várias culturas. Porém, o cultivo *in vitro* de espécies de *Manihot* via cultura de meristema tem enfrentado vários problemas, pois não se tem um protocolo que possa ser usado para todas elas. Cada genótipo reage de determinada maneira na formação de uma plântula completa, necessitando de desenvolvimento de meios de cultura e técnicas específicas para cada um deles. Mesmo aqueles genótipos que podem ser multiplicados *in vitro* têm seu comportamento bastante variável. Alguns genótipos, quando repicados, podem desenvolver plantas completas com parte aérea e raízes, enquanto outros só formam a parte aérea com um calo na base das mini manivas. Existem também casos intermediários de genótipos em que algumas plântulas se comportam como no primeiro caso e outras, como no segundo caso.

*M. glaziovii* apresenta problemas tanto de cultivo de meristema como na posterior repicagem e multiplicação da plântula. Porém, essa espécie pode ser enxertada sobre a

mandioca e teoricamente a micro-enxertia *in vitro* poderia proporcionar um aumento no número dos indivíduos de um mesmo genótipo, permitindo a sua utilização em programas de produção de linhagens pré melhoradas, além de sua conservação *ex situ*. Outra vantagem é a facilidade de intercâmbio desse germoplasma por se tratar de um cultivo axênio onde o genótipo de interesse estaria enxertado sobre mandioca, facilitando multiplicação e transferência das plantas para o campo.

Alguns sucessos de micro-enxertia *in vitro* têm sido obtidos principalmente para plantas frutíferas lenhosas. Em *Citrus*, a sua utilização tem ocorrido com o objetivo de limpeza clonal de viroses. Hoje em dia não se concebe um programa de pesquisa em citros, que não inclua a técnica da micro-enxertia. Também para prunóideas essa técnica tem sido utilizada com êxito.

### 3.2 REFERENCIAL TEÓRICO

Duas são as dificuldades encontradas por aqueles que trabalham com germoplasma de espécies silvestres: a conservação em coleção ativa e sua multiplicação para incorporação em programa de melhoramento. Provavelmente essa seja a razão mais importante para a pouca utilização de espécies silvestres no melhoramento genético da mandioca, além do imediatismo que caracteriza os administradores de pesquisa e mesmo os

pesquisadores, que buscam resultados rápidos e não se interessam por programas de melhoramento que demandam muito tempo. O pouco conhecimento das características das espécies de *Manihot* é outro fator que tem desestimulado o seu uso. Muitas das características que são relacionadas às diferentes espécies são baseadas nas observações do comportamento das mesmas dentro do contexto ambiental do local de origem ou coleta. Não existem trabalhos sistemáticos de caracterização desse germoplasma (Valle, 1991).

Nassar (1979a) utilizou sementes, estacas, plantas inteiras e enxertia sobre *M. esculenta* no intuito de preservar as espécies coletadas. No entanto, as sementes botânicas de muitas espécies apresentaram problemas de germinação e a brotação das estacas normalmente foi muito pobre, sem o seu concomitante enraizamento. Quando a planta inteira de uma espécie foi trazida de um habitat completamente diferente daquele onde a coleção estava instalada no campo, na maioria das vezes não sobreviveu por muito tempo. Todos esses fatores constituem barreiras que influem negativamente na implantação da coleção de espécies silvestres *ex situ*.

Além da potencialidade de aplicação no melhoramento genético convencional, a utilização de espécies silvestres, principalmente em plantas frutíferas, tem ocorrido como porta-enxerto, para evitar muitas doenças ou pragas do solo. Assim, em

*Vitis*, a utilização de porta-enxerto de espécies silvestres originárias da América do Norte fez com que a resistência ao pulgão *Daktulosphaira vitifoliae* (*Phylloxera*) fosse conferida a cultura (Smith, 1992). Em *Citrus*, a mudança do porta enxerto no Brasil permitiu o controle da doença virótica tristeza (Moreira e Moreira, 1991). De maneira contrária, o enxerto pode ser da espécie silvestre e o porta-enxerto da espécie cultivada, como é o caso da produção de mandioca em pequena escala na Indonésia e em algumas regiões da África pelo sistema "mukibat" (Dharmaputra e Bruijn, 1977). Por esse sistema, o porta-enxerto de *Manihot esculenta* altamente suscetível às doenças mosaico africano e bacteriose recebe o enxerto de *M.glaziovii*, resistente a ambas doenças. Com essa combinação, o dreno se constitui em raízes da mandioca e a fonte fica sendo a copa da *M.glaziovii*. Assim pode ser conseguida uma produção de raízes de mandioca que de outra forma não seria possível, em áreas onde essas doenças ocorrem com grande severidade.

Com o objetivo principal de limpar clones de citros infectados por vírus, Murashige et al. (1972) desenvolveram uma técnica de micro-enxertia *in vitro*, onde meristema com alguns primórdios foliares era enxertado sobre plântula originada de semente de *Poncirus trifoliata*. A utilização dessa espécie como porta-enxerto foi devido à característica de possuir folhas trifoliadas, que funcionariam como marcas para se ter certeza de

que a brotação era do enxerto e não de alguma gema adventícia. Por esse processo, foi evitado o indesejável rejuvenescimento típico de plantas obtidas de cultura de nucelos. A técnica da micro-enxertia, sempre com o objetivo de limpeza clonal, foi melhorada com um sucesso de 30 a 50% nos enxertos, pelo uso de porta-enxertos constituídos de plântulas com duas semanas de germinação, desenvolvidas no escuro. Os enxertos foram por garfagem em T-invertido, com pontas caulinares, medindo de 0,14 a 0,18mm, correspondendo ao meristema, mais alguns primórdios foliares. As plantas micro-enxertadas mantidas *in vitro* foram transplantadas para solo 5 a 8 semanas após a enxertia, com uma taxa de sobrevivência acima de 95%. Além de ter sido determinado o melhor tamanho do ápice caulinar para a micro-enxertia, foi determinada também a melhor origem. Foi sugerido que com essa técnica, cultivares superiores poderiam ser intercambiadas livres de vírus e, seleções poderiam ser desenvolvidas para teste e avaliação (Navarro, Roistacher e Murashige, 1975; Navarro, Roistacher e Murashige, 1976).

Para prunóideas foi desenvolvida a técnica da micro-enxertia de topo *in vitro* para a limpeza clonal. As diferentes espécies de *Prunus* mostraram diferenças marcantes nos resultados. O sucesso da enxertia foi de 45 a 70% para pêssego (*P.persica* Batsch), 45% para amêndoa (*P.amigdalus* Batsch), 40% para ameixa japonesa (*P.salicina* Lind.) cultivar 'Red Beaut', 26% para ameixa

(*P.domestica* L.) cultivar 'Stanley', 8% para ameixa europeia (*P.insititia* L.) e 10 a 12% para damasco (*P.armeniaca* L.). A técnica consiste em enxertar, sob condições assépticas, um pequeno broto (0,4 a 1,0mm), dentro do anel vascular de um seedling jovem decapitado como porta enxerto, desenvolvido *in vitro*. Essa estratégia requer as técnicas do preparo do porta enxerto e do material de enxertia, aplicação do procedimento de enxertia, cultura *in vitro* das plantas enxertadas e transferência para solo. A taxa de sobrevivência depois do transplante foi de 60 a 70%. A técnica tem se mostrado útil para a obtenção de árvores de pêsegue livres do vírus da mancha clorótica da folha (CLSV), vírus da mancha circular necrótica (PNRSV) e vírus do nanismo de *Prunus* (PDV); árvores de amêndoas livres de CLSV, PNRSV, PDV e vírus do mosaico da maçã (AMV); árvores de ameixa livres de CLSV e vírus da verruga de ameixa (PPV) e árvores de damasco livres de CLSV (Juarez et al., 1990).

O uso da micro-enxertia de espécies silvestres de *Manihot*, que não se desenvolvem em cultivo *in vitro*, possibilitaria a conservação e o intercâmbio desse germoplasma. Na conservação, no lugar das repicagens periódicas, seriam realizadas micro-enxertias, quando o micro-enxerto apresentasse perda no seu vigor ou devido ao esgotamento do meio de cultura. Dessa maneira estaria garantida a sobrevivência dessas plantas de

grande valor real e potencial para o melhoramento genético da mandioca.

### 3.3 HIPÓTESE

Se, por meio da micro-enxertia de espécies silvestres de *Manihot* sobre mandioca, fosse garantida sua sobrevivência e multiplicação, então, seria possível sua incorporação em programa de melhoramento genético, sua conservação *in vitro* para conservação do recurso genético e intercâmbio entre as instituições interessadas que trabalham com mandioca.

### 3.4 MATERIAL E MÉTODOS

As sementes de *M.glaziovii* foram produzidas e gentilmente cedidas pelo Setor de Raízes e Tubérculos do IAC em Campinas-SP. Os frutos maduros foram coletados de quatro árvores da espécie e postos a completar a maturação e estourar em casa de vegetação, no primeiro semestre de 1994. Dessas sementes foi tomada uma amostra de 100 sementes para teste de tetrazólio conforme descrito no capítulo anterior, sem a eliminação daquelas que boiaram em água. A quebra das sementes para a extração dos embriões foi feita com a utilização de uma moesa pequena de marceneiro, acoplada à parte lateral da câmara de fluxo laminar

contínuo, do Laboratório de Cultura de Tecidos da Área de Biologia Celular do CENARGEN/EMBRAPA.

Todas operações de repicagem e micro-enxertia foram realizadas na mais rigorosa assepsia em câmara de fluxo laminar contínuo da marca Veco modelo HLFS 18. Os frascos foram vedados utilizando-se filme de PVC esticável marca Resinite RMF 61-HY com espessura de 17 micra.

#### 3.4.1 PRODUÇÃO DAS GEMAS PARA ENXERTO

Os embriões, seguindo a técnica do cultivo de embriões descrita no Capítulo 2, foram inoculados em frascos de vidro tipo F.LEX-806R-1016 de 50ml de volume, com 10ml do meio de cultura WPM (Anexo B) modificado (Tabela 2) por frasco e levados para incubação na câmara de crescimento, a 27°C de temperatura, fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de 3000 lux correspondendo a  $56,52 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  de fluxo de ftons fotossintéticos (Anexo A). Trinta dias após, as plântulas germinadas foram transferidas para novo meio de cultura.

Após 110 dias de incubação dos embriões, foram tomadas ao acaso oito plântulas com desenvolvimento normal, para multiplicação *in vitro*. A identificação foi realizada pela denominação genótipo, seguida por numeração em ordem seqüencial

de 1 a 8. Para a multiplicação foi utilizado o meio WPM modificado em frascos F.LEX-806R-1016, com 10ml do meio de cultura/frasco. A taxa de multiplicação desses genótipos variou de 4:1 a 7:1 explantes/plântula (e/p) com uma média de 6:1 e/p. Após a inoculação, os explantes foram incubados em germinador marca Percival modelo I-60LLVL regulado para 30°C de temperatura, 80% de umidade relativa e fotoperíodo de 12 horas, com intensidade luminosa média de 3820 lux correspondendo a 74,98  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  de fluxo de ftons fotossintéticos, para acelerar o crescimento das plântulas.

