

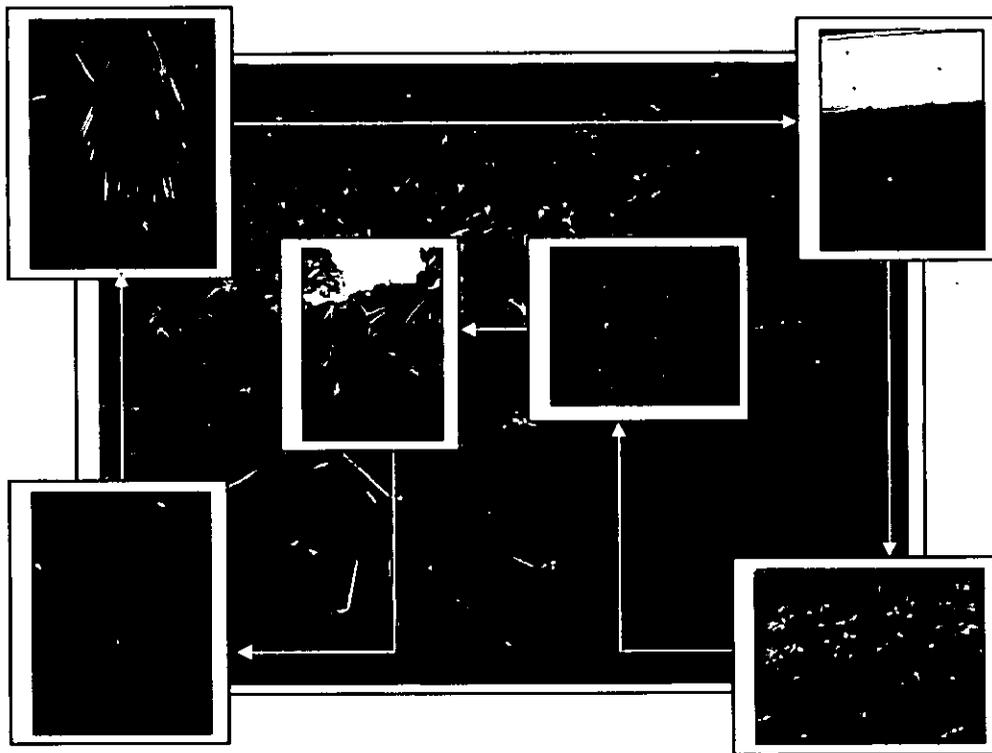


UNIVERSIDADE EDUARDO MONDLANI
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



TRABALHO DE LICENCIATURA

TEMA: Estudo da aclimatização de plântulas de variedades locais de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) produzidas *in vitro*.



Autor: Sofrimento Fenias Matsimbe

Maputo, Dezembro de 2006



UNIVERSIDADE EDUARDO MONDLANI

FACULDADE DE CIÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



TRABALHO DE LICENCIATURA

TEMA: Estudo da aclimatização de plântulas de variedades locais de
mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) produzidas *in vitro*.

Autor: Sofrimento Fenias Matsimbe

Supervisores:

Prof. Dr. Orlando Quilambo

Departamento de Ciências Biológicas, UEM

Eng^a. Anabela Zacarias

Programa Nacional de Raízes e Tubérculos, IIAM

Co-Supervisores:

dr. Alexandre Siteo

Departamento de Ciências Biológicas, UEM

dr^a. Célia Martins

Departamento de Ciências Biológicas, UEM

Maputo, Dezembro de 2006

Dedicatória

Dedico este trabalho,

A memória dos meus pais **Fenias Savanto Matsimbe & Regina Alice Muianga**, que deram-me a vida e as lições de como encara-la. Uma das lições foi – *“filho de nada te valerá tanto esforço se não fores honesto, digno e humilde, contudo se fizeres da escola a sua maior arma terás meio caminho andado”*.

A minha namorada **Isaura Novela**, minha filha **Thandii Carol** & meus sobrinhos **Vânia, Xénia & Júnior** pelo amor, carinho, amizade e pelos sacrifícios consentidos durante o tempo que lhes faltei.

E aos meus irmãos pelo incansável apoio.

A todos um grande Kanimambo

Agradecimentos

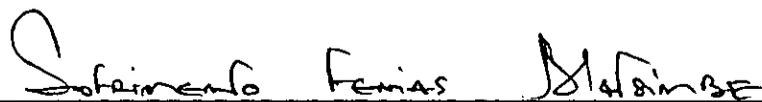
O meu profundo apreço a todos aqueles que directa e/ou indirectamente contribuíram para que a realização do presente trabalho e a conclusão do curso fossem possível, especialmente:

- Os meus supervisores Prof. Dr. Orlando Quilambo & Eng^a. Anabela Zacarias pela dedicação, paciência, consideração, amizade e pela forma sábia como guiaram-me em todo o trabalho.
- O IIAM, particularmente, Programa Nacional de Raizes e Tubérculos pelo suporte financeiro para aquisição do material; o Laboratório de Biotecnologia – Cultura de Tecidos pela disponibilização do material, instalações para a efectivação do trabalho e o Laboratório de solos pelas análises químicas dos substratos de transplante em estudo.
- A dr^a. Carla do Vale e dr. Munisse pelo constante encorajamento, apoio científico e material, mas acima de tudo pela nossa grande amizade.
- Os doutores Alexandre Siteo & Célia Martins pela orientação, consideração, compreensão e sobretudo pela pronta disponibilidade para ajudar em todas as fases do trabalho.
- Eng^o. Charlie Pedro Muananamuale pelo apoio na análise de dados e pela amizade.
- Eng^a. Nurbibi Cossa, minha colega do laboratório, pela amizade e apoio moral.
- Os senhores Pureza Monjane, Carlos Cambula, Graça Painsane, Frederico Madabula, Júlia Eduardo & Enélia Gomes, meus amigos e colegas do laboratório, presenças preciosas, incansáveis e, acima de tudo, pacientes em todas as fases do trabalho.
- Ao meu colega e amigo Chivambo pelo apoio na montagem do ensaio.
- A todos os docentes do Departamento de Ciências Biológicas pelo esforço empreendido na transmissão dos conhecimentos ao longo do curso.
- Ao dr. Ivan da Costa pela amizade, apoio moral e material.
- A todos os meus colegas e amigos da faculdade pela amizade, companheirismo e apoio moral ao longo de todo o curso.
- E todos outros que não pude aqui mencionar os meus sinceros agradecimentos.

Declaração de Honra

Declaro por minha honra, a autoria do presente trabalho de tese e a autenticidade dos dados que nele constam.

Maputo, Aos 6 de Dezembro de 2006



Sofrimento Fenias Matsimbe

Resumo

A mandioca é uma cultura tropical com papel importante para a segurança alimentar da população africana. Em Moçambique, onde mais de 50% da população depende desta cultura para sua alimentação diária, a ocorrência de viroses (CBSD e ACMD) constitui um factor limitante na produção, resultando em grandes quedas de rendimento.

A cultura de tecidos é um dos métodos efectivos da eliminação de viroses e multiplicação rápida de material sã, no entanto, o sucesso desta metodologia está dependente da aclimatização das plântulas antes da transferência para o campo.

Este trabalho teve como objectivo estudar os procedimentos adequados para aclimatização de plântulas de mandioca produzidas *in vitro*. As variedades seleccionadas foram “Chinhembwe” e “6 Meses”.

O ensaio foi montado em estufa no IIAM, entre os meses de Fevereiro a Abril de 2006. Utilizaram-se 6 tratamentos [presença ou ausência de 2 g/L de NPK 12:24:12 em 3 tipos de substratos (SE = solo arenoso+Estrume animal; HV = Hygro-mix+Vermiculite e VE = Vermiculite+Estrume animal)], distribuídos de forma completamente casualizada num esquema factorial. Para a concretização dos objectivos foram avaliados as taxas de sobrevivência e os parâmetros de crescimento (AF = área foliar, CR = comprimento da raiz, PFF = peso fresco das folhas; PFR = peso fresco das raízes; NF = número das folhas e NR = número das raízes).

O tipo de substrato usado para o transplante afectou a sobrevivência das plantas provenientes da propagação *in vitro*, tendo o substrato HV (HV-0 e HV-1) apresentado taxas mais elevadas (>70%) contrastando com SE-0 e VE (VE-0 e VE-1) cujas as taxas foram baixas (<35%). Em termos de crescimento, apenas os parâmetros NF; NR (para as duas variedades) e CR (para a variedade “6 Meses”) sofreram influência significativa dos substratos, onde HV e SE se superiorizaram ao VE.

O factor NPK 12:24:12 influenciou o crescimento das plantas apenas na variedade “6 Meses”, na qual a aplicação do NPK 12:24:12 beneficiou, significativamente, o desenvolvimento das raízes.

Lista de Abreviaturas

ANOVA – Análise de variância

FAO – “Food and Agriculture Organization of the United Nations” (Organização das Nações Unidas para Agricultura & Alimentação)

ACMD – “African Cassava Mosaic Disease” (Mosaico Africano da Mandioca)

CBSD – “Cassava Brown Streak Disease” (Listrado Castanho da Mandioca)

CIAT – Centro Internacional de Agricultura Tropical

IITA – “International Institute of Tropical Agriculture” (Instituto Internacional da Agricultura Tropical)

IIAM – Instituto de Investigação Agrária de Moçambique

INIA – Instituto Nacional de Investigação Agronómica

MADER – Ministério de Agricultura & Desenvolvimento Rural

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agro-pecuária

NPK – Nitrogénio Fósforo Potássio

SUB – Substrato

VAR – Variedade

AF – Área Foliar

PFF – Peso fresco da folha

PFR – Peso fresco da raiz

CR – Comprimento da raiz

NF – Número de folhas

NR – Número de raízes

HV – Hygro-mix+Vermiculite

SE – Solo arenoso+Estrume Animal

VE – Vermiculite+Estrume animal

ton. – Tonelada

ha. – Hectar

SAEG – Sistema para Análises Estatísticas

Q.M – Quadrados médios

S.Q – Soma de quadrados

GL. – Graus de liberdade

DDT – Dias depois do transplante

Lista de Figuras

- Figura 1.** Esquema da propagação *in vitro*, a partir de uma plântula sã produzida *in vitro* via cultura de meristemas pode se obter de 4 a 5 novas plântulas.....14
- Figura 2.** Efeito dos factores tipo de substrato, aplicação de NPK 12:24:12 e tipo de variedade na sobrevivência de plantas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) das variedades “Chinhembwe” e “6 Meses” produzidas *in vitro*, durante aclimatização *ex vitro*. Cada barra representa a percentagem de sobrevivência por tratamento.....26
- Figura 3.** Efeito dos factores tipo de substrato, aplicação de NPK 12:24:12 e tipo de variedade na área foliar das plantas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) das variedades “Chinhembwe” e “6 Meses” produzidas *in vitro*, durante aclimatização *ex vitro*. Cada barra representa a média de três plantas por tratamento.....27
- Figura 4.** Efeito dos factores tipo de substrato, aplicação de NPK 12:24:12 e tipo de variedade no comprimento das raízes das plantas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) das variedades “Chinhembwe” e “6 Meses” produzidas *in vitro*, durante a aclimatização *ex vitro*. Cada barra representa a média de três plantas por tratamento.....29
- Figura 5.** Efeito dos factores tipo de substrato, aplicação de NPK 12:24:12 e tipo de variedade no peso fresco das folhas das plantas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) das variedades “Chinhembwe” e “6 Meses” produzidas *in vitro*, durante a aclimatização *ex vitro*. Cada barra representa a média de três plantas por tratamento.....30
- Figura 6.** Efeito dos factores tipo de substrato, aplicação de NPK 12:24:12 e tipo de variedade no peso fresco das raízes das plantas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) das variedades “Chinhembwe” e “6 Meses” produzidas *in vitro*, durante a aclimatização *ex vitro*. Cada barra representa a média de três plantas por tratamento.....31
- Figura 7.1.** Efeito dos factores tipo de substrato, aplicação de NPK 12:24:12 e tipo de variedade no número de folhas das plantas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) da variedade “Chinhembwe” produzidas *in vitro*, durante a aclimatização *ex vitro*. Cada barra representa a média de três plantas por tratamento.....32
- Figura 7.2.** Efeito dos factores tipo de substrato, aplicação de NPK 12:24:12 e tipo de variedade no número de folhas das plantas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) da variedade “6 Meses” produzidas *in vitro*, durante a aclimatização *ex vitro*. Cada barra representa a média de três plantas por tratamento.....33

- Figura 8.1.** Efeito dos factores tipo de substrato, aplicação de NPK 12:24:12 e tipo de variedade no número de raízes das plantas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) da variedade “Chinhembwe” produzidas *in vitro*, durante a aclimatização *ex vitro*. Cada barra representa a média de três plantas por tratamento.....34
- Figura 8.2.** Efeito dos factores tipo de substrato, aplicação de NPK 12:24:12 e tipo de variedade no número de raízes das plantas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) da variedade “6 Meses” produzidas *in vitro*, durante a aclimatização *ex vitro*. Cada barra representa a média de três plantas por tratamento.....35
- Figura 9.** Sala de crescimento do Laboratório de Biotecnologia do IIAM (A) e plântulas de mandioca *in vitro* (B).....xiii
- Figura 10.** Preparação de uma câmara de humidade (A) e lavagem das plântulas para remoção do meio de cultura (B).....xiii
- Figura 11.** Transplante das plântulas em placas contendo substrato (A) e a rega das plântulas após o transplante (B).....xiv
- Figura 12.** Colocação das câmaras de humidade contendo placas com plântulas dentro da estufa.....xiv
- Figura 13.** Placas contendo plantas após a remoção das câmaras de humidade (A) e plantas já em vasos plásticos (após a transferência a um único tipo de substrato – Solo arenoso+Estrume animal) um mês após a remoção das câmaras de humidade (B).....xv
- Figura 14.** Plantas de mandioca na sombrite.....xv