Aos 70 dias da primeira multiplicação, foram selecionados ao acaso os genótipos 4 e 5. O objetivo foi aumentar o número de plântulas por genótipo, para que fosse possível conseguir número suficiente de gemas laterais para micro-enxertia. Esses genótipos foram mais uma vez multiplicados a uma taxa de multiplicação de 2,7:1 e/p para o genótipo 4 e de 2,9:1 e/p para o genótipo 5.

Aos 110 dias da segunda multiplicação da *M.glaziovii*, foi realizada a micro-enxertia dos genótipos 4 e 5 sobre porta-enxerto de *M.esculenta*, cultivar Cavalo (BRA-007358), que estava com 90 dias da última multiplicação. A taxa de produção de gemas laterais de *M.glaziovii* para a micro-enxertia foi de 7,1:1 e/p para o genótipo 4 e de 5,5:1 e/p para o genótipo 5.

### 3.4.2 PRODUÇÃO DAS PLÂNTULAS PARA PORTA-ENXERTO

Os explantes iniciais foram conseguidos de plântulas da cultivar Cavalo, obtidas *in vitro* do Banco Ativo de Germoplasma de Mandioca do CNPMF/EMBRAPA, em tubos de ensaio com meio de cultura MS (Murashige e Skoog 1962) completo (Anexo B). As plântulas originais foram multiplicadas em meio WPM modificado por duas vezes consecutivas em um espaço de tempo de 90 dias entre as repicagens. A incubação dos explantes e plântulas foi feita em germinador marca Percival, regulado para as mesmas condições de cultivo das plântulas de *M.glaziovii* relatadas no item anterior.

### 3.4.3 PREPARO DOS PORTA-ENXERTOS

Os enxertos foram realizados sob microscópio estereoscópico com aumento de 8 a 10 vezes. As mini-estacas porta-enxertos foram cortadas com lâmina de bisturi em tamanho que variou de 10 a 15mm, constituindo-se de entre-nós do caule, cortados no sentido transversal logo abaixo da gema lateral superior e, em bisel, na base da mini-estaca pouco acima da gema lateral inferior. Dessa maneira ficou fácil a identificação do lado em que o micro-enxerto deveria ser realizado, como também a penetração da mini-estaca no meio de cultura sólido. As mini-

estacas porta-enxertos foram mantidas em placa de petri de 9cm de diâmetro sem papel de filtro, com 20 gotas de água esterilizada, em lotes de 10 a 15 mini-estacas por vez, para evitar desidratação durante o período da operação da micro-enxertia.

#### 3.4.4 PREPARO DOS ENXERTOS

Após o preparo de cada lote de mini-estacas (10 a 15), uma plântula de *M.glaziovii* era retirada do frasco e colocada em uma placa de petri, com algumas gotas de água esterilizada. Com o auxílio do microscópio estereoscópico com aumento de 8 a 10 vezes e com o uso de pinças e bisturis, extrairam-se as gemas laterais, uma a uma, para a realização da micro-enxertia. Devido à delicadeza dessa operação, ela foi realizada com rapidez evitando a desidratação tanto do porta-enxerto como da plântula fornecedora das gemas laterais para a enxertia, o que comprometeria os resultados da operação.

#### 3.4.5 EXECUÇÃO DA MICRO-ENXERTIA

Um corte lateral de 1 a 2mm foi feito a 3-5mm do topo da mini-estaca. Logo a seguir foi introduzida a gema lateral obtida de plântula de *M.glaziovii*, que foi excisada por dois cortes em bisel feitos com lâmina de bisturi número 11. O primeiro corte na parte superior da gema foi seguido de corte na

parte inferior e introdução da gema com o formato de uma cunha no corte lateral do porta-enxerto. Imediatamente após, o conjunto enxerto+porta-enxerto foi inoculado ao meio de cultura WPM modificado, em frasco F.LEX-806R-1016, passando-se à operação de micro-enxertia do porta-enxerto seguinte. Os frascos foram vedados com filme de PVC esticável. O rendimento dos micro-enxertos foi de 9,1:1 e/p para o genótipo 4 e 8,4:1 e/p para o genótipo 5.

Depois da operação de micro-enxertia, os frascos foram mantidos por 48 horas em penumbra sob temperatura de 27°C, antes de serem levados para o germinador marca Percival. O germinador foi regulado para as mesmas condições ambientais em que foram cultivadas as plântulas fornecedoras dos enxertos e as plântulas fornecedoras das mini-estacas porta-enxertos.

Foram realizadas 100 micro-enxertias utilizando-se o genótipo 4 e, 100 micro-enxertias utilizando-se o genótipo 5 sobre a cultivar de mandioca Cavalo.

### 3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pelo teste de tetrazólio dos embriões extraídos das sementes de *M.glaziovii*, observou-se que 36% dos embriões coloriu-se completamente, indicando que estava viável. A

porcentagem dos embriões considerados germinados foi de 42% aos 10 dias e 45% aos 20 dias da inoculação, quando a germinação estacionou. Aos 30 dias da inoculação dos embriões, as plântulas foram transferidas para tubos de ensaio, no tamanho de 20x150mm contendo o mesmo meio de cultura WPM modificado, para permitir o maior desenvolvimento das plântulas pelo novo meio de cultura e pelo maior espaço oferecido no tubo de ensaio. O melhor desenvolvimento das plântulas permitiu a obtenção de maior número de explantes para multiplicação.

Aos 60 dias após a primeira multiplicação da *M.glaziovii*, isto é, multiplicação das plântulas originadas da germinação dos embriões *in vitro*, em 25,5% das plântulas podiam ser vistas raízes tocando o fundo do frasco. Não foi possível observar as fases intermediárias do desenvolvimento das raízes devido ao uso do carvão ativado que escureceu o meio de cultura. Dos oito genótipos selecionados, dois não produziram raízes quando multiplicados. O desenvolvimento das plântulas nesse período foi uniforme, independente de ter ou não acontecido a rizogênese.

Na avaliação das plântulas obtidas dos dois genótipos selecionados, aos 80 dias depois da segunda multiplicação, ficou evidente a diferença de comportamento dos genótipos. Enquanto o genótipo 4 produziu 5% de plântulas com raízes que desenvolveram

até ao fundo do frasco e estava com 50% de suas folhas senescentes, o genótipo 5 não produziu raízes e 10% de suas plântulas mostrou uma grande formação de calo na base dos explantes e 70% das folhas estava senescente.

Utilizando de meio WPM modificado e mesmas condições de incubação dos clones 4 e 5, as plântulas da cultivar Cavalo foram multiplicadas por três vezes durante o mesmo período de multiplicação da *M.glaziovii*, produzindo plântulas em quantidade suficiente para o fornecimento de mini-estacas para o experimento de micro-enxertia.

Os resultados da avaliação do experimento aos 130 dias após a micro-enxertia dos genótipos 4 e 5 sobre porta-enxerto da cultivar Cavalo estão apresentados na Figura 4. Em alguns casos, um mesmo micro-enxerto apresentou mais de uma característica.

Mini-estacas da cultivar de mandioca Cavalo, preparadas para micro-enxertia, mas sem o micro-enxerto e inoculadas ao meio de cultura WPM modificado, ao longo dos 30 aos 50 dias não formaram raízes nem gemas adventícias no local do corte apical. Aos poucos elas foram perdendo a clorofila, tomando a coloração palha e morreram, continuando túrgidas devido ao ambiente úmido do interior do frasco. Aparentemente isso também aconteceu quando as gemas enxertadas não se soldaram ao porta-enxerto.

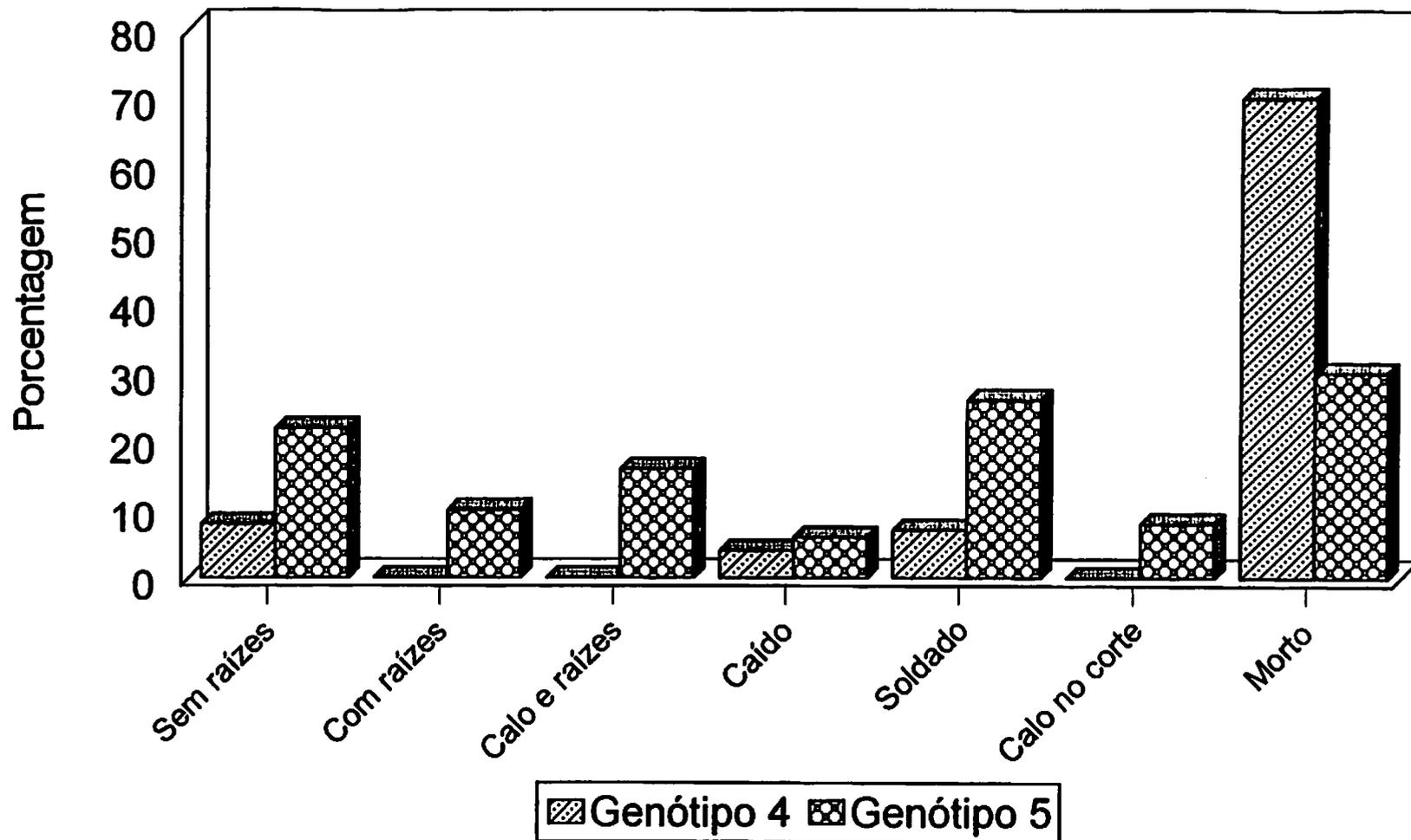


FIGURA 4. Resultado de micro-enzertia dos genótipos 4 e 5 sobre mandioca cv. Cavalo aos 130 dias. CENARGEN/EMBRAPA, Brasília -DF. 1995.

A escolha do corte lateral das mini-estacas para a enxertia foi resultado de pré-testes. A enxertia em fenda no topo, com o enxerto constituído do nó com a gema lateral e uma parte do caule cortada em bisel dos dois lados em forma de cunha, induziu a formação de calo no corte. Com isso, o corte no local da enxertia foi aberto, permitindo que a maioria dos enxertos caísse no meio de cultura, também formando calo. Optando pela micro-enxertia de gemas laterais em fenda lateral, houve uma redução muito grande na formação de calo na região do corte e no número de gemas que caíram no meio de cultura.

O enraizamento dos porta-enxertos foi diretamente relacionado com a soldadura do enxerto ao porta-enxerto, apesar de nem todas as micro-estacas que tinham o enxerto soldado apresentarem raízes aos 130 dias, quando foi feita a avaliação.

Observados sob microscópio, os micro-enxertos soldados pareciam estarem vitrificados, o que muito provavelmente os levou a um estado de dormência.

### 3.6 CONCLUSÕES

O comportamento da *M. glaziovii* em cultura de tecidos está intimamente relacionado com o genótipo. Na multiplicação *in*

vitro, a formação de raízes e/ou calos na base das mini-manivas variou com o genótipo utilizado e, mesmo dentro de um mesmo genótipo, o comportamento não foi uniforme para todos explantes utilizados.

Aos 80 dias após a segunda multiplicação dos genótipos para servirem como enxertos, o genótipo 4 produziu raízes, enquanto que o genótipo 5 não produziu raízes, mas só calos na base dos explantes. Na avaliação aos 130 dias após a operação da micro-enxertia (Figura 4), 16% dos porta-enxertos que teve o genótipo 5 como enxerto, formou raízes ou calo e raízes. Na mesma situação, o genótipo 4 não formou raízes nem calo. Isto leva a concluir: a mesma substância que durante a multiplicação induziu a formação de calo, foi a que induziu os porta-enxertos a emitir raízes e calo.

Não foi possível estabelecer a razão pela qual as gemas laterais de *M.glaziovii* não se desenvolveram quando enxertadas sobre a cultivar de mandioca Cavalo, apesar de estarem soldadas, após 130 dias da operação de micro-enxertia. A vitrificação observada pode ter sido uma das razões pelas quais o enxerto entrou em estado de dormência. Também, devido à capacidade que possui tanto a *M.glaziovii* como a *M.esculenta* de produzirem látex, pode-se cogitar que durante a operação da enxertia tenha havido vedação dos vasos (xilema e floema) por essa substância,

não permitindo uma comunicação perfeita dos vasos, mas possibilitando a sobrevivência da gema lateral alimentada pelo tecido de cicatrização.

CAPITULO 4

4 EMBRIOGENIA SOMÁTICA EM *Manihot glaziovii*

#### 4.1 INTRODUÇÃO

Devido à grande dificuldade de manter *ex situ* amostras populacionais das diferentes espécies de *Manihot*, uma grande ameaça de perda de alelos paira sobre essas espécies. A *M. glaziovii*, espécie utilizada em programas de melhoramento genético da mandioca em várias partes de mundo e explorada extrativamente como produtora de látex, vem sendo sistematicamente destruída na sua área de distribuição, o Nordeste do Brasil. Dois fatores têm contribuído para essa destruição: sua madeira tem sido usada na confecção de tamancos e a crença comum entre os agricultores daquela região que se trata de uma planta tóxica aos animais domésticos. Soares (1989) não comprovou essa toxicidade e recomenda a planta como forragem para ruminantes.

Em diferentes partes do mundo, trabalhos que utilizam a *M. glaziovii* como progenitor no melhoramento genético da mandioca visando conferir resistência as doenças, mostram que essa espécie é um repositório genético de grande importância para programas de produção de linhagens pré melhoradas dessa cultura. Por isso ela deve ser resgatada, conservada e caracterizada, o que exige plantas vivas *ex situ*, sendo a sua multiplicação clonal muito importante. Uma das maneiras que essa multiplicação poderia ser realizada seria através da embriogenia somática.

Separadamente, Steward e Reinert, em 1958, foram os primeiros a observar a formação e desenvolvimento de embriões somáticos em cultura de tecidos de cenoura, cujo explante inicial foi raiz armazenadora. A embriogênese somática ou assexual normalmente é desenvolvida na natureza a partir de células que não sofreram a fusão de gametas e, em algumas espécies vegetais, a partir de células do nucelo e do integumento da semente. A ocorrência da embriogênese somática naturalmente é de maneira geral restrita ao tecido de dentro do ovário. A indução de embriogenia somática artificialmente foi conseguida inicialmente com a adição de água de coco ao meio de cultura (Ammirato, 1983).

Segundo Szabados, Hoyos e Roca (1987), a embriogenia somática e a manutenção da capacidade embriogênica pelo cultivo continuado de embriões somáticos, permitiriam aumentar o número de indivíduos de um mesmo genótipo. Assim, dependendo da estabilidade genética, essa metodologia poderia possibilitar uma multiplicação rápida da cultura e a produção de um grande número de embriões somáticos partindo de um único genótipo (Henshaw, 1989; Matsumoto et al., 1991 e Raemakers, 1993). Para Ammirato (1986), a propagação de plantas em larga escala é uma das mais promissoras aplicações da embriogenia somática.

O interesse principal da embriogenia somática em *M.glaziovii* é a multiplicação do genótipo para a obtenção de um número suficiente de indivíduos, que pudessem ser levados para o campo para sua caracterização e utilização como progenitores em programa de produção de linhagens pré melhoradas. O desenvolvimento dessa técnica possibilitaria também futuros trabalhos de biotecnologia em transformação de plantas, aproveitando as características desejáveis, que seriam incorporadas à mandioca e, ainda, trabalhos de melhoramento genético dessa espécie visando à produção de látex como exploração econômica.

#### 4.2 REFERENCIAL TEÓRICO

A embriogênese em mandioca foi relatada pela primeira vez em 1982 por Stamp e Henshaw citado por Raemakers (1993). Em dois procedimentos, embriões somáticos foram induzidos de explantes constituídos de embriões zigóticos e de folhas jovens de mandioca.

Pelo uso de técnicas biotecnológicas, a regeneração de plantas pode ser realizada de duas maneiras distintas: embriogênese e organogênese. A embriogênese somática é o processo no qual surge do explante uma estrutura bipolar através de uma série de estágios semelhantes ao desenvolvimento de um embrião

zigótico. Já a organogênese é o processo no qual uma estrutura unipolar é formada tendo uma origem multicelular. Tanto na embriogênese somática como na organogênese a estrutura regenerada pode ser de maneira direta do explante cultivado ou indireta do calo formado do explante por indução de substâncias adicionadas ao meio de cultura utilizado (Raemakers, 1993). Recentemente tem sido reportados procedimentos tanto para embriogênese somática como organogênese em mandioca. Porém, a embriogênese somática tem sido descrita com mais freqüência para pelo menos 15 genótipos diferentes e a organogênese tem sido reportada com menor freqüência e somente para um número restrito de genótipos (Raemakers, 1993). Técnicas de regeneração adventícia de mandioca são de fundamental importância para sua multiplicação assexual, que aliada ao melhoramento genético utilizando de técnicas biotecnológicas, devem ser os primeiros passos quando o objetivo principal é a transformação de plantas (Mathews et al., 1993; Raemakers, 1993; Stamp e Henshaw, 1987a).

A resposta do explante à indução da embriogénia somática pode ser modificada como resultado de alterações ambientais (Ammirato, 1986), porém, a eficiência da embriogénia somática não depende somente das condições de cultivo, mas principalmente do tecido usado como explante (Lindsey e Topping, 1993). Em mandioca têm sido conseguidos embriões somáticos partindo de diferentes explantes juvenis como: cotilédone, eixo

zigótico. Já a organogênese é o processo no qual uma estrutura unipolar é formada tendo uma origem multicelular. Tanto na embriogênese somática como na organogênese a estrutura regenerada pode ser de maneira direta do explante cultivado ou indireta do calo formado do explante por indução de substâncias adicionadas ao meio de cultura utilizado (Raemakers, 1993). Recentemente tem sido reportados procedimentos tanto para embriogênese somática como organogênese em mandioca. Porém, a embriogênese somática tem sido descrita com mais freqüência para pelo menos 15 genótipos diferentes e a organogênese tem sido reportada com menor freqüência e somente para um número restrito de genótipos (Raemakers, 1993). Técnicas de regeneração adventícia de mandioca são de fundamental importância para sua multiplicação assexual, que aliada ao melhoramento genético utilizando de técnicas biotecnológicas, devem ser os primeiros passos quando o objetivo principal é a transformação de plantas (Mathews et al., 1993; Raemakers, 1993; Stamp e Henshaw, 1987a).

A resposta do explante à indução da embriogênese somática pode ser modificada como resultado de alterações ambientais (Ammirato, 1986), porém, a eficiência da embriogênese somática não depende somente das condições de cultivo, mas principalmente do tecido usado como explante (Lindsey e Topping, 1993). Em mandioca têm sido conseguidos embriões somáticos partindo de diferentes explantes juvenis como: cotilédone, eixo

de embrião zigótico e lóbulo de folhas jovens (Szabados, Hoyos e Roca, 1987). Foi observado que à medida que os tecidos dos explantes amadurecem e se diferenciam, fica reduzida a capacidade morfogênética dos mesmos. Explantes de folhas de mandioca completamente expandidas *in vitro* e maiores que 10mm não regeneraram embriões somáticos (Stamp, 1987; Stamp e Henshaw 1987a; Szabados, Hoyos e Roca, 1987).

Em mandioca, as fases do desenvolvimento direto de embriões somáticos secundários são muito semelhantes às fases de formação direta dos embriões somáticos a partir dos embriões zigóticos. Nesses eventos, que resultaram na iniciação dos embriões somáticos em ambos sistemas de regeneração, foram envolvidos somente tecidos meristemáticos organizados. Essa condição pode favorecer a estabilidade genética da regeneração, permitindo a multiplicação de determinado genótipo. Dessa forma, é preferível que a regeneração dos embriões somáticos seja realizada de maneira que a capacidade morfogênética seja conservada, sem a formação de calo embriogênico (Stamp e Henshaw 1987b).