Lista de Tabelas

Tabela 1. Classificação sistemática da mandioca.....	6
Tabela 2. Nomes vulgares da mandioca.....	6
Tabela 3. Efeito dos diferentes substratos no desenvolvimento das plantas no decurso do ensaio, onde SE = Solo arenoso+Estrume animal; HV = Hygro-mix+Vermiculite e VE = Vermiculite+Estrume animal.....	25
Tabela 4. Efeito das interacção VAR*NPK no CR (comprimento da raiz), das plantas de mandioca durante a aclimatização <i>ex vitro</i>	36
Tabela 5. Efeito das interacção SUB*VAR no CR (comprimento da raiz), das plantas de mandioca durante a aclimatização <i>ex vitro</i>	37
Tabela 6. Plano de experiência.....	xviii
Tabela 7. Taxas de sobrevivência nas variedades “Chinhembwe” e “6 Meses”.....	xviii
Tabela 8. Valores médios do número de folhas e de raízes nas duas variedades.....	xix
Tabela 9. Valores médios da área foliar; comprimento da raiz; peso fresco das folhas e das raízes nas duas variedades.....	xx
Tabela 10. Efeito dos factores SUB (tipo de substrato) e Tipo de tratamento (presença ou ausência de NPK) na AF (área foliar); CR (crescimento das raízes); PFF (peso fresco das folhas); PFR (peso fresco das raízes); NF (número de folhas) e NR (número de raízes) de plantas de mandioca da variedade “Chinhembwe”, durante a aclimatização <i>ex vitro</i>	xx
Tabela 11. Efeito dos factores SUB (tipo de substrato) e Tipo de tratamento (presença ou ausência de NPK) na AF (área foliar); CR (crescimento das raízes); PFF (peso fresco das folhas); PFR (peso fresco das raízes); NF (número de folhas) e NR (número de raízes) de plantas de mandioca da variedade “6 Meses”, durante a aclimatização <i>ex vitro</i>	xxi
Tabela 12. ANOVA da variedade “Chinhembwe”.....	xxi
Tabela 13. ANOVA da variedade “6 Meses”.....	xxiii
Tabela 14. ANOVA das interacções entre o tipo de substrato; aplicação de NPK e tipo de variedade.....	xxiv

Lista de Anexos

Anexo A. Figuras.....	xiii
Anexo B. Glossário.....	xvi
Anexo C. Plano experimental.....	xviii
Anexo D. Valores medidos durante o ensaio.....	xviii
Anexo E. Tabelas de análise de variância (ANOVA).....	xxi

Índice

Conteúdo	Página
DEDICATÓRIA.....	i
AGRADECIMENTOS.....	ii
DECLARAÇÃO DE HONRA.....	iii
RESUMO.....	iv
LISTA DE ABREVIATURAS.....	v
LISTA DE FIGURAS.....	vi
LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE ANEXOS.....	ix
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. IMPORTÂNCIA DO ESTUDO.....	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
3.1. Origem e distribuição da mandioca.....	4
3.2. Taxonomia e morfologia da mandioca.....	5
3.2.1. Taxonomia.....	5
3.2.2. Citogenética.....	6
3.2.3. Morfologia.....	7
3.3. Glicosídeos cianogênicos da mandioca.....	8
3.4. Condições ecológicas para o desenvolvimento da mandioca.....	9
3.5. Importância e produção da mandioca.....	10
3.5.1. Importância.....	10
3.5.2. Produção.....	10
3.6. Limitantes da produção da mandioca em Moçambique.....	11
3.7. Cultura de tecidos.....	12
3.7.1. Cultura de tecidos na mandioca.....	12
3.8. Aclimatização de plântulas produzidas <i>in vitro</i>	15
4. OBJECTIVOS.....	19
4.1. Objectivo geral.....	19
4.2. Objectivos específicos.....	19

5. ÁREA DE ESTUDO.....	20
6. MATERIAL E MÉTODOS.....	20
6.1. Método/Princípio.....	20
6.2. Equipamento e material experimental.....	20
6.3. Soluções preparadas	21
6.4. Procedimentos.....	21
6.4.1. Preparação das câmaras de humidade.....	21
6.4.2. Preparação dos substratos de transplante.....	22
6.4.3. Aplicação do fertilizante NPK 12:24:12.....	22
6.4.4. Transferência e aclimatização de plântulas produzidas <i>in vitro</i>	22
6.4.5. Observação e controle das plantas.....	23
6.5. Parâmetros medidos e seus métodos.....	23
6.6. Delineamento experimental.....	24
6.7. Análise estatística.....	24
7. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
7.1. Resultados.....	25
7.1.1. Efeito dos factores tipo de substrato, aplicação de NPK 12:24:12 e tipo de variedade na sobrevivência e no crescimento das plantas de mandioca produzidas <i>in vitro</i> durante a aclimatização <i>ex vitro</i>	25
7.1.2. Efeito das interacções dos factores tipo de substrato, aplicação de NPK 12:24:12 e tipo de variedade na sobrevivência e no crescimento das plantas de mandioca produzidas <i>in vitro</i> durante a aclimatização <i>ex vitro</i>	35
7.2. Discussão.....	37
7.2.1. Efeito dos factores tipo de substrato, aplicação de NPK 12:24:12 e tipo de variedade na sobrevivência e no crescimento das plantas de mandioca produzidas <i>in vitro</i> durante a aclimatização <i>ex vitro</i>	37
7.2.2. Efeito das interacções dos factores tipo de substrato, aplicação de NPK 12:24:12 e tipo de variedade na sobrevivência e no crescimento das plantas de mandioca produzidas <i>in vitro</i> durante a aclimatização <i>ex vitro</i>	44
8. CONCLUSÕES.....	46
9. RECOMENDAÇÕES.....	47
10. LIMITANTES.....	47

11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48
12. ANEXOS.....	55

1. Introdução

A mandioca é uma raiz com alto teor de amido cultivada na América tropical há mais de 5000 anos, antes dos portugueses a levarem até ao continente africano e depois até à Ásia (Cagnon *et al.*, 2005). Actualmente é a sexta cultura alimentar mundial para cerca de 500 milhões de pessoas na África tropical e sub-tropical; Ásia e América latina (El-Sharkawy, 2005), devido à sua disponibilidade ao longo de todo o ano; à tolerância a condições de "stress"; à capacidade de crescer em solos pobres e à sua adaptação aos sistemas de cultivo utilizados pelos camponeses; para além de ser uma grande fonte de calorías (Zacarias *et al.*, 2004).

Ela é cultivada maioritariamente por pequenos agricultores e agricultores de baixos recursos para obtenção das suas raízes, ricas em amido, as quais são usadas frescas para alimentação humana quando possuem baixo teor de compostos cianogénicos ou em produtos e outras formas processadas, maioritariamente, amido e farinha, sendo também utilizada para alimentação animal (El-Sharkawy, 2005)

Em Moçambique, a par da batata-doce, a mandioca joga um papel importante na alimentação básica, principalmente, das comunidades rurais. De salientar que mais de 50% da população moçambicana depende desta cultura para sua alimentação diária (Do Vale, 2005).

No entanto, a produção da mandioca no país tem sido grandemente afectada por vários factores, dos quais tem maior relevância a prevalência de doenças viróticas nomeadamente o Listrado Castanho ou Podridão Radicular da Mandioca (*Cassava Brown Streak Disease* - CBS) e o Mosaico Africano da Mandioca (*African Cassava Mosaic Disease* - ACMD). Estas doenças causam uma série de sintomas nas folhas, caule e sobretudo nas raízes, afectando o rendimento da planta e, por conseguinte, concorrendo como um factor contra os esforços de combate a fome e pobreza absoluta.

Ciente do valor que esta cultura e outras tem no país, e da crescente ameaça da erosão genética a que estão sujeitas, foi estabelecido no Instituto de Investigação Agrária de Moçambique (IIAM) um Laboratório de Biotecnologia - Cultura de Tecidos como forma

de ajudar a minimizar o impacto das doenças viróticas na produção local (Do Vale, 2005),^{NE} pois neste laboratório é possível propagar-se plantas usando a técnica de cultura de tecidos.

A cultura de tecidos é uma técnica utilizada para a micropropagação vegetal, que permite produzir massivamente plântulas livres de pragas e patógenos, contribuindo assim para aumento da sua produtividade e, em certos casos, da longevidade. Em relação a mandioca utiliza-se a micropropagação para produzir plântulas livres de doenças, tais como viroses e bacterioses, entre outras (Segovia *et al.*, 2002).

Esta técnica é particularmente importante para culturas propagadas vegetativamente, como a mandioca (IITA, 2002), todavia os seus benefícios somente podem ser completamente alcançados através de uma bem sucedida transferência de plântulas das condições *in vitro* para as condições *ex vitro* (Hazarika, 2003). Esta transferência, denominada aclimatização, é uma passagem crítica e representa, em muitos casos, um factor limitante para a micropropagação na cultura da mandioca (Piza & Pinho, 2005).

O presente trabalho foi realizado com o objectivo de estudar os procedimentos a ter em conta para a aclimatização de plântulas de variedades locais de mandioca produzidas *in vitro*.

2. Importância do Estudo

A mandioca é considerada uma das mais importantes culturas para a segurança alimentar em Moçambique, constituindo a maior fonte de calorias e carboidratos nas zonas rurais (Zacarias, 2004).

Actualmente, a mandioca está a atravessar uma fase crítica em termos de produção devido a prevalência de doenças viróticas, nomeadamente, ACMD e CBSD (Zacarias *et al.*, 2004), que constituem factores limitantes da produção mais importantes, dado que, a sua prevalência chega a atingir cerca de 14-60% de incidência no caso do ACMD (INIA, 2003) e 80-100% para CBSD (Hillocks *et al.*, 2002), principalmente nas zonas costeiras.

A cultura de tecidos tem-se mostrado muito eficiente para obtenção de plântulas livres de doenças na cultura de mandioca (IITA, 2002). Contudo, devido a vários factores, a taxa de sobrevivência das plântulas produzidas através desta técnica tem sido baixa quando estas são transferidas das condições *in vitro* para às condições *ex vitro* (estufas ou campo), sendo, por isso necessário que sejam aclimatizadas antes da transferência, afim de se garantirem maiores taxas de sobrevivência e um crescimento vigoroso durante o transplante para o solo (Mazarika, 2003).

Conforme se pode depreender a aclimatização é uma etapa extremamente importante e crítica para a propagação da mandioca via cultura de tecidos, constituindo um factor limitante, daí que um estudo deste tipo reveste-se de grande importância, atendendo que o país aposta no controle das viroses na mandioca através da técnica de cultura de tecidos.

3. Revisão Bibliográfica

3.1. Origem e distribuição da mandioca:

A origem da mandioca e o local da sua domesticação ainda não estão definitivamente estabelecidos. Apesar de se sugerir que ela ter-se-à originado em lugares tão diversos como África; Ásia; Ilhas do Pacífico; América Central e América Latina (Renvoize, 1973 citado por Ceballos & De la Cruz, 2002), existe um reconhecimento, muito generalizado, que a sua origem seja América tropical, especificamente o nordeste do Brasil (Ceballos & De la Cruz, 2002).

Esta linha, é reforçada pelas análises filogenéticas do género *Manihot* realizadas por Shaal *et al.* (1994) citadas por Fukunda & Silva (2005), baseadas em marcadores moleculares, as quais indicam que a mandioca originou-se na América do Sul, especificamente na região nordeste do Brasil, também apontado por Abraham (1970); Martin (1974); Gulick *et al.* (1983) e Allem (1994) citados por Fukunda & Silva (2005), como seu possível centro de origem e diversificação, por ser o local onde existe a maior diversidade no género *Manihot*, bem como dentro das diferentes espécies, contudo, existem poucas evidências arqueológicas que confirmem este facto (Montaldo, 1985 & Cock, 1984 citados por Tafur, 2002).

Leon (1977) citado por Fukunda & Silva (2005), aponta a América do Sul como o centro primário e a região entre Guatemala e o México como o centro secundário da origem e diversificação da mandioca.

Esta espécie foi domesticada por povos pré-colombianos visando a produção de raízes a partir de espécies silvestres do género *Manihot*. Evidências arqueológicas encontradas na Colombia e Venezuela, indicam que o cultivo da mandioca era praticado nessas regiões há cerca de 3000 a 7000 anos (Reichel-Dolmatoff, 1957 citado por Fukunda & Silva, 2005).

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) terá sido introduzida em África, na forma de farinha, pelos portugueses no Séc. XVI. A farinha era usada como provisão nas viagens de navio entre África, Europa e Brasil (Rossi, 1975 citado por Carter *et al.*, 1997). A

primeira menção do cultivo da mandioca em África data de 1558 (Mauny, 1953 citado por Carter *et al.*, 1997) e em Moçambique, segundo Alpers (1975) citado por Carter *et al.* (1997), a primeira introdução terá sido na Ilha de Moçambique, em 1768.

gatos?
A mandioca é uma cultura tropical, crescendo entre 30°N e 30°S, em áreas onde a precipitação anual está acima de 500 mm e a temperatura acima dos 20°C (Ekanayake *et al.*, 1997), embora, a concentração do seu plantio esteja entre a latitude 15°N e 15°S (Matos & Gomes, 2000). Todavia, algumas variedades crescem em altitudes de 2000 m ou em áreas sub-tropicais com temperaturas anuais tão baixas como 16°C (Ekanayake *et al.*, 1997).

3.2. Taxonomia e morfologia da mandioca

3.2.1. Taxonomia

A mandioca pertence à família Euphorbiaceae, uma das maiores dentro das dicotiledôneas, com cerca de 290 gêneros e aproximadamente 7500 espécies distribuídas em todas as regiões tropicais e sub-tropicais do globo terrestre, principalmente na América e em África (Barroso *et al.*, 1984 citados por Dallaqua & Coral, 2005). As plantas desta família se caracterizam pelo notável desenvolvimento de vasos laticíferos constituídos por células secretoras denominadas galactocitos responsáveis pela produção da secreção leitosa, também, característica nesta família (Ceballos & De la Cruz, 2002).

O género *Manihot*, no qual pertence a mandioca e cuja as espécies ocorrem naturalmente somente nas Américas, compreende cerca de 98 espécies dos quais apenas a mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) tem relevância económica e é cultivada (Ceballos & De la Cruz, 2002).

Recentemente Olsen & Schaal (1999) citados por Carvalho *et al.* (2000), baseando-se em estudos com isoenzimas e marcadores polimórficos de DNA, comprovaram que a *Manihot esculenta* ssp. *flabellifolia* é o ancestral da espécie cultivada. Esses estudos comprovaram, ainda, a teoria de Hershey & Amaya (1982) citada por Fukunda & Silva (2005), segundo a qual a mandioca não se encontra sob a forma silvestre e aparentemente evoluiu como uma espécie cultivada, por selecção natural e com o cuidado do homem.