Na embriogenia somática de mandioca, maior frequência da formação de embriões tem acontecido em meio MS básico (Murashige e Skoog, 1962) com elevada concentração da auxina 2,4-D (20 $\mu$ mol). Também, baixa concentração de 2,4-D (0,05 $\mu$ mol) e

adição da citocinina BAP ( $0,5\mu\text{mol}$ ) ao meio de cultura fez com que houvesse desenvolvimento de embriões somáticos (Roca, 1984). Embriões somáticos foram também produzidos quando os explantes constituídos de folhas foram cultivados no esquema de dois estágios. No primeiro estágio, os explantes foram cultivados por 20 dias em meio MS suplementado com 2,4-D na concentração de 2 a  $12\text{mg.l}^{-1}$ , antes de serem transferidos para meio MS suplementado com 2,4-D na concentração de  $0,01\text{mg.l}^{-1}$  e BAP na concentração de  $0,1\text{mg.l}^{-1}$ . Foram utilizados vários tipos de explantes de dois tipos de plantas: cultura de plântulas *in vitro* e de plantas cultivadas em casa de vegetação. O meio de cultura foi suplementado com 2,4-D e a embriogênese somática aconteceu de forma similar para os diversos tipos de explantes obtidos dos dois tipos de plantas. Os lóbulos foliares, que se mostraram mais embriogênicos, foram os obtidos das folhas número 4 e 5 no tamanho de 2 a 4mm de comprimento. Quando a auxina 2,4-D foi substituída pela ANA no primeiro estágio, os explantes lóbulos de folhas de plantas da casa de vegetação não apresentaram capacidade para o desenvolvimento da embriogênese somática (Stamp e Henshaw, 1987a).

Mathews et al. (1993) usando lóbulos de folhas jovens de mandioca em meio MS suplementado com 2,4-D na concentração de  $4\text{mg.l}^{-1}$ , conseguiram embriões somáticos primários, que foram utilizados na indução de embriões somáticos secundários. Dessa

forma foram produzidos em 52 dias uma média de 14,7 embriões por lóbulo de folha induzido, dos quais resultaram em 8,8 plântulas por explante. No entanto, apesar do número de embriões somáticos aumentar a cada colheita, a porcentagem de germinação e a regeneração das plantas decresceram a cada ciclo sucessivo de multiplicação. Foi possível a geração de 100 a 200 aglomerados de embriões somáticos por lóbulo de folha induzido em um período de 4 meses. Além disso, embriões somáticos foram obtidos diretamente de explantes cultivados em meio de cultura suplementado com 2,4-D na dosagem que variou de 4 a  $16\text{mg.l}^{-1}$ .

Partindo de folhas jovens de plântulas cultivadas *in vitro*, embriões somáticos de vários clones de mandioca foram obtidos no IITA na Nigéria, em meio líquido MS contendo 5 ou  $10\text{mg.l}^{-1}$  de picloram (ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolinico) cultivados em agitação contínua. Com essa técnica foi possível a obtenção de 10 a 15 embriões somáticos de cada explante (Ng, 1992).

A embriogênese somática foi induzida utilizando-se ápice e folhas imaturas de cultivo *in vitro* de mandioca como explantes. A formação de calo foi mais intensa em meios de cultura suplementados com elevada dose de BAP em combinação com 2,4-D (Szabados, Hoyos e Roca, 1987).

Utilizando-se explantes de caule, pecíolo, folha ou mesmo pedaços de raízes de mandioca, as auxinas 2,4-D e ANA se mostraram mais eficientes que o AIA na indução da formação de calo no seu crescimento e manutenção. Um crescimento mais rápido do calo pode ser obtido combinando 2,4-D nas concentrações de 5,0 a 13,0  $\mu\text{mol}$  com KIN ou BAP em concentrações que variaram de 2,0 a 8,0  $\mu\text{mol}$ . Na manutenção do calo, a combinação de auxina com citocinina no meio de cultura é condição de fundamental importância (Roca, 1984). Em estudos visando determinar as melhores concentrações de 2,4-D para a indução de calogênese como um pré-requisito para morfogênese e hibridização somática foi usado o meio MS adicionado de ácido nicotínico ( $0,1\text{mg.l}^{-1}$ ),  $\text{AG}_3$  ( $0,001\text{mg.l}^{-1}$ ) e BAP ( $0,005\text{mg.l}^{-1}$ ) e o 2,4-D nas concentrações 0,001, 0,01, 0,1 e  $1\text{mg.l}^{-1}$ . As duas concentrações mais elevadas de 2,4-D deram melhores resultados na formação de calo e as duas concentrações menores resultaram no desenvolvimento de muito pouco tecido, que podia ser identificado como calo. Como explantes, foram usados segmentos de folhas jovens de plantas de mandioca cultivadas em casa de vegetação (Almeida, Huang e Waddle, 1984).

Stamp e Henshaw (1987a) utilizando cotilédone de sementes maduras de mandioca em meio MS com adição de ANA, não conseguiram a indução da embriogenia somática. Liu e Chen (1978) utilizando anteras de mandioca pré tratadas a  $4^\circ\text{C}$  em tempo que

variou de 4 a 24 horas, induziram a calogênese e organogênese pela utilização de uma combinação de 4,44  $\mu\text{mol}$  de BAP e 4,52  $\mu\text{mol}$  de 2,4-D em meio com sais de MS, vitaminas de B5 (Gamborg, Miller e Ojima, 1968) e 10% de água de coco. Não houve a embriogénia somática e quando ao meio foi adicionado BAP nas concentrações que variaram de 4,44 a 8,88  $\mu\text{mol}$  houve a formação de raízes e na dosagem mais elevada em combinação com 10,74  $\mu\text{mol}$  de 2,4-D foram formados calos clorofilados.

Foi constatada uma especificidade genotípica muito grande na indução da embriogénia somática em mandioca havendo diferenças de respostas das diferentes cultivares na formação de embriões somáticos (Szabados, Hoyos e Roca, 1987 e Raemakers, 1993).

Szabados, Hoyos e Roca (1987) observaram que não houve evolução da embriogénia somática nas espécies *M. cecropiaefolia* e *M. aescutifolia* utilizando os mesmos meios para indução em mandioca e usando como explantes folhas e pontas de brotos.

#### 4.3 HIPÓTESE

Se pela utilização de indutores de embriogénia somática em *M. glaziovii* forem conseguidos embriões que darão origem a um

grande número de plantas, então será possível sua conservação *in vitro* e, a campo, sua utilização em cruzamentos para a produção de linhagens pré melhoradas.

#### 4.4 MATERIAL E MÉTODOS

Utilizando os mesmos procedimentos descritos no Capítulo 2, foi realizado teste de tetrazólio em uma amostra de 50 sementes, do lote obtido da única árvore de *M.glaziovii* existente no campus da UFPA, originada de sementes conseguidas do IAC em Campinas-SP. Os resultados revelaram que 18% dos embriões tinha a plúmula e a radícula mortas, pois só a parte central coloriu-se.

Uma amostra de 100 sementes, após esterilização com hipoclorito de sódio a 2% por 20 minutos, teve seus embriões extraídos com o auxílio de um alicate e anteparo de ferro de diâmetro pouco inferior à largura transversal das sementes para que elas não fossem quebradas além do necessário, permitindo a extração dos embriões sem danificá-los. A operação de extração dos embriões foi realizada em câmara de fluxo laminar contínuo marca Veco com o auxílio de pinças e bisturis.

O meio de cultura básico utilizado para o cultivo desses embriões foi o MS completo com 2% de sacarose e 0,6% de

agar e pH de 5,7, em tubos de ensaio de 25x150mm, com 10ml do meio por tubo, vedados com tampa plástica opaca e solidificado sem inclinação. Após serem excisados e inoculados, os embriões foram cultivados em câmara de crescimento do Laboratório de Cultura de Tecidos da UFLA, com as seguintes condições ambientais: temperatura de 25°C, 16 horas de fotoperíodo e intensidade luminosa média de 3000 lux equivalentes a 56,52  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  de fluxo de ftons fotossintéticos.

Trinta dias após a inoculação, embriões zigóticos com as plúmulas e as radículas mortas tiveram os hipocótilos desenvolvidos em uma estrutura cilíndrica clorofilada no tamanho de aproximadamente 8mm. Essas estruturas foram utilizadas como explantes para a indução de embriogenia somática. Em câmara de fluxo laminar contínuo, cada hipocótilo foi seccionado em três partes de aproximadamente 3mm, que foram inoculadas ao meio de cultura MS básico solidificado com inclinação de 45°, com a finalidade de aumentar a área de contato da superfície do meio de cultura. Os tratamentos constituíram-se em um fatorial completo de duas fontes de citocininas e o controle versus três concentrações de auxina. As fontes de citocininas foram BAP e KIN na concentração padrão de 0,1mg.l<sup>-1</sup> e as concentrações da auxina 2,4-D foram 1, 2 e 4mg.l<sup>-1</sup> em meio de cultura básico. Para cada tratamento foram utilizadas seis repetições; cada repetição foi constituída de um tubo de ensaio

com um explante. Após a inoculação, os tubos foram mantidos no escuro, em temperatura ambiente de 25°C, por 10 dias. Após esse período, os explantes foram transferidos para luz, em regime de 16 horas de fotoperíodo, intensidade luminosa média de 3000 lux ( $56,52 \mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) e temperatura de 25°C.

Foram realizadas avaliações periódicas desde o início da indução da embriogenia somática, com determinação da porcentagem de calos formados e sua aparência. Aos 120 dias foi determinado, em balança analítica, o peso fresco dos calos. Nessa operação, como os calos foram cultivados em meio sólido, todo cuidado foi tomado para retirar qualquer quantidade de meio de cultura que por acaso estivesse aderido ao calo. Depois de pesados, os calos foram transferidos para saquinhos de papel e levados à estufa a 50°C por 72 horas para determinação do peso seco.

#### 4.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Aos 20 dias após a repicagem e após os explantes terem ficado os primeiros 10 dias no escuro, a formação dos calos pôde ser notada com mais evidência. Ao longo do experimento foi possível constatar que a auxina 2,4-D combinada com  $0,1\text{mg.l}^{-1}$  de citocinina fez com que o desenvolvimento dos calos fosse mais

uniforme, independentemente da concentração do 2,4-D e da citocinina usada.

Os calos se mostraram hialinos e friáveis, iniciando seu desenvolvimento na região cortada dos explantes, que foram absorvidos com o crescimento dos calos. No início do experimento a cor dos calos foi branca leitosa. Com o passar do tempo a cor foi se modificando e ao fim dos 120 dias, 18% deles ainda apresentava a cor branca leitosa, 12% modificou-se para creme claro e 70%, para creme escuro. O controle apresentou somente calos na cor creme escura aos 120 dias.

Aos 120 dias da repicagem, foi verificado que a utilização de 2,4-D, sem a interação de citocininas, teve um efeito deletério relacionado com o aumento das dosagens. A menor dosagem ( $1,0\text{mg.l}^{-1}$ ) utilizada apresentou um melhor desempenho quanto ao número de calos desenvolvidos. Porém, o resultado da indução de calo, utilizando só 2,4-D, foi inferior comparado com as combinações da auxina, tanto com KIN como com BAP.