↑ O nome científico da mandioca foi dado originalmente por Crantz^{te} em 1766 e, posteriormente, ela foi classificada (Pohl, 1827; Pax, 1910 citados por Ceballos & De la Cruz, 2002) como duas espécies diferentes dependendo do sabor *M. utilissima* (amarga) e *M. aipi* (doce) (Ceballos & De la Cruz, 2002). Contudo, Ciferri (1938) citado por Ceballos & De la Cruz (2002) sugere que deve dar-se prioridade ao trabalho de Crantz usando o nome actual *M. esculenta*.

Tabela 1. Classificação sistemática da mandioca

Classificação sistemática da mandioca	
Classe	Dicotyledoneae
Sub-classe	Archichlamydeae
Ordem	Euphorbiales
Família	Euphorbiaceae
Sub-família	Manihotae
Gênero	Manihot
Espécie	<i>Manihot esculenta</i> Crantz

Fonte: Ekanayake *et al.* (1997)

Tabela 2. Nomes vulgares da mandioca

Nome	Lingua
Mandioca	Português
Cassava	Inglês
Yuca	Espanhol
Manioc	Francês

3.2.2. Citogenética

Dentro da família das Euphorbiaceae, em geral, o número cromossómico básico é 8, oscilando a média de variação entre 6 a 11 e, aproximadamente 50% das espécies são poliploides (Martín, 1976 citado por Ceballos & De la Cruz, 2002).

Todas as espécies da tribo *Manihotae* (incluindo *M. esculenta*) contém 36 cromossomos (Perry, 1941 citado por Ceballos & De la Cruz, 2002) e na maioria dos casos verifica-se o aparecimento de cromossomas na forma bivalente sugerindo que elas seriam diploides.

No entanto, existe uma certa divergência por parte de investigadores quanto ao grau de ploidia da mandioca, para alguns se trata de uma espécie diploide ($2n = 36$ cromossomas) enquanto os outros consideram-na uma espécie poliploide, possivelmente aloploide (tetra ou hexaploide) (Ceballos & De la Cruz, 2002).

3.2.3. Morfologia

A mandioca é um arbusto perene, de ramificação simpodial e com variações na altura da planta que oscilam entre 1 e 5 m, sendo que a altura máxima geralmente não excede os 3 m (Ceballos & De la Cruz, 2002). É principalmente propagada vegetativamente, mas nas condições naturais e em programas de melhoramento de plantas a propagação através da semente é comum (Ekanayake *et al.*, 1997).

Apresenta um caule cilíndrico (com 2 a 6 cm de diâmetro), lenhoso (Ekanayake *et al.*, 1997), que está formado por alternância de nós e entrenós e, apresenta uma filotaxia típica de 2/5. Nos nós inserem-se o pecíolo da folha, uma gema axilar protegida por uma escama e por estípulas laterais (Ceballos & De la Cruz, 2002).

As folhas são simples, compostas por lâmina foliar e pecíolo. A lâmina foliar é palmeada e profundamente lobulada (Ceballos & De la Cruz, 2002). O número de lóbulos varia entre 3 a 9, e a forma do lóbulo também varia, especialmente, em largura. A maioria das variedades de mandioca que crescem no continente africano apresentam lóbulos lanceoladas ou elípticas (Ekanayake *et al.*, 1997).

A mandioca é uma planta monóica, isto é, com flores unissexuais masculinas e femininas localizadas na mesma planta (Ekanayake *et al.*, 1997) e, geralmente, na mesma inflorescência. A estrutura básica do seu arranjo floral é um rácimo, com flores masculinas localizadas no ápice e as flores femininas mais abaixo na inflorescência (Ceballos & De la Cruz, 2002).

A mandioca apresenta uma polinização cruzada, dado que cada indivíduo naturalmente é um híbrido com altos níveis de heterozigocidade, e é realizada tipicamente por insectos. A autopolinização é desfavorecida pelo fenómeno denominado protogenia. Contudo,

pode ocorrer, ocasionalmente, que flores femininas e masculinas de ráculos distintos, da mesma planta, abram de forma simultânea resultando na autopolinização (Ceballos & De la Cruz, 2002).

O fruto é uma cápsula deiscente e trilocular, de forma ovoide a globular, com 1 a 1,5 cm de diâmetro (Ceballos & De la Cruz, 2002). A semente é oval com uma testa lisa e frágil (Ekanayake *et al.*, 1997).

A planta de mandioca propagada por estacas produz raízes adventícias na base das estacas, brotos axilares, ou ainda nos nós (raiz nodal). Estas raízes adventícias desenvolvem um sistema de raízes fibrosas que pode crescer até uma profundidade de 2 m ou mais (Ekanayake *et al.*, 1997). Nas plantas propagadas a partir da sementes se desenvolve uma raiz primária pivotante e várias secundárias. Aparentemente, a raiz primária desenvolve-se até converter-se numa raiz tuberosa (Ceballos & De la Cruz, 2002).

Algumas raízes fibrosas desenvolvem-se em raízes tuberosas, enquanto as outras permanecem fibrosas e continuam a absorver água e nutrientes. O número de raízes fibrosas que formam as raízes tuberosas depende de vários factores: genótipo; suplemento de assimilados; fotoperiodismo e temperatura (Ekanayake *et al.*, 1997).

A polpa, porção central da raiz tuberosa, é a região de armazenamento principal da planta onde os grãos de amido são depositados. A sua cor pode variar de branco, creme ou amarelo, sendo esta última uma indicação de conteúdo elevado de caroteno (Ekanayake *et al.*, 1997).

3.3. Glicosídeos cianogênicos da mandioca

Um dos aspectos mais relevantes na utilização da mandioca é a presença do glicosídeo cianogênico chamado *Linamarina*, que na presença de enzimas (principalmente *Linamarase*) e de ácidos, se hidroliza produzindo ácido cianídrico (HCN) em doses que podem ser inócuas até mortais. Esta reacção ocorre de uma forma espontânea nos tecidos decompostos da planta e no tracto digestivo dos animais (Ceballos & De la Cruz, 2002).

A produção do HCN é particularmente alta na casca, todavia, outros tecidos da planta (incluindo a folha) também têm poder cianogênico, mas em baixos teores comparativamente à casca das raízes. Este poder é influenciado por factores como: as condições ambientais; o tipo de solo; a variedade da mandioca e a idade da planta no momento da colheita (Ceballos & De la Cruz, 2002). Dependendo do teor do glicosídeo a mandioca é classificada em: mandioca doce (com valores abaixo de 100 mg/kg) e amarga (com valores acima de 100 mg/kg) (Cagnon *et al.*, 2005).

3.4. Condições ecológicas para o desenvolvimento da mandioca

A mandioca é típica de regiões de climas tropicais quentes, desenvolvendo-se muito bem a temperaturas que variam de 24 a 30°C, abaixo de 24°C o seu desenvolvimento é reduzido (Almeida, 1995), sendo pouco resistente ao frio, dado que abaixo dos 15°C pode não se desenvolver (Ternes, 2005).

Esta cultura adapta-se a diversos regimes de precipitação pluviométrica, suportando variações desde 500 até 3000 mm/ano, contudo uma precipitação de 1000 e 1500 mm/ano, bem distribuída durante o ciclo vegetativo, é o ideal. Também adapta-se a solos bem drenados; à seca; solos pobres e com pH baixo (Almeida, 1995).

Admite-se que a mandioca se tenha originado numa região onde o período de seca é bem definido, sendo, por esta razão tolerante ao “stress” hídrico. A planta defende-se da falta de água através da diminuição da superfície foliar e mantém-se graças ao sistema radicular fibroso bastante desenvolvido e profundo, que permite a exploração de um grande volume de solo, de onde consegue absorver água e nutrientes (Ternes, 2005).

Com relação à radiação solar, é conhecido que o crescimento da planta aumenta com elevação desse factor. Também é conhecido que o sombreamento reduz o tempo de permanência da folha na planta, o que resulta em baixo índice de área foliar e num despêndio de energia para manter uma superfície foliar adequada (Ternes, 2005).

Estudos conduzidos em laboratório (Bolhuis, 1966) citados por Ternes (2005), comprovaram que a mandioca é uma planta de dias curtos, mostrando maior produção em

regimes de 10 a 12 horas de luz e grande queda de produção quando passava de 12 a 14 horas de luz por dia.

Os solos argilosos são indesejáveis dado que por serem mais compactos que os arenosos dificultam o crescimento das raízes e apresentam um maior risco de encharcamento, podendo provocar o apodrecimento das raízes (Mattos & Gomes, 2000).

3.5. Importância e produção da mandioca

3.5.1. Importância

A mandioca é de grande importância socio-económica para os agricultores e consumidores de poucos recursos económicos dos países tropicais, já que é um produto básico na sua dieta alimentar, ocupando o quarto lugar na importância como fonte de energia, depois do arroz; milho e cana de açúcar (Cock, 1984 citado por Tafur, 2002).

A raiz de reserva é consumida fresca ou seca. A mandioca seca (raspa) pode substituir parcialmente o milho para o consumo humano bem como na produção de rações de animais (Almeida, 1995).

Se bem que o principal produto económico da mandioca são as suas raízes, em várias regiões da Ásia e África nas quais se inclui Moçambique, as folhas são processadas e utilizadas como uma verdura para o consumo humano, sendo particularmente importante durante a época chuvosa e quente, quando é extremamente difícil desenvolver outro tipo de vegetais. Elas possuem um valioso conteúdo nutritivo com altos níveis proteicos que oscilam entre 18-22% em base seca (Buitrago, 1990 citado por Ceballos & De la Cruz, 2002), além de constituir, também, uma fonte rica e barata de vitaminas A e B, e de minerais (Babaleye, 1996)

3.5.2. Produção

A produção mundial de mandioca em 2005 foi de cerca de 203,9 milhões de toneladas métricas com rendimento médio de 10,9 ton/ha. A Nigéria (18,7% da produção mundial) é o maior produtor mundial seguido pelo Brasil (13,1%); Indonésia (9,5%) e Tailândia (8,3%). Moçambique encontra-se em 6º lugar em África e 10º no mundo na produção de

mandioca. Em 2005 a sua produção foi de 6,1 milhões de toneladas métricas e o rendimento médio de 5,86 ton/ha (FAO, 2006).

A nível nacional os maiores produtores da mandioca são as províncias de Nampula; Zambézia; Cabo Delgado e Inhambane com cerca de 46,7%; 25,2%; 13,4% e 7,4% respectivamente (MADER-Aviso Prévio, 2005).

3.6. Limitantes da produção da mandioca em Moçambique

A mandioca é uma importante cultura alimentar de subsistência em Moçambique, onde devido a vários factores tem-se registado grandes quedas na produção. Dentre esses factores a ocorrência de doenças viróticas, nomeadamente o ACMD e CBSD, é o que maior impacto negativo causa.

O ACMD ocorre em todos os países do continente africano onde se cultiva a mandioca e, é considerada como uma das mais importantes doenças que afectam a mandioca na África sub-sahariana (Thresh & Cooter, 2005). Em Moçambique ocorre em quase todo o território, onde a sua incidência atinge valores entre 14 a 60%, principalmente, nas zonas costeiras (INIA, 2003) e pode reduzir 20 a 80% do rendimento da planta (Alaux & Fauquet, 1987 citados por Chambo, 2004).

O CBSD ocorre maioritariamente na costa Este africana (Hillocks *et al.*, 2003), e foi observado pela primeira vez em 1930, no Distrito de Amani (Tanzania). A partir de 1935 foi reconhecido que era transmissível e os seus sintomas foram associados à necrose da raiz e em casos mais severos à podridão da raiz (Tresh *et al.*, 1994 citados por Zacarias *et al.*, 2004). Em Moçambique a sua ocorrência foi observada pela primeira vez em 1995 na Estação Agrária de Umbeluzi (Muimba-Konkolongo & Teri, 1995 citados por Zacarias *et al.*, 2004). E mais tarde em 1999, foi reconhecida a sua ocorrência nas províncias de Zambézia e Nampula (Thresh, 2001), onde a sua incidência estima-se que chega a atingir cerca de 80-100% (Hillocks *et al.*, 2002), principalmente nas zonas costeiras. Estudos realizados nestas regiões mostraram quedas de rendimento até 52% (Maleia, 2003).

Os outros factores que limitam a produção da mandioca em Moçambique incluem: uso de variedades susceptíveis a doenças virais (ACMD e CBSD) assim como outras pragas, nomeadamente o ácaro verde e a cochonilha; baixa fertilidade dos solos; utilização de estacas de baixa qualidade e o uso de práticas agronómicas inadequadas (Zacarias *et al.*, 2004).

3.7. Cultura de tecidos

As plantas são, tradicionalmente, produzidas via propagação sexual através das sementes ou via assexual através das estacas. Todavia, face a vários constrangimentos que limitam a produção agrícola, a investigação científica moderna desenvolveu novos métodos ^{através dos} pelos quais as plantas podem ser propagadas. Uma das tecnologias, já bem estabelecida, é a cultura de tecidos ou propagação *in vitro*, a qual representa a primeira geração dos produtos da biotecnologia vegetal (Okole & Odhav, 2002).

Cultura de tecidos refere-se a propagação de células; grupo de células; tecidos, e órgãos em meio de cultura artificial sob condições de assépcia (IITA, 2002).

As vantagens da cultura de tecidos incluem a possibilidade de limpeza, a multiplicação rápida de material são; a conservação de germoplasma (Fregene *et al.*, 2002); a garantia de uniformidade genética (Dublin, 1984 citado por Silva *et al.*, 2003) e a recuperação do vigor (Sousa *et al.*, 2005). Além disso, esta técnica requer um espaço reduzido para a multiplicação de um largo número de plantas (IITA, 1998). Estas vantagens são particularmente relevantes para culturas propagadas vegetativamente tais como a banana; a mandioca e outras, nas quais o seu maneio enfrenta certos obstáculos como multiplicação lenta ou ainda baixa qualidade fitossanitária dos propágulos convencionais (IITA, 1998).

3.7.1. Cultura de tecidos na Mandioca

Os primeiros registos da utilização da cultura de tecidos ou propagação *in vitro* em mandioca datam de 1974, envolvendo estudos relacionados com o crescimento de calos (Eskes *et al.*, 1974 citados por Sousa *et al.*, 2005) e o cultivo de meristemas apicais (Kantha *et al.*, 1974 citados por Sousa *et al.*, 2005).