A Figura 5 mostra as comparações dos diferentes tratamentos na porcentagem de calos formados aos 20 dias e aos 120 dias. Pôde ser visto que não houve diferença entre a utilização das duas citocininas em combinação com o 2,4-D. A utilização de qualquer uma delas foi fundamental para a

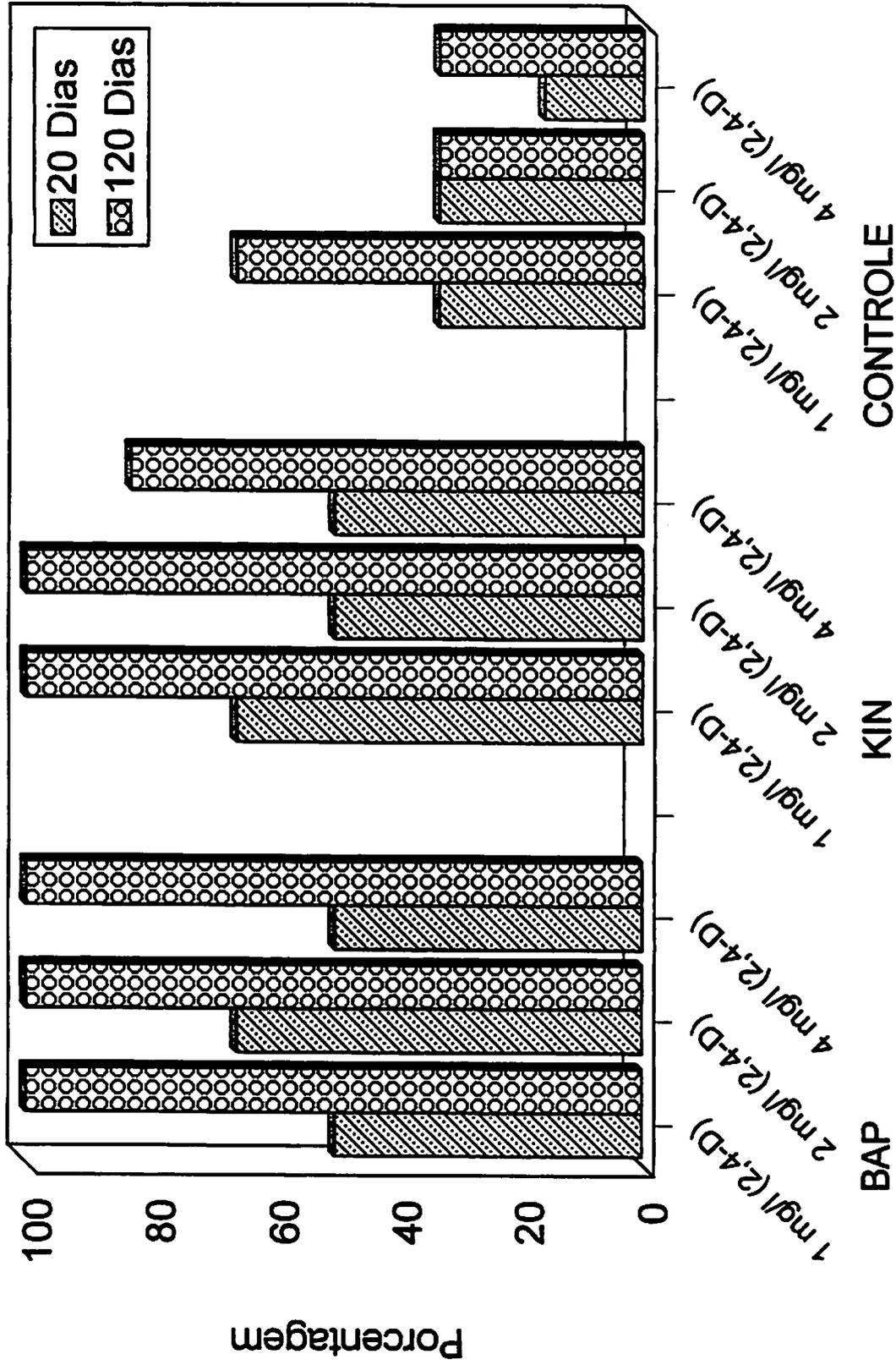


FIGURA 5. Calos produzidos nos tratamentos de indução aos 20 e 120 dias da inoculação de parte do hipocótilo de *M. glaziovii*. UFLA. Lavras - MG. 1994.

calogênese. O controle foi sempre inferior às combinações em todas concentrações. Houve um efeito deletério do aumento da concentração do 2,4-D para peso fresco e peso seco dos calos para todos os tratamentos (Figuras 6 e 7). O peso fresco dos calos foi sempre maior quando foi utilizada a menor dose de 2,4-D (Figura 6). Para peso seco esse fato não ficou tão evidente a não ser pelo fato do controle ter sido sempre inferior em comparação com as combinações de 2,4-D com as duas citocininas usadas (Figura 7).

Quanto ao teor de umidade dos calos, os valores foram muito semelhantes para todos tratamentos, variando de 97 a 99%.

Tentativas de indução de embriogênese somática de duas outras espécies parentes da mandioca, *M. cecropiaefolia* e *M. aescutifolia*, se mostraram infrutíferas (Szabados, Hoyos e Roca, 1987). Provavelmente o insucesso tenha sido devido a dois fatores mais importantes: por se tratar de espécie silvestre com número reduzido de genótipos disponíveis para fornecer explantes e a especificidade genotípica da indução da embriogenia somática.

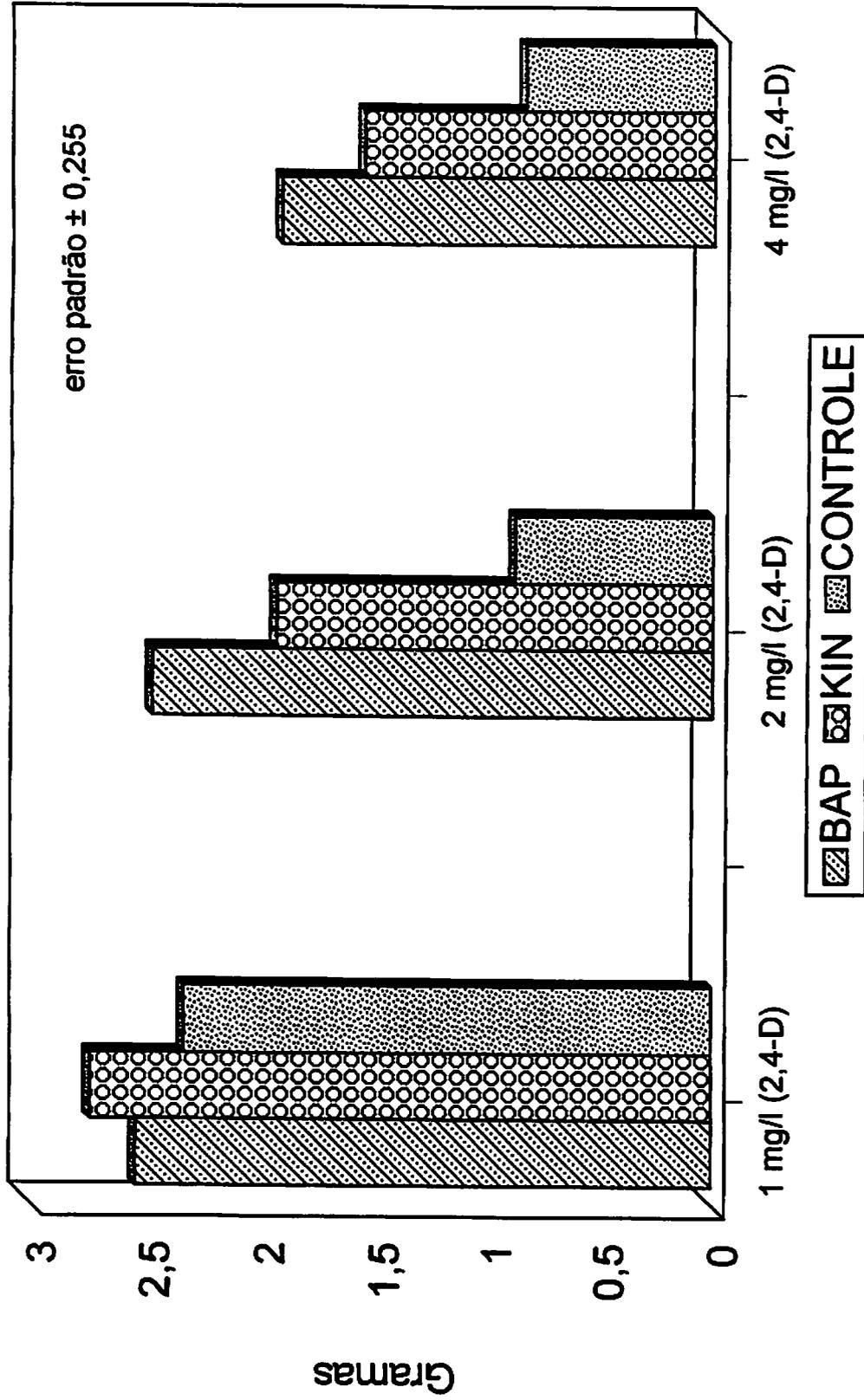


FIGURA 6. Peso fresco de calos induzidos de parte do hipocótilo de *M. glaziovii* em gramas aos 120 dias. UFLA, Lavras - MG. 1994.