↖ Actualmente conhecem-se dois sistemas de propagação *in vitro* da mandioca:

- A partir de meristemas pré-existentes, por exemplo, em nódulos e ápices (Roca, 1984; Konan *et al.*, 1997 citados por Fregene *et al.*, 2002) ou mediante o cultivo da “roseta” (Roca, 1984 citado por Fregene *et al.*, 2002);
- A partir de embriões somáticos, por exemplo, induzidos a partir de folhas imaturas/ou de meristemas apicais (Szabados *et al.*, 1987 citados por Fregene *et al.*, 2002).

O primeiro sistema de propagação (cultura de ápices e nódulos) é o mais comum. Contudo, tecnicamente o segundo sistema (mediante embriões somáticos) seria o mais eficiente, sempre e quando se logra resolver o problema de conversão do embrião a planta e comprovação da estabilidade genética do material recuperado (Fregene *et al.*, 2002).

Segundo Roca (1984) citado por Fregene *et al.* (2002), a propagação *in vitro* consiste em colocar gemas ou ápices em um meio de cultura sólido, em ambiente estéril e sob condições controladas na sala de crescimento (28 a 30°C; 12 horas de fotoperíodo e uma intensidade luminosa de 1000 lux). Transcorridas 4 a 6 semanas, podem se obter de três a cinco novos explantes aptos para iniciar um novo ciclo de propagação (Figura 1).

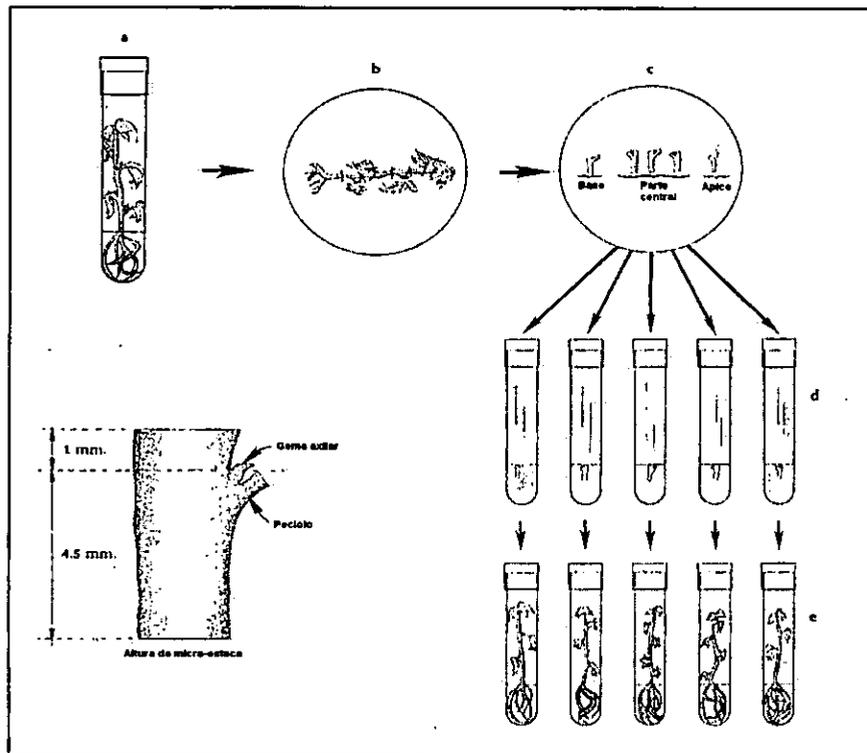


Figura 1. Esquema da propagação *in vitro*, a partir de uma plântula sã produzida *in vitro* via cultura de meristemas pode se obter de 3 a 5 novas plântulas (CIAT, 1982 & Roca, 1984 citados por Fregene *et al.*, 2002).

a – Plântula; b – Divisão da plântula em micro-estacas; c – Micro-estacas; d – Micro-estacas inoculadas no meio de cultura em tubos de ensaio & e – Novas plântulas multiplicadas via *in vitro*.

A cultura de tecidos, embora tenha vastas aplicações na agricultura, é mais amplamente utilizada na micropropagação e eliminação de patógenos (IITA, 2002), uma vez que tem-se mostrado muito eficiente para obtenção de plantas de mandioca livres de vírus (Berbee *et al.*, 1973 citados por Sousa *et al.*, 2005), como resultado da distribuição irregular das partículas viróticas na planta (Roca, 1982 citado por Sousa *et al.*, 2005), com a sua concentração diminuindo à medida que se aproxima do ápice do ramo (Kartha & Roca, 1993 citados por Sousa *et al.*, 2005).

Entretanto, as plantas regeneradas da cultura de meristemas devem ser sujeitas a rigorosa indexação de vírus e podem estar livres de todas as viroses conhecidas que afectam a mandioca (IITA, 2002).

A eficiência da cultura de meristemas depende do tipo de vírus; da variedade e do uso correcto da técnica (Roca, 1984 citado por Oliveira *et al.*, 2000), e o vigor das plantas limpas tem-se preservado por mais de quatro ciclos da cultura (Mabanza *et al.*, 1994 citados por Oliveira *et al.*, 2000). Lozano *et al.* (1984); Roca (1984) e Mabanza *et al.* (1994) citados por Oliveira *et al.* (2000) obtiveram aumentos de produtividade, respectivamente, de 320%; 70% e 100% em razão da limpeza de patógenos.

Os resultados

3.8. Aclimatização de plântulas produzidas *in vitro*

A cultura de meristema é um dos métodos efectivos da eliminação de viroses e outras doenças sistémicas dessemnadas pela propagação vegetativa por estacas (Jorge *et al.*, 2000). Todavia, a disseminação de plântulas de mandioca produzidas *in vitro* é difícil devido as baixas taxas de sobrevivência nas condições *ex vitro* (Jorge *et al.*, 2001).

Um dos obstáculos para aplicação prática dos métodos de cultura de tecidos é a dificuldade de transferir com sucesso as plântulas das condições *in vitro* para o solo em razão da diferença entre as duas condições (Read & Fellman, 1985 citados por Silva *et al.*, 2003).

As plântulas produzidas via *in vitro*, no fim de 6 a 11 meses debaixo de condições artificiais (luz; temperatura; humidade e nutrição) e em salas de crescimento estéreis ficam em meio ambiente como "bebés de proveta", débeis e desadaptadas. Por conseguinte, é necessária uma etapa de aclimatização ou endurecimento, que na mandioca é um processo muito delicado, antes que elas possam ser transferidas para o local definitivo (Segovia *et al.*, 2002).

George (1996) citado por Jorge (2002) considera duas fases distintas para transferência de plântulas produzidas via cultura de tecidos das condições do laboratório para o ambiente de estufa: o endurecimento e a aclimatização.

Endurecimento é a preparação das plântulas ainda nas condições *in vitro* através de manipulações de modo a torná-las facilmente adaptáveis ao ambiente natural. Tem a vantagem de normalmente requerer pouco investimento e ser relativamente fácil de

executar (Jorge, 2002).

A aclimatização por seu lado, é a adaptação das plântulas transferidas das condições *in vitro* para o ambiente natural, geralmente uma estufa ou campo (condições *ex vitro*). Esta, geralmente requer equipamento apropriado e um certo grau de controle ambiental (Jorge, 2002).

As plântulas *in vitro* nos tubos de ensaio (Figura 9A do Anexo A) estão expostas a elevados níveis de humidade relativa (100%); baixa intensidade luminosa; temperatura óptima (24–30°C); meio de cultura provido de requerimentos nutritivos óptimos e condições assépticas (IITA, 2002) daí que quando a transferência dos tubos de ensaio para as condições ambientais naturais não é realizada com uma adequada metodologia, a percentagem de perdas torna-se muito elevada (entre 50 e 95%), o que afecta o processo de desenvolvimento da cultura, sobretudo, porque eleva o custo desta tecnologia alternativa (Segovia *et al.*, 2002).

As maiores diferenças entre as plântulas *in vitro* e as plantas em estufa/campo, para além do ambiente no qual crescem, estão na sua estrutura. Alguns exemplos incluem: células estomáticas amplamente abertas; camada de células em paliçada deficientemente desenvolvida e a conexão vascular entre as raízes e o caule incompleta (IITA, 2002). Brained & Fuchigami (1981) citados por Couto *et al.* (2003) acrescentam que as plântulas provenientes da cultura *in vitro* não desenvolvem cutícula, resultando em alta evapotranspiração; a sua parede celular não apresenta rigidez suficiente para a sustentação; as folhas são delgadas e suaves, fotossinteticamente inactivas, deixando a plântula em franco heterotrofismo e os estômatos não operam eficientemente, provocando, assim, “stress” nas primeiras horas após a sua retirada dos tubos de ensaio.

De acordo com Sutter (1988) citado por Pereira *et al.* (2005), quando transferidas para aclimatização, as plantas enraizadas *in vitro* são submetidas a uma condição de alta transpiração que associada á alta condutividade hídrica, provocando baixa funcionalidade ou ausência de controle sobre o fechamento dos estomatos e esta condição resulta em altas taxas de mortalidade. Por outro lado, Leite (1995) citado por Hoffmann *et al.* (2001)

considera que o sistema radicular adventício emitido em meio semi-solidificado com ágar ou produto equivalente é, em geral, pouco ramificado; quebradiço e isento de pêlos radiculares, de modo que as raízes assim formadas podem ser pouco eficientes na absorção de água e nutrientes durante a aclimatização.

As plântulas *in vitro* podem ser aclimatizadas com vários tamanhos, mas os melhores resultados são alcançados quando as plântulas têm entre 5 a 7 cm de altura (Segovia *et al.*, 2002). Para Jorge *et al.* (2000a) o tamanho das plântulas entre 2 a 8 cm de altura é o ideal.

Os vasos e, principalmente, os substratos nos quais se faz o transplante são importantes para boa sobrevivência (IITA, 2002), daí que a escolha do substrato apropriado pode ser decisivo para o sucesso da aclimatização.

O substrato deve ser de baixa densidade; rico em nutrientes; composição química equilibrada e física uniforme; boa aeração e drenagem; boa coesão entre as partículas e raízes, e estar, preferencialmente, isento de plantas daninhas (Coutinho & Carvalho, 1983 citado por Silva *et al.*, 2003); substâncias fitotóxicas e fitopatogênicas e pragas (Carneiro, 1995 & Minami, 1995 citados por Martin *et al.*, 2006); possuir volume ótimo de espaços porosos preenchidos por gases e adequada taxa de difusão de oxigênio necessário à respiração das raízes (Hartmann; Kester & Davis, 1990 citados por Hoffmann *et al.*, 2001).

Para além das características acima citadas, de acordo com Kämpf (2000) citado por Moraes *et al.* (2002), um bom substrato, também, deve apresentar boa economia hídrica; permeabilidade; poder de tamponamento para o valor do pH; capacidade de retenção de nutrientes; alta estabilidade de estrutura, a fim de evitar a compactação, e ter um alto teor de fibras resistentes à decomposição.

Para Hoffmann *et al.* (2001) o substrato é um factor externo de marcada influência no processo de enraizamento adventício e sobre a qualidade das raízes formadas, desempenhando papel importante na sobrevivência e desenvolvimento inicial da nova planta. George (1993) e Leite (1995) citados por Hoffmann *et al.* (2001) acrescentam que

para além da aeração, também, pode afectar o escurecimento do ambiente de enraizamento; pH; humidade e resistência física ao crescimento das raízes.

Outros problemas associados a plântulas produzidas via cultura de tecidos incluem: o seu crescimento que é muito pobre; a alta susceptibilidade a ataques de fungos e de insectos durante o período da transferência para as condições *ex vitro* (IITA, 2002).

4. Objectivos

4.1. Objectivo geral:

O objectivo geral do presente trabalho foi:

- Estudar os procedimentos adequados para aclimatização de plântulas de variedades locais de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) produzidas *in vitro*.

4.2. Objectivos específicos:

Na linha do objectivo geral acima indicado, foram definidos os seguintes objectivos específicos:

- Analisar o efeito da aplicação do fertilizante Nitrogénio Fosforo Potássio (NPK 12:24:12) durante aclimatização *ex vitro* de plântulas de mandioca;
- Comparar as taxas de sobrevivência e vigor nos diferentes tipos de substratos de transplante (a mistura Solo arenoso+Estrume animal; a mistura Hygro-mix+Vermiculite e a mistura Vermiculite+Estrume animal) durante a aclimatização *ex vitro* de plântulas de mandioca;
- Contribuir para produção de um folheto de recomendações de técnicas de aclimatização e custos envolvidos.

5. Área de estudo

Este estudo realizou-se nas estufas do Instituto de Investigação Agrária de Moçambique (IIAM) situado no Bairro de Mavalane "A" na cidade de Maputo, entre os meses de Janeiro e Junho de 2006.

6. Material e métodos

6.1. Método / princípio:

No presente trabalho foram estudados os procedimentos adequados para a aclimatização de plântulas de mandioca por meio da comparação de diferentes substratos de transplante e pela análise do efeito da aplicação de fertilizante (NPK 12:24:12). Foram usadas, neste trabalho, plântulas de mandioca de duas variedades locais ("Chinhembwe" e "6 Meses") produzidas através de técnicas de cultura de tecidos (cultura de meristemas e multiplicação *in vitro*) no Laboratório de Biotecnologia - Cultura de Tecidos do IIAM.

A metodologia usada foi adaptada da metodologia descrita em IITA (2002) e CIAT (1984) citada por Fregene *et al.* (2002). NE

6.2. Equipamento e material experimental

Durante a realização do trabalho foi utilizado o seguinte equipamento e material experimental:

1. Agitador magnético;
2. Autoclave
3. Balança;
4. Baldes;
5. Bandejas de transplante
6. Bloco de notas;
7. Câmara de humidade;
8. Chapa unitex (para câmara de humidade);
9. Copo de vidro (1000 ml);
10. Cordas;
11. Etiquetas;
12. Fita cola;

13. Garrafa “spray”;
14. Lapís;
15. Lenha;
16. Marcador de tinta permanente;
17. Mascara;
18. Pás de mão;
19. Pinças;
20. Plástico (para câmara de humidade);
21. Pulverizador (1,5 L);
22. Régua de 100 cm;
23. Tambor (esterilização do solo);
24. Termómetro;
25. Tesoura;
26. Tubos de ensaio contendo plântulas de mandioca das variedades “Chinhembwe” e “6 Meses”;
27. Vasos plásticos (sacos).

6.3. Soluções preparadas

1. 3 litros de água destilada estéril;
2. 3 litros de solução de NPK 12:24:12. Preparado dissolvendo-se 2 gramas de NPK 12:24:12 (grãos) em 1 litro de água destilada estéril (Segovia *et al.*, 2002);
3. 1 litro de solução de cipermetrina. Preparado diluindo 1 ml do insecticida cipermetrina concentrado em 1 litro da água da torneira.

6.4. Procedimentos:

6.4.1. Preparação das câmaras de humidade:

Para se providenciar um ambiente, com elevados níveis de humidade relativa, ideal na fase inicial da aclimatização (IITA, 2002), foram preparadas 6 câmaras de humidade (Figura 10A do Anexo A) para cada variedade (12 câmaras de humidade no total).

6.4.2. Preparação dos substratos de transplante:

Preparou-se três substratos diferentes: Hygro-mix+Vermiculite (HV) - misturando-se hygro-mix com vermiculite numa proporção de 3:1; Vermiculite+Estrume animal (VE) - misturando-se vermiculite com estrume animal, previamente esterilizado na autoclave a uma temperatura de 132°C e pressão de 2 Kg/cm² durante 15 minutos, numa proporção de 3:1 e Solo arenoso+Estrume animal (SE) - misturando-se o solo arenoso com estrume animal numa proporção de 3:1, seguido de posterior esterilização pelo vapor do fogo produzido a base da lenha.

De seguida, para cada variedade, encheu-se 6 bandejas de transplante subdivididos em 2 bandejas de transplante para cada substrato.

6.4.3. Aplicação do fertilizante NPK 12:24:12:

Para cada variedade, as 6 bandejas com substrato foram divididas em 2 grupos A e B de 3 bandejas por cada, regou-se os substratos do grupo A com água da torneira e aos do grupo B regou-se com uma solução de 2 g/L de NPK 12:24:12 (0,5 L da solução por cada bandeja contendo substrato).

6.4.4. Transferência e aclimatização das plântulas produzidas *in vitro*:

As plântulas enraizadas, com 5 a 7 cm de altura, obtidas via *in vitro* foram retiradas individualmente dos tubos de ensaio com ajuda de uma peça, lavadas com água corrente (da torneira) para a remoção do agar (Figura 10B do Anexo A) (Segovia *et al.*, 2002) e transferidas para bandejas de transplante contendo os substratos previamente preparados (HV; VE e SE) (Figura 11A do Anexo A) a razão de 30 plântulas por cada bandeja de transplante e etiquetadas (nome da variedade; data de transplante e o tratamento a que foi submetido).

Após o transplante, introduziu-se as bandejas contendo plântulas em câmaras de humidade (uma bandeja de transplante para cada câmara de humidade) e regou-se as plântulas (Figura 11B do Anexo A) e as paredes de cada câmara com água da torneira e depois com uma solução de cipermetrina como forma de prevenir a ocorrência de patógenos (fungos; bactérias e nemátodos) (IITA, 1998; IITA, 2002 & Segovia *et al.*,

2002). Seguidamente, selou-se as câmaras por forma a garantirem-se altos níveis de humidade (IITA, 2002) e com ajuda de cordas suspendeu-se dentro da estufa (Figura 12 do Anexo A).

De seguida procedeu-se a redução gradual da humidade relativa por abertura de furos e janelas no plástico da câmara (IITA, 2002): 3 furos (± 1 cm de Θ) 8 DDT (dias depois do transplante); 1ª janela (± 14 cm de Θ) 11 DDT; 2ª janela (± 14 cm de Θ^1) 14 DDT e remoção da câmara de humidade 16 DDT; depois transferiu-se as plantas das bandejas de transplante para os vasos plásticos pretas (14X7 cm) contendo solo e deixou-se numa sombrite 22 DDT e finalmente transferiu-se para o campo definitivo 52 DDT (Tabela 6 do Anexo C).

6.4.5. Observação e controle das plantas:

O ensaio foi controlado regularmente, tendo em atenção as taxas de sobrevivência, aparência e vigor no crescimento das plantas. Também procedeu-se a análise do crescimento por via da medição da área foliar; peso fresco (das folhas e das raízes), comprimento da raiz e por contagem do número de folhas e de raízes.

6.5. Parâmetros medidos e seus métodos

- Número de folhas e de raízes - por contagem directa nas plantas, medidos em 3 períodos da experiência: Fase 1 = período antes do transplante (depois da remoção do agar - meio de cultura); Fase 2 = depois da remoção das câmaras de humidade, durante a transferência para o solo (22 DDT) e Fase 3 = no fim da experiência (52 DDT).
- Determinação da área foliar - feita usando o Leaf Area Meter no fim da experiência (52 DDT).
- Determinação do peso fresco das folhas e das raízes - feita usando uma balança analítica, no fim da experiência (52 DDT).
- A medição do comprimento das raízes foi feita - usando uma régua graduada de 50 cm, no fim da experiência (52 DDT).

¹ Diâmetro

- A taxa de sobrevivência - determinada no fim da experiência (52 DDT) usando a fórmula:

$$\% \text{ de Sobrevivência} = \frac{\text{número de plantas sobreviventes}}{\text{número total de plântulas transferidas}} * 100$$

6.6. Delineamento experimental

O ensaio foi montado obedecendo o modelo de delineamento completamente casualizado considerando as condições (temperatura; humidade relativa; luz e fotoperíodo) homogêneas num esquema factorial de 2X6 [2 variedades e 6 tratamentos (presença ou ausência de NPK 12:24:12 em 3 tipos de substratos de transplante)] com 30 plântulas por variedade para cada um dos tratamentos.

6.7. Análise estatística

Foram usados os pacotes estatísticos STATISTIX versão 2.0 para analisar os dados relativos as variedades "Chinhembwe" e "6 Meses", e SAEG versão 5.0 para as interações entre os factores tipo de substrato; tipo de variedade e aplicação do NPK 12:24:12, onde para a análise do crescimento das plantas e foi usada a Análise de Variância (ANOVA). A comparação das diferenças nos padrões de crescimento das plantas em cada variedade foi feita através do teste de Tukey (HSD) a 5%, e para as interações foi usado o teste de Duncan a 5% (Flower & Cohen, 1996).

Antes de serem analisados, os dados foram transformados para arcseno da raiz quadrada da variável (x) mais 0,1 [$\arcsen(\sqrt{x + 0.1})$] para se garantir que a sua distribuição fosse normal, e depois seguiu-se a Análise de Variância (ANOVA) (Gomez e Gomez, 1984).

7. Resultados e Discussão

7.1. Resultados

As plantas da variedade “Chinhembwe” tiveram melhor adaptação que as da variedade “6 Meses”, além disso, eram mais vigorosas e morfológicamente robustas. Contudo, influência dos substratos e da aplicação do fertilizante (NPK 12:24:12) na sobrevivência ou crescimento das plantas durante a aclimatização foi similar em ambas variedades. A mortalidade das plantas ocorreu entre os primeiros 5 e 10 DDT (dias depois do transplante) nos substratos HV e SE e depois desse período, até ao fim da experiência (52 DDT) a situação estabilizou-se. No substrato VE o período da mortalidade de plantas prolongou-se até aos 22 DDT, altura em que se transferiu as plantas para solo. Na tabela 3 são apresentadas algumas observações relacionadas com o efeito dos substratos no desenvolvimento das plantas durante a experiência.

Tabela 3: Efeito dos diferentes substratos no desenvolvimento das plantas no decurso do ensaio, onde SE é Solo arenoso+Estrume animal; HV = Hygro-mix+Vermiculite e VE = Vermiculite+Estrume animal.

Tipo Substrato	Observações				
	Sanidade	Vigor das plantas	Cor das folhas	Adaptação das plantas ao substrato	Crescimento das plantas
SE	Contaminação por fungos.	Alto	Normal	Moderada	Bom
HV	Não houve contaminação	Alto	Normal	Rápida	Bom
VE	Não houve contaminação	Baixo (plantas raquíticas)	Verde pálido amarelado	Muito lenta	Fraco

7.1.1. Efeito dos factores tipo de substrato, aplicação de NPK 12:24:12 e tipo de variedade na sobrevivência e no crescimento das plantas de mandioca produzidas *in vitro* durante a aclimatização *ex vitro*

a) Taxas de sobrevivência nas variedades “Chinhembwe” e “6 Meses”

De acordo com a Figura 2, as duas variedades registaram taxas de sobrevivência baixas (<35%) nos tratamentos SE-0 e VE-0 e VE-1 dos substratos Solo arenoso+Estrume animal e Vermiculite+Estrume animal respectivamente, contrastando com os tratamentos

(HV-0 e HV-1) do substrato Hygro-mix+Vermiculite onde a sobrevivência foi alta (>70%). No tratamento SE-1 do substrato Solo arenoso+Estrume animal a sobrevivência foi de 66,7 e 53,3% para as variedades “Chinhembwe” e “6 Meses” respectivamente (Tabela 7 do Anexo D).

O comportamento das variedades foi igualmente semelhante face a aplicação do NPK 12:24:12, tendo os tratamentos com NPK 12:24:12 (SE-1; HV-1 e VE-1) promovido maior sobrevivência das plantas em comparação com os tratamentos sem NPK 12:24:12 (SE-0; HV-0 e VE-0) (Figura 2 e Tabela 7 do Anexo D). De um modo geral, para cada substrato, a diferença entre o tratamento com e sem NPK 12:24:12 foi baixa, a exceção do substrato SE onde foi alta (56,7 e 30% para as variedades “Chinhembwe” e “6 Meses” respectivamente).

A variedade “6 Meses” apenas registou maior sobrevivência que “Chinhembwe” no tratamento SE-0 (substrato Solo arenoso+Estrume animal), nos restantes tratamentos esta ultima registou maiores taxas, ainda que a diferença entre elas tenha sido baixa (Figura 2 e Tabela 7 do Anexo D).

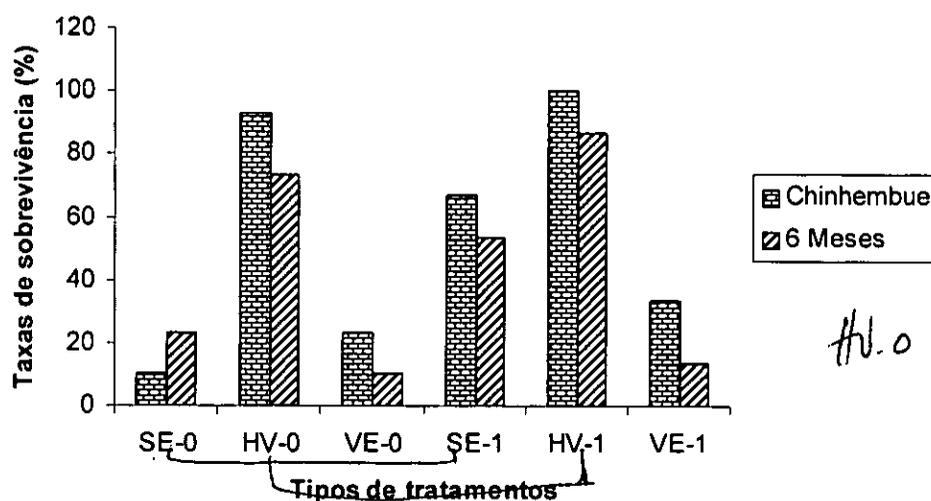


Figura 2. Efeito dos factores tipo de substrato, aplicação de NPK 12:24:12 e tipo de variedade na sobrevivência de plantas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) das variedades “Chinhembwe” e “6 Meses” produzidas *in vitro*, durante aclimatização *ex vitro*. Cada barra representa a percentagem de sobrevivência por tratamento [SE-0 (Solo arenoso+Estrume animal sem NPK 12:24:12); HV-0 (Hygro-mix+Vermiculite sem NPK 12:24:12); VE-0 (Vermiculite+Estrume animal sem NPK 12:24:12); SE-1

(Solo arenoso+Estrume animal com NPK 12:24:12); HV-1 (Hygro-mix+Vermiculite com NPK 12:24:12) e VE-1 (Vermiculite+Estrume animal com NPK 12:24:12)].

b) Área foliar

A área foliar mostrou um comportamento similar nas variedades “Chinhembwe” e “6 Meses”, onde as médias mais elevadas registaram-se no substrato Hygro-mix+Vermiculite (Figura 3), que apesar disso, não diferiu estatisticamente dos substratos Solo arenoso+Estrume animal e Vermiculite+Estrume animal nas duas variedades (ANOVA, $P>0,05$).

Apesar da aplicação de NPK 12:24:12 nos substratos ter promovido uma ligeira expansão foliar, tanto numa como noutra variedade, não se registaram diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos (ANOVA, $P>0,05$).

A figura 3 mostra ainda que as áreas foliares foram maiores na variedade “chinhembwe” em comparação com a variedade “6 Meses”.