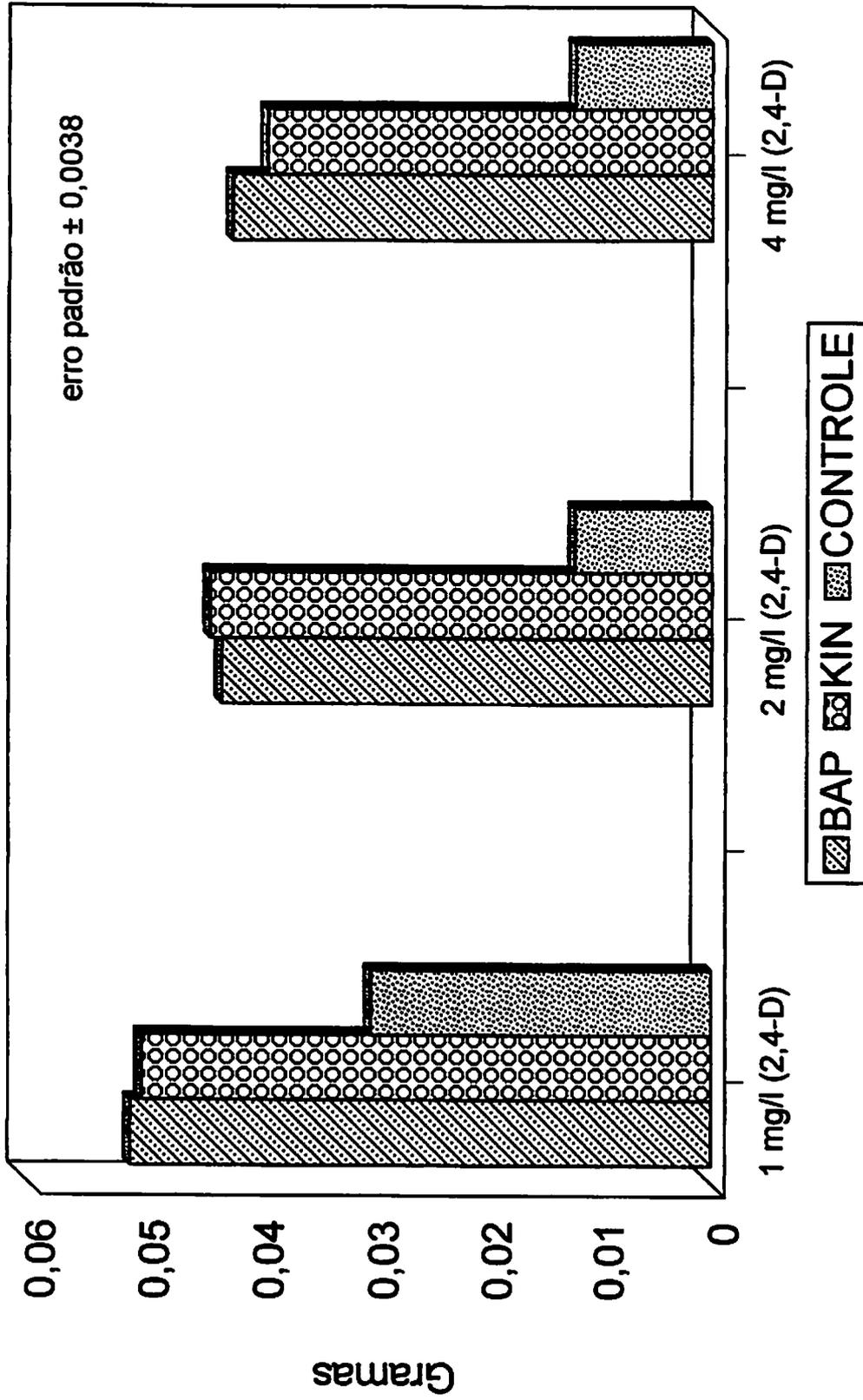


FIGURA 7. Peso seco de calos induzidos de parte do hipocótilo de *M. glaziovii* em gramas aos 120 dias. UFPA, Lavras - MG. 1994.

#### 4.6 CONCLUSÕES

Na indução direta de embriogenia somática em *M.glaziovii* houve a formação de calos sem o aparecimento de embriões somáticos pela embriogênese (formação de estruturas bipolares) ou pela organogênese (formação de estruturas monopolares).

Os efeitos da concentração da auxina 2,4-D e o uso conjunto das citocininas KIN e BAP são independentes sobre o peso fresco dos calos, isto é, o 2,4-D teve um efeito constante sobre peso fresco para todas as fontes de citocininas, inclusive para o controle. Esse efeito foi detectado como do tipo linear decrescente.

Para indução de calos em *M.glaziovii* utilizando-se como explantes, partes do hipocótilo de embriões que não germinaram quando cultivados em meio MS, houve necessidade de utilização de uma citocinina combinada com a auxina 2,4-D. Na indução da calogênese, tanto KIN como BAP teve efeito quando usadas em combinação com o 2,4-D, no entanto foi necessária a presença de uma delas para obter um rendimento maior de calo. A maior produção de calo aconteceu quando a combinação das citocininas

foi na menor dosagem de 2,4-D, mostrando que em concentrações elevadas o 2,4-D foi deletério à calogênese em *M.glaziovii*.

Esses resultados de indução de calogênese em *M.glaziovii* estão de acordo com os que Roca (1984) encontrou trabalhando com *M.esculenta*, quando constatou que o calo formado era induzido pela utilização do 2,4-D, combinado com KIN ou BAP no meio de cultura.

A técnica biotecnológica de indução de embriogênese somática pode ser usada para aumentar o número de plântulas originadas assexualmente de um mesmo genótipo. A indução de embriogênese somática usando-se como explantes partes de hipocótilos desenvolvidos de embriões zigóticos, que não germinaram em meio MS básico adicionado de 2,4-D, BAP e KIN, resultou na calogênese com a formação de massa de calo sem a constatação da embriogenia somática, ao final dos 120 dias da inoculação.

## RECOMENDAÇÕES

Atualmente muitas pesquisas de melhoramento em mandioca estão direcionadas por metodologias que envolvem tecnologia de ponta como: produção de haplóides, mutação *in vitro* via irradiação, transformação de plantas e seleção para resistência a doenças *in vitro*. No entanto, o repositório genético de *Manihot* usando-se de processos convencionais muito mais baratos, ainda não foi completamente explorado. A conservação dos repositórios genéticos da mandioca, em qualquer nível, deve ser uma preocupação constante daqueles que trabalham com recursos genéticos dessa cultura. A utilização desse germoplasma possibilita a incorporação de características desejáveis como resistência a doenças e pragas e modificação da arquitetura da planta de mandioca. Além disso, não se pode esquecer a importância das raízes dessa planta para alimentação de cerca de 500 milhões de pessoas em países em desenvolvimento nos trópicos.

A utilização da técnica do cultivo de embriões zigóticos de sementes de *M. glaziovii* foi eficaz na temperatura de 30°C usando-se meio nutritivo WPM com adição de 0,3% p/v de carvão ativado. Essa técnica pode ser usada para outras espécies do gênero *Manihot* sempre que sementes forem obtidas de expedição de coleta, oferecendo uma maior segurança na sua germinação e obtenção de plantas. A técnica de cultivo de embriões originados de cruzamentos interespecíficos que possuam barreiras de incompatibilidade possibilita resgatar as plantas híbridas.

Utilizando-se dessa técnica pode-se recuperar embriões de *Manihot* que tenham sido criopreservados em nitrogênio líquido a  $-196^{\circ}\text{C}$ .

A micro-enxertia em *M.glaziovii* exige pesquisas adicionais para torná-la mais eficiente com a recuperação de plantas completas. Essa técnica é uma alternativa no resgate de embriões de sementes híbridas e de sementes coletadas, possibilitando também o resgate de embriões somáticos desenvolvidos pela organogênese e produzindo estruturas monoplóides com o desenvolvimento de brotações sem raízes. Outra aplicação será na recuperação de embriões criopreservados, quando a mini-estaca porta-enxerto funciona como suporte e "meio nutritivo". Também na obtenção de plântulas *in vitro*, utilizando-se de explantes obtidos no campo, de populações autóctones ou de brotações de estacas coletadas, permite seu desenvolvimento e diminui o risco de contaminação, pois o explante não ficará em contato direto com o meio de cultura. A aplicação dessa técnica na conservação de germoplasma *in vitro* exigirá periódicas micro-enxertias, quando o meio de cultura se mostrar esgotado ou as plântulas ficarem depauperadas. Apesar de muito trabalhosa, essa técnica parece ser a única solução para preservar algumas espécies de *Manihot*, até que se desenvolvam protocolos específicos para seu cultivo *in vitro*.

Devido à especificidade genotípica na produção de embriões somáticos pela indução artificial *in vitro*, um grande número de genótipos por espécie deverão ser trabalhados para o aprimoramento dessa técnica ou para o desenvolvimento de novos protocolos adaptados às espécies silvestres de *Manihot*. A produção de grande número de embriões somáticos por indução, permitirá estudos de conservação de germoplasma em criopreservação, desenvolvimento de sementes artificiais e a obtenção de plantas adultas no campo.

Muitas das espécies de *Manihot* estão ameaçadas de extinção em seu habitat natural devido à expansão da fronteira agrícola aliada à destruição deliberada das plantas, seja para utilizar sua madeira (confecção de tamancos) ou pelo receio de que se trata de uma planta tóxica aos animais domésticos. Muitas das espécies de *Manihot* ocorrem endemicamente no bioma cerrado onde têm acontecido grandes mudanças nos ecossistemas, com perdas de muitas populações de espécies desse gênero. Em muitos lugares, espécies de *Manihot* só podem ser encontradas dentro da faixa de domínio das rodovias.

O desenvolvimento de diferentes técnicas de propagação dessas espécies possibilitará a conservação do germoplasma, sua caracterização, sua avaliação e utilização em programas para

produção de linhagens pré melhoradas para uso em programas de melhoramento genético da mandioca.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- ABRAHAM, A. Breeding of tuber crop in India. Indian Journal of Genetics and Plant Breeding, New Delhi v.17, p.212-217, 1957.
- ALLARD, R.W. Principles of plant breeding. New York: John Wiley, 1960. Cap.34, p. 434-443.
- ALLEM, A.C. *Manihot esculenta* is a native of the Neotropics. Plant Genetic Resources Newsletter, Roma, n.71, p.22-23, 1987.
- ALLEM, A.C. Notas taxonômicas e novos sinônimos em espécies de *Manihot* II (*Euphorbiaceae*). Revista Brasileira de Biologia, Rio de Janeiro, v.38, n.3, p.721-726, 1978.
- ALLEM, A.C. The origin of *Manihot esculenta* Crantz (*Euphorbiaceae*). Genetic Resources and Crop Evolution, Dordrecht, n.41, p.133-150, 1994.
- ALLEM, A.C.; GOEDERT, C.O. Formação da base genética e manejo dos recursos genéticos de mandioca: o caso do Brasil. In: HERSHEY, C.H. Mejoramiento genético de la yuca en America Latina. Cali:CIAT, 1991. p. 125-161.
- ALMEIDA, F.C.G.; HUANG, F.H.; WADDLE, B.A. Callus formation from leaves of cassava, *Manihot esculenta* Crantz. Ciência Agronômica, Fortaleza, v.15, n.1/2, p.41-43, 1984.
- AMMIRATO, P.V. Embryogenesis. In: EVANS, D.A.; SHARP, W.R.; AMMIRATO, P.V.; YAMARA, Y. Handbook of plant cell culture: Techniques for propagation and breeding. New York: MacMillan, 1983. v.1, p.83-123.
- AMMIRATO, P.V. Organizational events during somatic embryogenesis. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON PLANT TISSUE AND CELL CULTURE, 6, Minnesota, 1986. University of Minnesota, 1986. p.57-81.
- ASIEDUR, R.; HAHN, S.K.; BAI, K.V.; DIXON, A.G.O. Introgression of genes from wild relatives into cassava. In: TRIENNIAL SYMPOSIUM AT THE INTERNATIONAL SOCIETY FOR TROPICAL ROOT CROPS, 4, Africa Branch, 1989. Proceedings... Africa Branch, 1992. p.89-91.
- BARRIOS, E.A.; BRESSANI, R. Chemical compositions of the root and leaf in some varieties of *Manihot*. Turrialba, Turrialba, v.17, p.314-320, 1967.
- BIGGS, B.J.; SMITH, M.K.; SCOTT, K.J. The use of embryo culture for the recovery of plants from cassava (*Manihot esculenta* Crantz) seeds. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, The Hague, v.6, p.229-234, 1986.