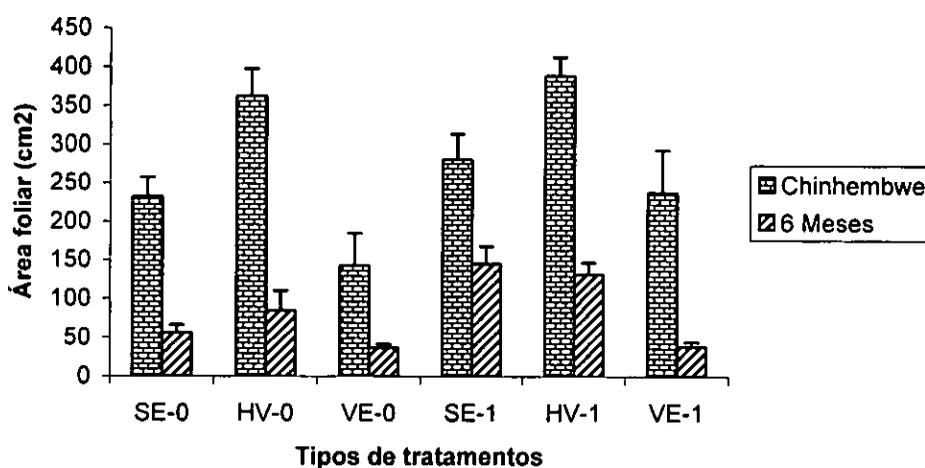


Figura 3. Efeito dos factores tipo de substrato, aplicação de NPK 12:24:12 e tipo de variedade na área foliar das plantas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) das variedades “Chinhembwe” e “6 Meses” produzidas *in vitro*, durante aclimatização *ex vitro*. Cada barra representa a média de três plantas por tratamento [SE-0 (Solo arenoso+Estrume animal sem NPK 12:24:12); HV-0 (Hygro-mix+Vermiculite sem NPK 12:24:12); VE-0 (Vermiculite+Estrume animal sem NPK 12:24:12); SE-1 (Solo arenoso+Estrume animal com NPK 12:24:12); HV-1 (Hygro-mix+Vermiculite com NPK 12:24:12) e VE-1 (Vermiculite+Estrume animal com NPK 12:24:12)].

c) Comprimento das raízes

A Figura 4 mostra que as raízes tiveram maior comprimento nos substratos Hygro-mix+Vermiculite (tratamento HV-1) e Solo arenoso+Estrume animal (tratamento SE-1) para as variedades “Chinhembwe” e “6 Meses”, respectivamente. Na variedade “Chinhembwe” as diferenças no comprimento das raízes nos substratos não foram significativas (ANOVA, $P>0,05$). No entanto, na variedade “6 Meses” as diferenças foram significativas (ANOVA, $P<0,05$). As médias do comprimento das raízes na variedade “6 Meses” diferiram estatisticamente nos substratos, tendo as plantas dos substratos Hygro-mix+Vermiculite e Solo arenoso+Estrume animal apresentado raízes mais compridas que as plantas do substrato Vermiculite+Estrume animal segundo o teste de Tukey (HSD) a 5% (Tabela 11a do Anexo D).

O tratamento com NPK 12:24:12 não mostrou influência significativa no crescimento das raízes na variedade “Chinhembwe” (ANOVA, $P>0,05$). Na variedade “6 Meses” a aplicação de NPK 12:24:12 promoveu, significativamente, o crescimento das raízes (ANOVA, $P<0,05$), tendo a comparação das médias do comprimento das raízes, nesta variedade, mostrado diferenças significativas, em que o tratamento com NPK 12:24:12 apresentou maior crescimento das raízes que o tratamento sem NPK 12:24:12 segundo o teste de Tukey (HSD) a 5% (Tabela 11b do Anexo D).

A variedade “Chinhembwe” registou valores do comprimento de raízes mais elevados em relação a variedade “6 Meses”, com exceção dos tratamentos SE-1 (substrato Solo arenoso+Estrume animal) e VE-1 (substrato Vermiculite+Estrume animal) onde a variedade “6 Meses” superou a “Chinhembwe”.

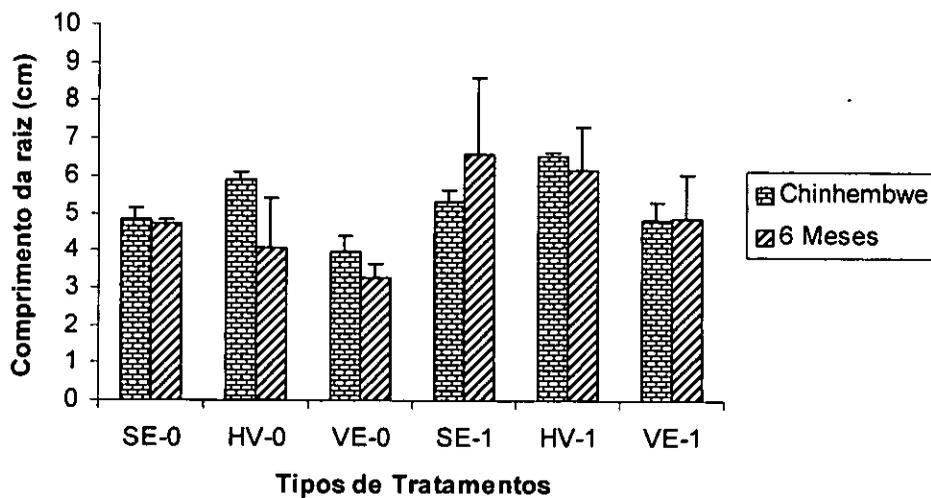


Figura 4. Efeito dos factores tipo de substrato, aplicação de NPK 12:24:12 e tipo de variedade no comprimento das raízes das plantas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) das variedades "Chinhembwe" e "6 Meses" produzidas *in vitro*, durante a aclimatização *ex vitro*. Cada barra representa a média de três plantas por tratamento [SE-0 (Solo arenoso+Estrume animal sem NPK 12:24:12); HV-0 (Hygro-mix+Vermiculite sem NPK 12:24:12); VE-0 (Vermiculite+Estrume animal sem NPK 12:24:12); SE-1 (Solo arenoso+Estrume animal com NPK 12:24:12); HV-1 (Hygro-mix+Vermiculite com NPK 12:24:12) e VE-1 (Vermiculite+Estrume animal com NPK 12:24:12)].

d) Peso fresco das folhas

Nas duas variedades o peso fresco das folhas teve maiores médias nos substratos Hygro-mix+Vermiculite e Solo arenoso+Estrume animal, tendo os valores mais elevados se registado nos substratos Hygro-mix+Vermiculite (tratamento HV-1) e Solo arenoso+Estrume animal (tratamento SE-1) para as variedades "Chinhembwe" e "6 Meses" respectivamente (Figura 5). No entanto, tanto numa como noutra variedade, não houve diferenças estatisticamente significativas nos substratos em termos de peso fresco das folhas (ANOVA, $P > 0,05$).

Os tratamentos com NPK 12:24:12 apresentaram maiores médias de peso fresco das folhas, mas não foram estatisticamente diferentes dos tratamentos sem NPK 12:24:12 (ANOVA, $P > 0,05$).

Em todos os tratamentos a variedade “Chinhembwe” apresentou maiores médias de peso fresco das folhas em relação a variedade “6 Meses”.

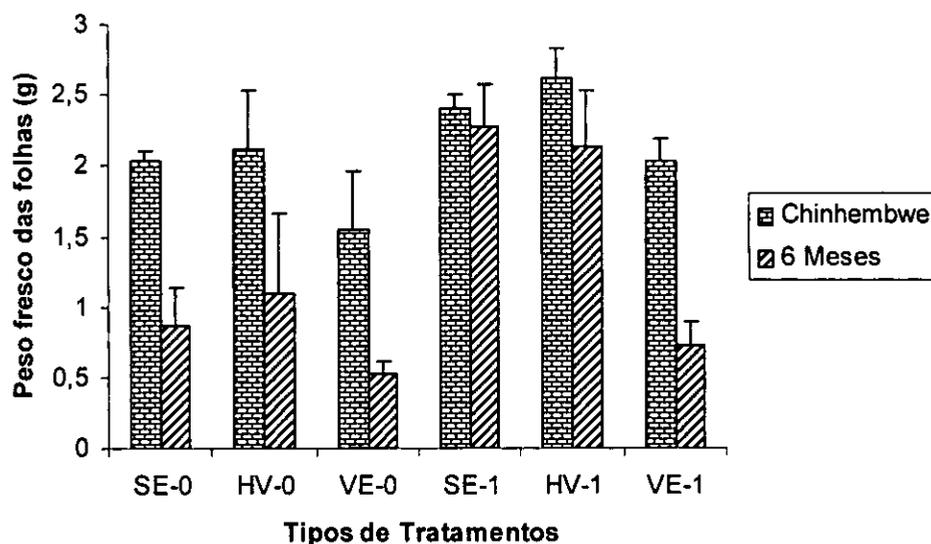


Figura 5. Efeito dos factores tipo de substrato, aplicação de NPK 12:24:12 e tipo de variedade no peso fresco das folhas das plantas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) das variedades “Chinhembwe” e “6 Meses” produzidas *in vitro*, durante a aclimatização *ex vitro*. Cada barra representa a média de três plantas por tratamento [SE-0 (Solo arenoso+Estrume animal sem NPK 12:24:12); HV-0 (Hygro-mix+Vermiculite sem NPK 12:24:12); VE-0 (Vermiculite+Estrume animal sem NPK 12:24:12); SE-1 (Solo arenoso+Estrume animal com NPK 12:24:12); HV-1 (Hygro-mix+Vermiculite com NPK 12:24:12) e VE-1 (Vermiculite+Estrume animal com NPK 12:24:12)].

e) Peso fresco das raízes

O peso fresco das raízes foi maior nos substratos Solo arenoso+Estrume animal e Hygro-mix+Vermiculite nas duas variedades (“Chinhembwe” e “6 Meses”), a excepção do tratamento HV-0 do substrato Hygro-mix+Vermiculite em que na variedade “6 Meses” o valor do peso fresco das raízes registado foi baixo, tendo sido próximo dos valores registados no substrato Vermiculite+Estrume animal nas duas variedades (Figura 6). Nas duas variedades não se registaram diferenças significativas no peso fresco das raízes nos diferentes substratos (ANOVA, $P > 0,05$)

Os tratamentos com NPK 12:24:12 apresentaram pesos fresco das raízes relativamente maiores que os dos tratamentos sem NPK 12:24:12. No entanto, não se verificaram diferenças significativas entre os tratamentos (ANOVA, $P > 0,05$).

O peso fresco das raízes foi maior na variedade “Chinhembwe” em quase todos os substratos exceptuando o tratamento SE-1 do substrato Solo arenoso+Estrume animal, onde o peso fresco das raízes foi mais elevado na variedade “6 Meses”.

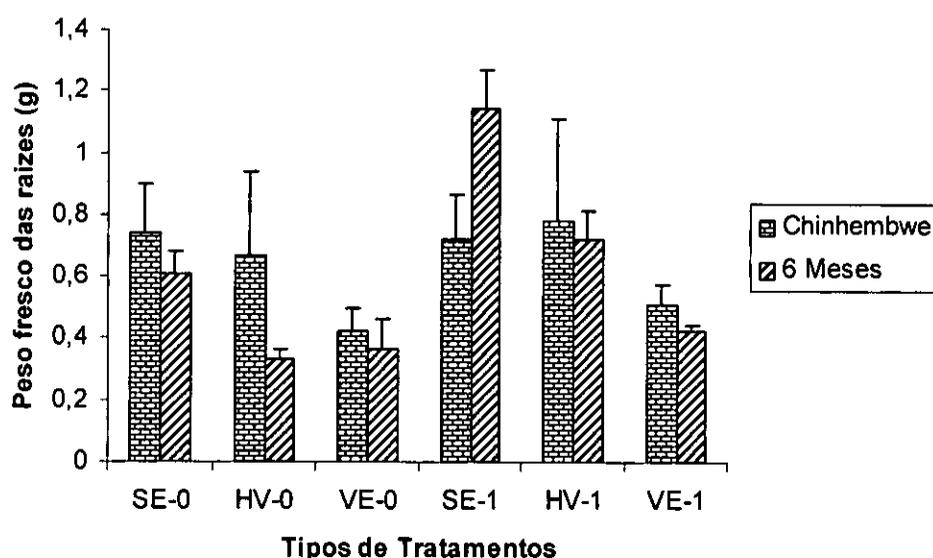


Figura 6. Efeito dos factores tipo de substrato, aplicação de NPK 12:24:12 e tipo de variedade no peso fresco das raízes das plantas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) das variedades “Chinhembwe” e “6 Meses” produzidas *in vitro*, durante a aclimatização *ex vitro*. Cada barra representa a média de três plantas por tratamento [SE-0 (Solo arenoso+Estrume animal sem NPK 12:24:12); HV-0 (Hygro-mix+Vermiculite sem NPK 12:24:12); VE-0 (Vermiculite+Estrume animal sem NPK 12:24:12); SE-1 (Solo arenoso+Estrume animal com NPK 12:24:12); HV-1 (Hygro-mix+Vermiculite com NPK 12:24:12) e VE-1 (Vermiculite+Estrume animal com NPK 12:24:12)].

f) Número de folhas

Nas duas variedades o número de folhas mostrou um aumento mais ou menos linear em todos os substratos, com as médias mais elevadas a registarem-se no substrato Hygro-mix+Vermiculite e as mais baixas no substrato Vermiculite+Estrume animal (Figura 7.1 e Figura 7.2). Houve diferenças significativas no aumento de número de folhas nos substratos (ANOVA, $P < 0,05$). A comparação das médias mostrou que o aumento do

número das folhas no substrato Solo arenoso+Estrume animal foi estatisticamente igual aos substratos Hygro-mix+Vermiculite e Vermiculite+Estrume animal, embora estes dois últimos substratos tenham sido estatisticamente diferentes entre si, tendo o substrato Hygro-mix+Vermiculite apresentado maior número de folhas que o substrato Vermiculite+Estrume animal segundo o teste de Tukey (HSD) a 5% (Tabelas 10a e 11a do Anexo D).

Os tratamentos com NPK 12:24:12 promoveram o aumento de número de folhas nas plantas em relação aos tratamentos sem NPK 12:24:12, mas não houve diferenças significativas entre os tratamentos (ANOVA, $P > 0,05$).

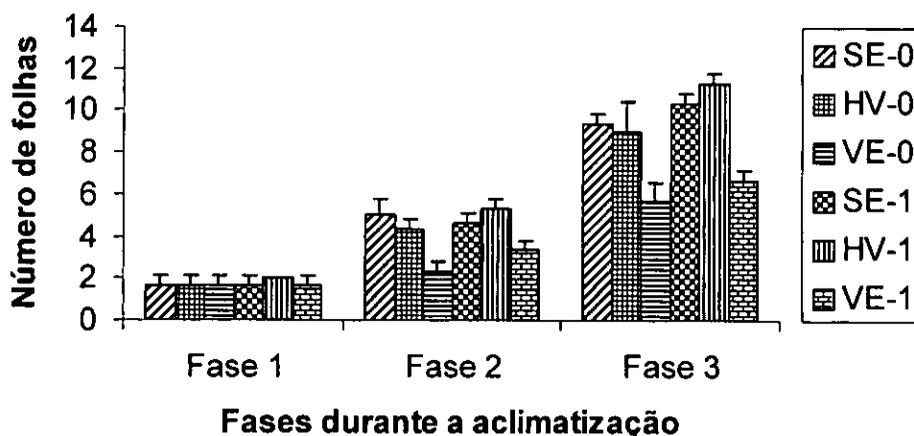


Figura 7.1. Efeito dos factores tipo de substrato, aplicação de NPK 12:24:12 e tipo de variedade no número de folhas das plantas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) da variedade "Chinhembwe" produzidas *in vitro*, durante a aclimatização *ex vitro*. Cada barra representa a média de três plantas por tratamento [SE-0 (Solo arenoso+Estrume animal sem NPK 12:24:12); HV-0 (Hygro-mix+Vermiculite sem NPK 12:24:12); VE-0 (Vermiculite+Estrume animal sem NPK 12:24:12); SE-1 (Solo arenoso+Estrume animal com NPK 12:24:12); HV-1 (Hygro-mix+Vermiculite com NPK 12:24:12) e VE-1 (Vermiculite+Estrume animal com NPK 12:24:12)], onde Fase 1 = período antes do transplante; Fase 2 = período da transferência ao solo, após a remoção das câmaras de humidade (22 DDT) e Fase 3 = no fim do experiência (52 DDT).

As duas variedades apresentaram uma variação mais ou menos similar do número de folhas, tendo a fase 3 registado o maior número de folhas em relação as outras (Figura 7.1 e Figura 7.2). Nas duas variedades houve diferenças significativas no número de folhas entre as três fases da aclimatização (ANOVA, $P < 0,05$). A comparação das médias

mostrou que as três fases foram estatisticamente diferentes (uma da outra) no número de folhas, tendo a fase 3 apresentado maior número de folhas que a fase 2 e a fase 1 e a fase 2 maior que a fase 1, segundo o teste de Tukey (HSD) a 5% (Tabelas 10c e 11c do Anexo D).

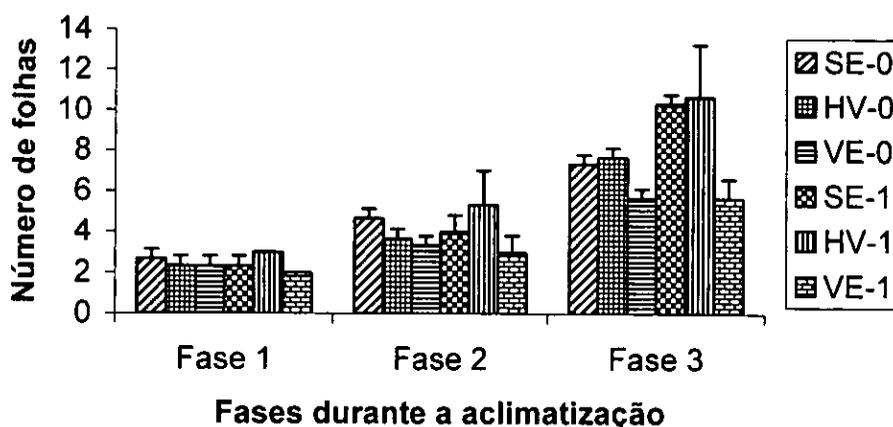


Figura 7.2. Efeito dos factores tipo de substrato, aplicação de NPK 12:24:12 e tipo de variedade no número de folhas das plantas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) da variedade “6 Meses” produzidas *in vitro*, durante a aclimatização *ex vitro*. Cada barra representa a média de três plantas por tratamento [SE-0 (Solo arenoso+Estrume animal sem NPK 12:24:12); HV-0 (Hygro-mix+Vermiculite sem NPK 12:24:12); VE-0 (Vermiculite+Estrume animal sem NPK 12:24:12); SE-1 (Solo arenoso+Estrume animal com NPK 12:24:12); HV-1 (Hygro-mix+Vermiculite com NPK 12:24:12) e VE-1 (Vermiculite+Estrume animal com NPK 12:24:12)], onde Fase 1 = período antes do transplante; Fase 2 = período da transferência ao solo, após a remoção das câmaras de humidade (22 DDT) e Fase 3 = no fim do experiência (52 DDT).

g) Número de raízes

A semelhança do número de folhas, o aumento do número de raízes, também, caracterizou-se por um aumento linear em todos os substratos, tendo os substratos Hygro-mix+Vermiculite e Solo arenoso+Estrume animal registado maior número de raízes em relação ao substrato Vermiculite+Estrume animal (Figura 8.1 e Figura 8.2). Os substratos mostraram diferenças significativas no que se refere ao aumento do número de raízes em todas variedades (ANOVA, $P < 0,05$). A comparação das médias na variedade “6 Meses” mostrou que embora o aumento do número das folhas no substrato Solo arenoso+Estrume animal tenha sido estatisticamente igual aos substratos Hygro-mix+Vermiculite e Vermiculite+Estrume animal, estes dois últimos diferiram estatisticamente entre si, tendo o substrato Hygro-mix+Vermiculite apresentado maior número de folhas que o substrato

Vermiculite+Estrume animal segundo o teste de Tukey (HSD) a 5% (Tabela 11a do Anexo D). Na variedade "Chinhembwe", pelo teste de Tukey (HSD) a 5% (Tabelas 10a do Anexo D), os substratos Hygro-mix+Vermiculite e Solo arenoso+Estrume animal superaram, significativamente, em relação ao substrato Vermiculite+Estrume animal, no entanto estes dois substratos não diferiram entre si apesar do substrato Hygro-mix+Vermiculite ter apresentado uma média mais elevada que o substrato Solo arenoso+Estrume animal.

Os tratamentos com NPK 12:24:12 promoveram um aumento de raízes nas plantas em relação aos tratamentos sem NPK 12:24:12, mas as diferenças entre esses tratamentos, não foram estatisticamente significativas nas duas variedades (ANOVA, $P > 0,05$).

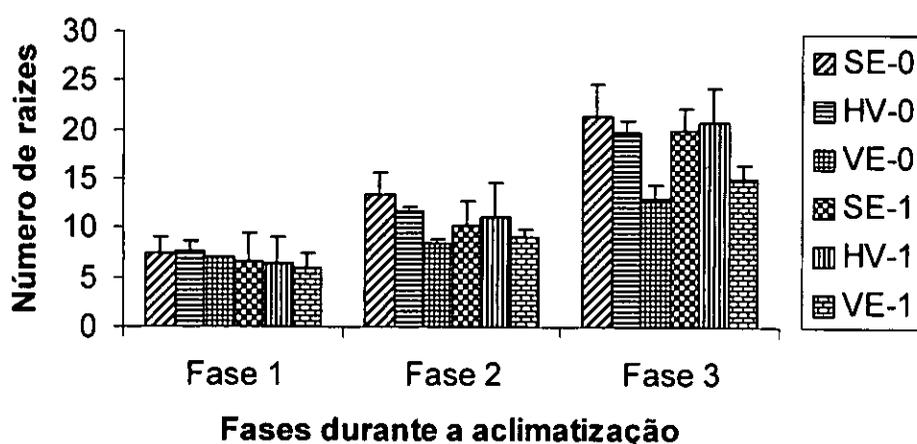


Figura 8.1 Efeito dos factores tipo de substrato, aplicação de NPK 12:24:12 e tipo de variedade no número de raízes das plantas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) da variedade "Chinhembwe" produzidas *in vitro*, durante a aclimatização *ex vitro*. Cada barra representa a média de três plantas por tratamento [SE-0 (Solo arenoso+Estrume animal sem NPK 12:24:12); HV-0 (Hygro-mix+Vermiculite sem NPK 12:24:12); VE-0 (Vermiculite+Estrume animal sem NPK 12:24:12); SE-1 (Solo arenoso+Estrume animal com NPK 12:24:12); HV-1 (Hygro-mix+Vermiculite com NPK 12:24:12) e VE-1 (Vermiculite+Estrume animal com NPK 12:24:12)], onde Fase 1 = período antes do transplante; Fase 2 = período da transferência ao solo, após a remoção das câmaras de humidade (22 DDT) e Fase 3 = no fim do experiência (52 DDT).

Em todos os tratamentos o maior número de raízes registou na fase 3 e o menor na fase 1 (Figura 8.1 e Figura 8.2). Houve diferenças significativas no número de raízes nas fases de aclimatização (ANOVA, $P < 0,05$). As médias do número de raízes nas fases 1; 2 e 3

não mostraram diferenças significativas entre elas, tendo a fase 3 apresentado maior número de folhas que a fase 2 e a fase 1 e a fase 2 maior que a fase 1, segundo o teste de Tukey (HSD) a 5% (Tabelas 10c e 11c do Anexo D).

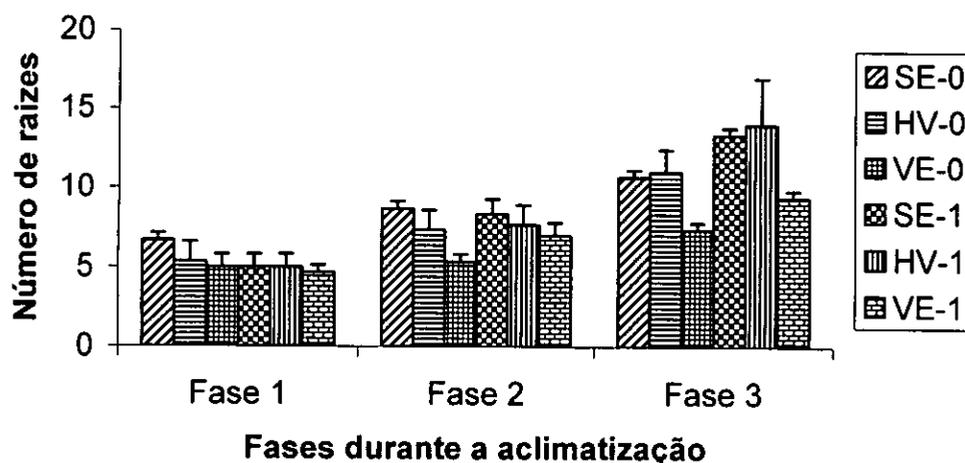


Figura 8.2. Efeito dos factores tipo de substrato, aplicação de NPK 12:24:12 e tipo de variedade no número de raízes das plantas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) da variedade “6 Meses” produzidas *in vitro*, durante a aclimatização *ex vitro*. Cada barra representa a média de três plantas por tratamento [SE-0 (Solo arenoso+Estrume animal sem NPK 12:24:12); HV-0 (Hygro-mix+Vermiculite sem NPK 12:24:12); VE-0 (Vermiculite+Estrume animal sem NPK 12:24:12); SE-1 (Solo arenoso+Estrume animal com NPK 12:24:12); HV-1 (Hygro-mix+Vermiculite com NPK 12:24:12) e VE-1 (Vermiculite+Estrume animal com NPK 12:24:12)], onde Fase 1 = período antes do transplante; Fase 2 = período da transferência ao solo, após a remoção das câmaras de humidade (22 DDT) e Fase 3 = no fim do experiência (52 DDT).

7.1.2. Efeito das interacções dos factores tipo de substrato, aplicação de NPK 12:24:12 e tipo de variedade na sobrevivência e no crescimento das plantas de mandioca produzidas *in vitro* durante a aclimatização *ex vitro*.

Na interacção SUB*NPK, os substratos Hygro-mix+Vermiculite e Solo arenoso+Estrume animal interagiram com o NPK favorecendo a sobrevivência das plantas (>50%), enquanto na interacção VE*NPK a sobrevivência foi baixa (<35%). Na interacção SUB*VAR, os substratos Hygro-mix+Vermiculite (HV-1 e HV-0); Solo arenoso+Estrume animal (SE-1 e SE-0) e Vermiculite+Estrume animal (VE-0) interagiram com a variedade “Chinhembwe” promovendo maior sobrevivência que a interacção SUB*“6 Meses”, a excepção verificou-se na interacção VE-0*“6 Meses” em

que a sobrevivência desta superou a da interação SUB*“Chinhembwe” (Tabela 7 do Anexo D). A tendência do efeito da interação VAR*NPK na sobrevivência não foi clara. A área foliar, o peso fresco das folhas e das raízes bem como o número das folhas e das raízes, foram igualmente favorecidas pela interação SUB*NPK, tendo se verificado uma promoção do desenvolvimento das plantas, demonstrado pelas médias mais elevadas dos parâmetros acima (Tabelas 8 e 9 do Anexo D). Contudo, tanto esta interação como as outras (VAR*NPK e SUB*VAR) não produziram efeitos significativos no crescimento das plantas (ANOVA, $P>0,05$).

A interação SUB*NPK favoreceu um maior crescimento das raízes das plantas em termos de comprimento (Tabela 9 do Anexo D), mas as diferenças não foram significativas (ANOVA, $P>0,05$).

As interações VAR*NPK e SUB*VAR mostraram diferenças significativas em relação ao comprimento das raízes nas plantas (ANOVA, $P<0,05$).

Na interação VAR*NPK, a variedade “6 Meses” com NPK 12:24:12, apesar de ter apresentado a média mais elevada, não diferiu significativamente da variedade “Chinhembwe” com e sem NPK 12:24:12 em relação ao comprimento das raízes, mas diferiu da variedade “6 Meses” sem NPK 12:24:12. esta última por seu turno, apesar de ter registado a média mais baixa, não diferiu significativamente da variedade “Chinhembwe” com e sem NPK 12:24:12, segundo o teste de Duncan a 5% (Tabela 4).

Tabela 4: Efeito da interação VAR*NPK no CR (comprimento da raiz), das plantas de mandioca durante a aclimatização *ex vitro*.

VAR	NPK	CR (cm)
6 Meses	Com NPK	5,86a
Chinhembwe	Com NPK	5,55ab
Chinhembwe	Sem NPK	4,89ab
6 Meses	Sem NPK	4,01 b

Médias seguidas pelas mesmas letras na coluna não diferem entre si ao nível de 5% pelo teste de Duncan

Na interação SUB*VAR, a variedade “Chinhembwe” interagiu com o substrato HV (Hygro-mix+vermiculite) favorecendo o crescimento das raízes, tendo se superiorizado, significativamente, em relação as interações VE*“Chinhembwe” e VE*“6 Meses”. Esta última interação (VE*“6 Meses”), cuja a média (4,08 cm) foi a mais baixa de todas, embora não tenha diferido das interações HV*“6 Meses”; SE*“Chinhembwe” e VE*“Chinhembwe”, foi, significativamente, inferior a interação SE*“6 Meses” no crescimento das raízes. Entre as interações SE*“6 Meses”; HV*“6 Meses”; SE*“Chinhembwe” e VE*“Chinhembwe” não se verificaram diferenças significativas, segundo o teste de Duncan a 5% (Tabela 5).