- BOLHUIS, G.G. Intra and interespecific crosses in the genus *Manihot*. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON TROPICAL ROOT CROPS, 1, 1967, St. Augustine, Trinidad. Proceedings... St. Augustine: University of West Indies, 1969. v.1. p. 81-88.
- BOLHUIS, G.G. A survey of some attempts to breed cassava varieties with a high content of proteins in the roots. Euphytica, Wageningen, v.2, p.107-112, 1953.
- BRIDGEN, M.P. A review of plant embryo culture. HortScience, Madison, v.29, n.11, p.1243-1246, 1994.
- BURDON, J.J.; JAROS A.M. Wild relatives as sources of disease resistance. In: BROWN, A.H.D.; FRANKEL, O.H.; MARSHALL, D.R.; WILLIAMS, J.T. The use of plant genetics resources. Cambridge:Cambridge University, 1989. p.280-296.
- CASTAÑO, M.L.; MORNAN, K.; PLAZAS, J.; ROCA, W.M. Development of methodologies for the isolation and culture of cassava imature pollen and zygotic embryos. In: INTERNATIONAL SCIENTIFIC MEETING OF CASSAVA BIOTECHNOLOGY NETWORK, 1, 1993. Proceedings... Cali:CIAT, 1993. p.185-189.
- CENTRO INTERNACIONAL DE AGRICULTURA TROPICAL. Biotechnology Research Unit, 1988-1992: Annual Report. Cali, 1993. 277p.
- CENTRO INTERNACIONAL DE AGRICULTURA TROPICAL. Guia de estudio - morfologia de la planta de yuca. Cali, 1981. 44 p.
- CHAPMAN, C.G.D. Collection strategies for the wild relatives of fied crops. In: BROWN, A.H.D.; FRANKEL, O.H.; MARSHALL, D.R.; WILLIAMS, J.T. The use of plant genetics resources. Cambridge:Cambridge University, 1989. p. 263-279.
- CHAVÉZ, R. Especies silvestres de Manihot: un recurso valioso. Yuca Boletín Informativo, Cali, v.14, n.1, p.2-5, 1990.
- COCK, J.H. Cassava: new potential for a neglected crop. Colorado:Wetview, 1985. 191p.
- COLLINS, G.B.; GROSSER, J.W. Culture of embryos. In: VASIL, I.K. Cell culture and somatic cell genetics of plants. Orlando: Academic, 1984. v.1, Cap. 30, p.241-168.
- COURS, G. Memories de l'Institut Scientifique de Madagascar. 1951. p.203-400. (Serie B, Tome III, Fascicule 2).
- COURSEY, D.G.; HALLIDAY, D. Cassava as animal feed. Outlook on Agriculture, Elmsford, v.8, n.1, p.10-14, 1974.

- DHARMAPUTRA, T.S.; BRUIJN, G.H. The mukibat system of cassava production. In: SYMPOSIUM OF THE INTERNATIONAL SOCIETY FOR TROPICAL ROOT CROPS, 4., Cali, IDRC, 1977. p.94-98. (IDRC-080e).
- EKANDEM, M.J. Cassava research in Nigeria before 1967. Ibadan: Federal Department of Agricultural Reserch, 1970. 16p. (memorando, 103, mimeografado).
- ESCOBAR, R.H.; ROCA, W.M.; MAFLA, G. Cryopreservation of cassava shoot tips. In: INTERNATIONAL SCIENTIFIC MEETING OF CASSAVA BIOTECHNOLOGY NETWORK, 1., 1993. Proceedings... Cali:CIAT, 1993. p.116-121.
- ESQUINAS-ALCAZAR, J.T. Los recursos fitogeneticos una inversion segura para el futuro. Espanha, Madrid: IBPGR/INIA, 1981. 44p.
- ESQUINAS-ALCAZAR, J.T. Recursos genéticos vegetais: base de la seguridad alimentaria. Revista Ceres, Viçosa, v.20, n.4, p.39-45, 1987.
- FIGUEIREDO, R.W. de Histórico da maniçoba no Brasil, potencialidade, multiplicação e produção. In: ENCONTRO NORDESTINO DE MANIÇOBA, 1, Carpina, PE. 1989. Anais... Carpina, 1989. p. 29-57. (Coleção Mossoroense, Série C, v. 469).
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Production Yearbook, 1988. Roma, 1989.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Production Yearbook, 1992. Roma, 1993.
- FORD-LLOYD, B.; JACKSON, M. Plant genetic resources: an introduction to their conservation and use. Baltimore: Edward Arnold, 1986. 152p.
- FRANÇA NETO, J. de B.; PEREIRA, L.A.G.; COSTA, N.P. da; KRZYZANOWSKI, F.C.; HENNING, A.A. Melhoria do teste de tetrazólio em semente de soja. Londrina: EMBRAPA/CNPSo, 1988.58P.
- FREY, K.J. Plant breeding in the seventies: useful genes from wild plant species. Egyptian Journal of Genetics and Cytology, Alexandria, v.5, p.460-482, 1976.
- GAMBORG, O.L.; MILLER, R.A.; OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Experimental Cell Research, New York, v.50, p.151-158, 1968.

- GULICK, P.; HERSHEY, C.H.; ESQUINAS-ALCAZAR, J. Genetic resources of cassava and wild relatives. Roma: BPGR, 1983. 56p. (AGPG:IBPGR/82/111).
- HAHN, S.K.; HOWLAND, A.K. Breeding for resistance to cassava mosaic. In: CASSAVA MOSAIC WORKSHOP, Ibadan, 1972. Proceedings... Ibadan:IITA, 1972. p.37-39.
- HAHN, S.K.; TERRY, E.R.; LEUSCHNER, K.; AKOBUNDU, I.O.; OKALI, C.; LAL, R. Cassava improvement in Africa. Field Crops Research, Amsterdam, v.2, p.193-226, 1979.
- HAILS, C.; WACHTEL, P.S.; CHING, S.K. ; BARKOW, B. The wild supermarket : the importance of biological diversity of food security. Gland, Suíça: WWF, 1990. 33p.
- HAMMOND, A.L. Alcohol: a Brazilian answer to the energy crisis. Science, Washington, v.195, p.564-566, 1977.
- HENSHAW, G.G. In vitro plant regeneration from somatic tissues in cassava. In: Founding Workshop for the Advanced Cassava Research, 1988, Cali, Colombia, 1989. Report... Cali:CIAT, 1989. p. 49-50. (CIAT Working Document, 52).
- HERSHEY, C.H. Cassava germplasm resources. In: HERSHEY, C.H. Cassava breeding: a multidisciplinary review, Proceedings. Filipinas, 1987. p. 1-24.
- HOYT, E. Conserving the wild relatives of crops. Roma.: IBPGR/IUCN/WWF, 1988. 46p.
- HU, C.Y.; FERREIRA, A.G. Cultura de embriões. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas. Brasília: ABCTP, 1990. p. 71-85.
- IWANAGA, M.; SCHMIEDICHE, P. Using wild species to improve potato cultivars. CIP Circular, Lima, v.17, n.2, p.1-7, 1989.
- JENNINGS, D.L. Breeding for resistance to cassava viruses in East Africa. In: CASSAVA MOSAIC WORKSHOP, Ibadan, 1972. Proceedings... Ibadan:IITA, 1972. p.40-42.
- JENNINGS, D.L. Cassava in East Africa. PLUCKNETT, D.L. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON TROPICAL ROOT CROPS, 2., 1970. Proceedings...1970. v.1, p.64-65.
- JENNINGS, D.L. *Manihot melanobasis* Mull.Arg.: a useful parent for cassava breeding. Euphytica, Wageningen, v.8, p.157-162, 1959.

- JONES, W.O. Manioc in Africa. California: Stanford University, 1959. 315p.
- JONES, W.O. Cassava as human food. In: PHILLIPS, T.P. Cassava utilization and potential market. Ottawa: IDRC, 1974. p.5-23.
- JUAREZ, J.; ARREGUI, J.M. DEOGRATIAS, J.M. ; NAVARRO, L. Shoot-tip grafting in vitro in temperate stone fruit trees. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON PLANT TISSUE AND CELL CULTURE, 7., Amsterdam, 1990. Abstracts... Amsterdam: The International Association for Plant Tissue Culture, 1990. p.119.
- KARTHA, K.K. ; GAMBORG, O.L. Elimination of cassava mosaic disease by meristem culture. Phytopathology, St. Paul, v.65, n.7, p.826-828, 1975.
- KARTHA, K.K.; ROCA, W.M. Role of plant biotechnology in crop improvement. In: INTERNATIONAL SCIENTIFIC MEETING OF CASSAVA BIOTECHNOLOGY NETWORK, 1, Cali, 1993. Proceedings... Cali: CIAT, 1993. p.466-476.
- LADIZINSKY, G. Ecological and genetic considerations in collecting and using wild relatives. In: BROWN, A.H.D.; FRANKEL, O.H.; D.R. MARSHALL; WILLIAMS, J.T. The use of plant genetic resources. Cambridge: Cambridge University, 1989. p. 297-305.
- LINDSEY, K.; TOPPING, J.F. Embryogenesis: a question of pattern. Journal of Experimental Botany, London, v.44, n.259, p.359-374, 1993.
- LIU, M.C.; CHEN, W.H. Organogenesis and chromosome number in callus derived from cassava anthers. Canadian Journal of Botany, Ottawa, v.56, p.1287-1290, 1978.
- LLERAS, E. Metodologia apropiada à coleta de germoplasma. In: EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Centro Nacional de Recursos Genéticos. Brasília, DF. Primeiro Curso de Recursos Genéticos realizado de 26/07 a 06/08/1982. Brasília, 1982. 21p.
- MAFLA, G.; ROCA, W.M.; REYES, R.; ROA, J.C.; MUÑOZ, L.; BACA, A.E.; IWANAGA, M. In vitro management of cassava germplasm at CIAT. In: INTERNATIONAL SCIENTIFIC MEETING OF CASSAVA BIOTECHNOLOGY NETWORK, 1, Cali, 1993. Proceedings... Cali: CIAT, 1993. p.168-171.
- MANSON, B. Cassava (tapioca) in Thailand. In: PHILLIPS, T.P. Cassava utilization and potential market. Ottawa: IDRC, 1974. p.53-105

- MATHEWS, H.; SCHOPKE, C.; C HAVARRIAGA, P.; FAUQUET, C. ; BEACHY, R.N. Improvement of somatic embryogenesis and plant recovery in cassava. Plant Cell Reports, New York, v.12, p.328-333, 1993.
- MATSUMOTO, K.; CABRAL, G.B.; TEIXEIRA, J.B.; RECH, E.L. Embriogênese somática a partir de folhas imaturas de mandioca *in vitro*. Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal, Ribeirão Preto, v.3, n.2, p.107-110, 1991.
- MBANASO, E.N.A.; NWACHUKWU, E.C.; ENE, L.S.O. Progress on cassava improvement through biotechnology at the National Root Crop Research Institute, Umudike. In: INTERNATIONAL SCIENTIFIC MEETING OF CASSAVA BIOTECHNOLOGY NETWORK, 1, Cali, 1993. Proceedings... Cali:CIAT, 1993. p.111-115.
- MCCOWN, B.H.; LLOYD, G. Wood plant medium (WPM) - a mineral nutrient formulation for microculture of woody plant species. HortScience, Madison, v.16, n.3, p.89, 1981.
- MOONEY, P.R. O escândalo das sementes; o domínio na produção de alimentos. São Paulo: Nobel, 1987.
- MOREIRA, C.S. ; MOREIRA, S. História da citricultura no Brasil. In: RODRIGUEZ, O.; VIÉGAS, F.; POMPEU Jr., J. ; AMARO, A.A. Citricultura brasileira. 2.ed. São Paulo: Fundação Cargil, 1991. p.1-21.
- MURASHIGE, T.; BITTERS, W.P.; RAGAN, T.S.; NAUER, E.M.; ROISTACHER, C.N. ; HOLLIDAY, P.B. A technique of shoot apex grafting and its utilization towards recovering virus-free *Citrus* clones. HortScience, Madison, v.7, n.2, p.118-119, 1972.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum, Copenhagen, v.15, p.473-497, 1962
- NASSAR, N.M.A. Alguns aspectos sobre o melhoramento genético da maniçoba. In: ENCONTRO NORDESTINO DE MANIÇOBA, 1, Carpina, PE, 1989. Anais... Carpina, PE, 1989. p.9-14. (Coleção Mossoroense, Série C, v.469).
- NASSAR, N.M.A. Conservation of the genetic resources of cassava (*Manihot esculenta*) - determination of wild species localities with emphasis on probable origin. Economic Botany, New York, v.32, p.311-320, 1978a.

- NASSAR, N.M.A. Some further species of *Manihot* with potential value to cassava breeding. Canadian Journal of Plant Science, Ottawa, v.58, p.915-916, 1978b.
- NASSAR, N.M.A. A study of the collection and maintenance of the germplasm of wild cassava, *Manihot* spp. Turrialba, Turrialba, v.29, n.3, p.221-224, 1979a.
- NASSAR, N.M.A. Three Brazilian *Manihot* species with tolerance to stress conditions. Canadian Journal of Plant Science, Ottawa, v.59, p.553-555, 1979b.
- NASSAR, N.M.A. A wild *Manihot* species of Central Brazil for cassava breeding. Canadian Journal of Plant Science, Ottawa, v.58, p.257-261, 1978c.
- NASSAR, N.M.A.; COSTA, C.P. Tuber formation and protein content in some wild cassava (*Mandioca*) species native of central Brazil. Experientia, Basel, SZ, v.30, p.1304-1305, 1977.
- NAVARRO, L.; ROISTACHER, C.N. ; MURASHIGE, T. Effect of size and source of shoot tips on Psorosis-A and Exocortis content of Navel Orange plants obtained by shoot-tip grafting *in vitro*. In: CONFERENCE INTERNATIONAL ORGANIZATION CITRUS VIROLOGY, 7, Riverside, 1976. Proceedings... Riverside: IOCV, 1976. p.194-197.
- NAVARRO, L.; ROISTACHER, C.N. ; MURASHIGE, T. Improvement of shoot-tip grafting *in vitro* for virus-free citrus. Journal of the American Society for Horticultural Science, Mount, v.100, n.5, p.471-179, 1975.
- NESTEL, B. Current utilization and future potential for cassava. In: NESTEL, B.; MacINTYRE, R. Chronic cassava toxicity: Interdisciplinary workshop. Proceedings... Ottawa, Canada: IDRC, 1973. p 11-26.
- NG, S.Y.C. Embryo culture and somatic embryogenesis in cassava. In: AKORODA, M.O.; ARENE, O.B. TRIENNIAL SYMPOSIUM AT THE INTERNATIONAL SOCIETY FOR TROPICAL ROOT CROPS, 4, African Branch, 1989. Proceedings... African Branch, 1992. p.129-131.
- NG, S.Y.C. Embryo culture of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) and its related species. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON PLANT TISSUE AND CELL CULTURE, 7, Amsterdam, 1990. Amsterdam: The International Association for Plant Tissue Culture, 1990. p.195.

- NICHOLS, R.F.W. Breeding cassava for virus resistance. East African Agricultural Journal, Kenia, v.12, n.3, p.184-194, 1947.
- NORMANHA, E.S. Mandioca (*Manihot esculenta* Crantz): melhoramento genético. In: REUNIÃO DA COMISSÃO NACIONAL DA MANDIOCA, 6, Recife, 1972. Anais... Recife: IPEAN, 1972. p.35-43.
- PASQUAL, M.; PINTO, J.E.B. Cultura de embriões. ABCTP Notícias, n.9, p.2-12, 1988.
- PEREIRA, A.V. Utilização de análise multivariada na caracterização de germoplasma de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). Piracicaba: ESALQ, 1989. 180p. (Tese Doutorado em Agronomia).
- PRESCOTT-ALLEN, R. ; PRESCOTT-ALLEN, C. Genes from the wild - using wild genetic resources for food and raw material. London: Earthscan, 1983.
- PURSEGLOVE, J.W. Tropical crops, dicotyledons. New York: John Wiley, 1968. v.1, 332p.
- RAEMAKER, C.J.J.M. Primary and cyclic somatic embryogenesis in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). Agricultural University Wageningen, 1993. 119p. (Tese Doutorado em Ciências Biológicas).
- RAEMAKERS, C.J.J.M.; JACOBSEN, E.; VISSER, R.G.F. Cyclic somatic embryogenesis and plant transformation in cassava. In: INTERNATIONAL SCIENTIFIC MEETING OF CASSAVA BIOTECHNOLOGY NETWORK, 1, Cali, 1993. Proceedings... Cali: CIAT, 1993. p.208-215.
- RAGHAVAN, V. Applied aspects of embryo culture. In: REINERT, J.; BAJAJ, Y.P.S. Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue, and organ culture. Berlin: Springer-Verlag, 1977. p.375-397.
- RHOADES, R.E. Indigenous people and the preservation of biodiversity. HortScience, Madison, v.29, n.11, p.1222-1225, 1994.
- RICK, C.M.; DAVIS, J.F.F.; HOLLE, M. Genetic variation in *Lycopersicon pimpinellifolium*: evidence of evolutionary change in mating systems. Plant Systematic and Evolution, New York, n.127, p.139-170, 1977.
- ROCA, W.M. Meristem culture in cassava - principles and procedures. Cali: CIAT, 1979.

- ROCA, W.M. Root and tubercrops. In: SHARP, W.R.; EVANS, D.A.; AMMINATO, P.V.; YAMADA, Y. Handbook of plant cell culture. New York: Mac Millan, 1984. p.269-301. V.2.
- ROCA, W.M.; JAYASINGHE, U. El cultivo de meristemas para el saneamiento de clones de yuca - guía de estudio. Cali: CIAT, 1982. (Serie 04SC-02-05).
- ROGERS, D.J. Studies of *Manihot esculenta* Crantz and related species. Bulletin of the Torrey Botanical Club, Lancaster, v.90, n.1, p.43-54, 1963.
- ROGERS, D.J.; APPAN, S.G. *Manihot Manihotoides* (Euphorbiaceae). New York: Hafner, 1973. 272 p. (Flora Neotropica, 13).
- SARRIA, R.A.; GÓMEZ, A.; CATAÑO, M.L.; HERRERA, P.V.; CALDERÓN, A.; MAYER, J.E.; ROCA, W.M. Towards the development of *Agrobacterium tumefaciens* and particles bombardment-mediated cassava transformation. In: INTERNATIONAL SCIENTIFIC MEETING OF CASSAVA BIOTECHNOLOGY NETWORK, 1, Cali, 1993. Proceedings... Cali: CIAT, 1993. p.216-221.
- SMITH, E.H. The grape phylloxera - a celebration of its own. American Entomologist, Lanham, v.38, n.4, p.212-221, 1992.
- SOARES, J.G.G. Utilização e produção de forragem de maniçoba. In: ENCONTRO NORDESTINO DE MANIÇOBA, 1, Carpina, PE, 1989. Anais... Carpina, PE, 1989. p.20-28. (Coleção Mossoroense, Série C, v.469).
- STALKER, H.T. Utilization of wild species for crop improvement. Advances in Agronomy, New York, v. 33, p. 111-147, 1980.
- STAMP, J.A. Somatic embryogenesis in cassava: the anatomy and morphology of the regeneration process. Annals of Botany, New York, v.59, n.451-459, 1987.
- STAMP, J.A.; HENSHAW, G.G. Secondary somatic embryogenesis and plant regeneration in cassava. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, The Hague, v.10, p.227-233, 1987a.
- STAMP, J.A.; HENSHAW, G.G. Somatic embryogenesis from clonal leaf tissue of cassava. Annals of Botany, New York, v.59, p.445-450, 1987b.
- SUDARMONOWATI, E.; HENSHAW, G.G. The induction of somatic embryogenesis of recalcitrant cassava cultivars using picloram and dicamba. In: INTERNATIONAL SCIENTIFIC MEETING OF CASSAVA BIOTECHNOLOGY NETWORK, 1, Cali, 1993. Proceedings... Cali: CIAT, 1993. p.128-133

- SZABADOS, L.; HOYOS, R.; ROCA, W. *In vitro* somatic embryogenesis and plant regeneration of cassava. Plant Cell Reports, New York, v.6, p.248-251, 1987.
- TOWNSEND, H. The potential and progress of the technical propagation unit at the Royal Botanic Gardens, KEW. In: SYNGE, H.; TOWNSEND, H. Survival or extinction: Conference The practical rôle of botanic gardens in the conservation of rare and threatened plants, 1978. Proceedings... KEW: Royal Botanic Gardens, 1979. p.189-193.
- VALLE, T.L. Utilização de espécies selvagens no melhoramento de mandioca: passado, presente e futuro. In: HERSHEY, C.H. Mejoramento genético de la Yuca en America Latina. Cali: CIAT, 1991. p. 163-176.
- VIÉGAS, A.P. Estudos sobre a mandioca. Campinas: IAC/BRASCAN-Nordeste, 1976. 214p.
- VILELA-MORALES, E.A.; MENDES, R.A. Reunião sobre recursos fitogenéticos de interesse agrícola no Cone Sul; relatório do CENARGEN. Brasília, 1983. 171p.
- WALKER, H. The market for cassava. Inglaterra: Tropical Products Institute, Ministry of Overseas Development, 1966. 16p. (Report, G21).
- WOOD, B.W. *In vitro* proliferation of pecan shoots. HortScience, Madison, v.17, n.6, p.890-891, 1982.
- ZHONG-PING L. Screening valuable genes from wild species of plants. In: ADAMS, R.P.; ADAMS, J.E. Conservation of plant genes - DNA banking and in vitro biotechnology. San Diego: Academic Press, 1992. p.241-146.

**ANEXOS**



## ANEXO B

Substâncias componentes dos Meios de Cultura MS (Murashige e Skoog 1962) e WPM (McCown e Lloyd, 1981; Wood, 1982)

COMPONENTES	MS (mg.l <sup>-1</sup> )	WPM (mg.l <sup>-1</sup> )
<b>MACRONUTRIENTES</b>		
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	440	96
Ca (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	-	556
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	170
KNO <sub>3</sub>	1900	-
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-	990
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	370	370
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650	400
<b>MICRONUTRIENTES</b>		
CoCl.6H <sub>2</sub> O	0,025	-
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,025	0,25
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2	6,2
KI	0,83	-
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	22,3	22,3
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,25	0,25
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8,6	8,6
<b>FeEDTA</b>		
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	27,8	27,8
Na <sub>2</sub> EDTA.2H <sub>2</sub> O	37,2	37,2
<b>ORGÂNICOS</b>		
Ácido fólico	-	2,0
Ácido nicotínico	0,5	0,5
Glicina	2,0	2,0
Mio-inositol	100	100
Piridoxina. Hcl	0,5	0,5
Tiamina. Hcl	0,5	0,5
Sacarose	30000	20000