Tabela 5: Efeito da interação SUB*VAR no CR (comprimento da raiz), das plantas de mandioca durante a aclimatização *ex vitro*, onde HV = Hygro-mix+Vermiculite; SE = Solo arenoso+Estrume animal e VE = Vermiculite+Estrume animal.

VAR	SUB	CR (cm)
Chinhembwe	HV	6,21a*
6 Meses	SÊ	5,64ab
6 Meses	HV	5,11abc
Chinhembwe	SE	5,07abc
Chinhembwe	VE	4,39 bc
6 Meses	VE	4,08 c

*Médias seguidas pelas mesmas letras na coluna não diferem entre si ao nível de 5% pelo teste de Duncan

7.2. Discussão

7.2.1. Efeito dos factores tipo de substrato, aplicação de NPK 12:24:12 e tipo de variedade na sobrevivência e no crescimento das plantas de mandioca produzidas *in vitro* durante a aclimatização *ex vitro*.

a) Efeito do tipo de substrato

Os resultados mostraram que o tipo de substrato usado para transplante influenciou a sobrevivência e o crescimento das plantas durante a aclimatização *ex vitro*.

Nos dados relativos a taxas de sobrevivência (Figura 2 e Tabela 7 do Anexo D), o substrato Hygro-mix+Vermiculite [os tratamentos HV-1 (100 e 86,7%) e HV-0 (93,3 e 73,3%) para as variedades “Chinhembwe” e “6 Meses” respectivamente], promoveu maior índice de sobrevivência de plantas, contrastando com os substratos

Vermiculite+Estrume animal (tratamentos VE-1 e VE-0) e Solo arenoso+Estrume animal (tratamento SE-0) que apresentaram baixa sobrevivência (<35%). Considerando que as taxas de sobrevivência podem estar relacionadas a factores físicos e químicos dos substratos (Franzon *et al.*, 2002), o sucesso do substrato Hygro-mix+Vermiculite pode estar relacionado a sua uniformidade em termos de composição química e física, diferentemente do que pode ocorrer com os substratos Solo arenoso+Estrume animal e Vermiculite+Estrume animal, os quais podem variar nas suas características.

Resultados similares foram observados por Jorge *et al.* (2000a), quando aclimatizavam plântulas da mandioca (*Manihot esculenta*), onde verificaram a influência dos substratos na sobrevivência. Franzon *et al.* (2002) avaliando diferentes substratos durante a aclimatização de plantas micropropagadas do porta-enxerto Marianna 2624 (*Prunus sp.*); Couto *et al.* (2003) na aclimatização de plantas micropropagadas do porta-enxerto Mirabolano 29C (*Prunus cerasifera* EHRH.) e Wagner *et al.* (2002) avaliando os diferentes níveis de vermiculite na aclimatização de plântulas micropropagadas da amoreira-preta (*Rubus spp.*), obtiveram igualmente resultados semelhantes.

Contrariamente, Calvete *et al.* (2000) citados por Couto *et al.* (2003) avaliando o efeito de diferentes substratos na aclimatização *ex vitro* do morangueiro, cultivar Campinas, obtiveram uma percentagem média de 85%, sendo que esta taxa não foi influenciada pelos diferentes substratos e Silva *et al.* (1995) citados por Skrebsky *et al.* (2006), na aclimatização da *Kielmera coreacea*, *Manihot esculenta*, *Ipomoea batatas* e *Rubus idaeus*, observaram que a sobrevivência dependeu da espécie, porém não sofreu influência de nenhum dos substratos testados. Jorge (1997) em mandioca e Moraes *et al.* (2002) em *Dendrobium nobile* Lindl. (Orchidaceae) também não verificaram influência do tipo de substrato na sobrevivência durante a aclimatização *ex vitro*.

Na análise de dados relativos ao crescimento das plantas apenas os parâmetros comprimento da raiz (Figura 4 e Tabelas 9 e 10a do Anexo D) na variedade "Chinhembwe"; o número de folhas (Figuras 7.1 e 7.2 e Tabelas 8; 10a e 11a do Anexo D) e o número de raízes (Figuras 8.1 e 8.2 e Tabelas 8; 10a e 11a do Anexo D) nas duas variedades sofreram influência significativa dos substratos, tendo os substratos Hygro-

mix+Vermiculite e Solo arenoso+Estrume animal respondido com uma melhor performance nos referidos parâmetros em relação ao substrato Vermiculite+Estrume animal, muito embora, no caso do número de folhas, não se tenham verificado diferenças significativas entre os substratos Solo arenoso+Estrume animal e Vermiculite+Estrume animal.

Similarmente, Aldrufeu (1987) citado por Skrebsky *et al.* (2006) na aclimatização de *Pelargonium zonale* e Moraes *et al.* (2002) na aclimatização de *Dendrobium nobile* Lindl. (Orchidaceae) verificaram a influência do tipo de substrato no crescimento da raiz e, em adição, Hartmann *et al.* (1990) citados por Couto *et al.* (2003) reportaram que os principais efeitos dos substratos se manifestam sobre as raízes, podendo acarretar algumas influências sobre o crescimento da parte aérea.

Resultados contrários foram observados por Couto *et al.* (2003), na aclimatização de plantas micropropagadas do porta-enxerto Mirabolano 29C (*Prunus cerasifera* EHRH.), que não verificaram diferenças significativas no tamanho da parte aérea e da raiz entre os diferentes substratos.

Wraight & Wraight (1998) citados por Maciel *et al.* (2002) reportaram que a porosidade; a capacidade de retenção de água e o fornecimento de nutrientes; além da aeração, determinam a arquitetura do sistema radicular; o crescimento da planta e a sua adaptação as condições *ex vitro*. Estes resultados suportam os observados neste estudo atendendo as características de cada um dos substratos testados.

O substrato Hygro-mix+Vermiculite, composto por hygro-mix e vermiculite usado na proporção de 3:1, é leve; poroso; apresenta uma adequada drenagem e aeração e contém um ótimo conteúdo nutritivo, além da alta capacidade de retenção de água providenciada em parte pelo vermiculite (Moraes *et al.*, 2002; Maciel *et al.*, 2002; Zok *et al.*, 1993 citados por Souza *et al.*, 2005 & Kämpf, 2000 citado por Martin *et al.*, 2006).

Acrescente-se que, os dois materiais (hygro-mix e vermiculite) são de baixa densidade o que é de extrema importância para o bom desenvolvimento das plântulas, já que para

Martin *et al.* (2006) a baixa densidade permite que as raízes possam desenvolver-se livremente, com poucas restrições, e dessa forma, permite que a porosidade; a quantidade de água livre e o espaço aéreo sejam aumentados. Estas características terão, provavelmente, contribuído, para obtenção de melhores resultados de sobrevivência e crescimento das plantas verificados neste substrato.

Por outro lado, o hygro-mix (em maior proporção no substrato Hygro-mix+Vermiculite), um composto orgânico normalmente usado para germinação de sementes e que constitui uma fonte nutritiva do substrato, paralelamente ao vermiculite, apresenta uma boa aeração, propriedade considerada, a par da drenagem, como chave na aclimatização *ex vitro* (IITA, 2002) atendendo que permite uma maior difusão de O₂ para as raízes; boa capacidade de armazenamento de água; baixa resistência à penetração das raízes e boa resistência à perda de estrutura (Silva Júnior & Visconti, 1991 & Sousa *et al.*, 1995 citados por Martin *et al.*, 2006). A sustentar estes factos refira-se que Adediran & Awolowo (2005) reportaram uma germinação de sementes de tomate na ordem dos 95% em uma semana, usando como substrato o hygro-mix.

O substrato Solo arenoso+Estrume animal, composto pelo solo arenoso e estrume animal usado na proporção de 3:1 registou taxas de sobrevivência muito baixas no tratamento SE-0 (10 e 23,3%) e médias no tratamento SE-1 (66,7 e 53,3%) para as variedades "Chinhembwe" e "6 Meses" respectivamente. O solo arenoso (em maior proporção no substrato Solo arenoso+Estrume animal) caracteriza-se por ser pobre em matéria orgânica; possuir baixa fertilidade e capacidade de retenção de água e de nutrientes (INIA/DTA, 1993), além de apresentar densidades relativamente altas para produção de mudas (Skrebsky *et al.*, 2006) tendo em conta que as altas densidades do substrato podem prejudicar o crescimento das raízes (De Boodt & Verdonck, 1972 citados por Skrebsky *et al.*, 2006).

Segundo Kämpf (2000) citado por Skrebsky *et al.* (2006), embora o substrato possa ser formado por um único material, dificilmente será encontrado um que suprirá todas as características positivas necessárias, daí que, os substratos em geral representam a

mistura de dois ou mais materiais, sendo que um destes, o condicionador de substratos, irá promover a correção das características de forma a otimizar as condições de uso.

A baixa sobrevivência de plantas verificada no substrato Solo arenoso+Estrume animal contrasta com o esperado, considerando que a inclusão do estrume, neste substrato, objectivou a correção das deficiências do solo arenoso em termos de fertilidade e capacidade de retenção de água e de nutrientes, por forma a otimizar o substrato em referência, já que para IITA (1998) o solo arenoso apresenta boa porosidade; drenagem e aeração adequadas. A avaliação dos parâmetros de crescimento (Figuras 3; 4; 5; 6; 7.1; 7.2; 8.1 e 8.2 e Tabelas 8; 9; 10a e 11a do Anexo D) neste substrato mostrou boa performance das plantas sobreviventes. Isto pode indicar que a baixa sobrevivência verificada, possivelmente, está relacionada com acção de fungos, tendo em conta que este substrato foi infectado por fungos (Tabela 3).

Saliente-se em adição que o solo e o estrume animal não são materiais estéreis necessitando, de acordo com IITA (1998), uma prévia esterilização para prevenir a ocorrência de patógenos (fungos, bactérias, nemátodos e outros). Em face dos resultados mostrados na tabela 3, admite-se que a esterilização do substrato Solo arenoso+Estrume animal não terá sido eficiente.

O substrato Vermiculite+Estrume animal, composto por vermiculite e estrume animal na proporção de 3:1, mostrou-se menos adequado para a aclimatização de plântulas. Isto deve se, possivelmente, a provável baixa reserva nutricional deste substrato atendendo que substratos inorgânicos, como vermiculite (em maior proporção no substrato Vermiculite+Estrume animal), possuem pouca reserva de nutrientes (Loach, 1998), além de não possuir matéria orgânica e apresentar uma capacidade de suporte baixa (De Boodt & Verdonck, 1972 citados por Martin *et al.*, 2006), funcionando nas combinações como condicionador em termos de melhor retenção de água e aeração (Zok *et al.*, 1993 citados por Souza *et al.*, 2005 e Túlio Júnior *et al.*, 1986 citados por Martin *et al.*, 2006).

Além disso, de acordo com Moraes *et al.* (2002) o vermiculite proporciona o excesso de água às plântulas limitando a disponibilidade de O₂ causando uma redução do seu

desenvolvimento vegetativo. Kämpf (2000) citado por Martin *et al.* (2006) acrescenta que, para além da alta capacidade de retenção de água, o vermiculite possui alto poder tampão, mas como desvantagem possui baixa estabilidade de estrutura.

Refira-se ainda que, o estrume adicionado no substrato por razões de fertilidade (IITA, 1998) caracteriza por, também, possuir alta capacidade de retenção de água, tendo possivelmente, contribuído para o aumento da quantidade de água disponível para as plantas no substrato Vermiculite+Estrume animal. Esta situação terá, provavelmente, comprometido a adaptação e o desenvolvimento das plantas neste substrato, considerando que o excesso de água, segundo Martin *et al.* (2006), ocasiona a ocorrência de problemas referentes as trocas gasosas das raízes.

Os resultados verificados no substrato Vermiculite+Estrume animal, embora contrastem com os de Lê & Collet (1991) citados por Maciel *et al.* (2002) que observaram maior comprimento das raízes em substratos com menores teores de nutrientes, estão de acordo com os de Hoffman *et al.* (1999) citados por Wagner *et al.* (2002) que concluíram que o vermiculite foi o substrato menos eficiente para uso durante a aclimatização de plantas de macieiras micropropagadas, com relação ao desenvolvimento do sistema radicular. Em adição, Wagner *et al.* (2002), avaliando diferentes níveis de vermiculite na aclimatização de plântulas micropropagadas de amoreira-preta (*Rubus spp.*), também verificaram que o aumento da proporção de vermiculite nos substratos resultava numa diminuição linear nos valores dos parâmetros de crescimento. Entretanto, os mesmos autores, concluíram que o melhor desenvolvimento das plantas verificou-se quando o percentual de vermiculite no substrato foi de 0; 20 e 40%.

b) Efeito da presença ou não do fertilizante NPK 12:24:12

De um modo geral, no tratamento com NPK 12:24:12 observou-se um relativo aumento das taxas de sobrevivência (Figura 2 e Tabela 7 do Anexo D) em comparação com o tratamento sem NPK 12:24:12, o que pode ser justificado pela acção positiva do NPK no desenvolvimento do sistema radicular (IITA, 2002 & Segovia *et al.*, 2002) admitindo que, de acordo com Grout & Aston (1977) e Zimmerman (1981) citados Hoffmann *et al.*

(2001), as raízes formadas em meio de cultura *in vitro* são de baixa qualidade sendo uma das causas da baixa sobrevivência das plantas durante a aclimatização.

Em termos de crescimento o efeito do fertilizante NPK 12:24:12 foi significativo apenas no desenvolvimento das raízes (Figura 4 e Tabelas 9 e 11b do Anexo D) na variedade “6 Meses”, onde o tratamento com NPK 12:24:12 promoveu maior crescimento das raízes nas plantas em relação ao tratamento sem NPK 12:24:12. Estes resultados podem estar relacionados com a acção do fertilizante NPK 12:24:12 como promotor do crescimento, dado que, de acordo com IITA (2002), a aplicação do nutriente ou fertilizante aumenta o vigor da planta e Segovia *et al.* (2002) recomenda que se deve aplicar um composto rico em fosforo (por exemplo NPK 10:52:10) durante a aclimatização *ex vitro* da mandioca para favorecer o desenvolvimento do sistema radicular.

Jorge *et al.* (2000a), na aclimatização da mandioca, também verificaram que havia influência significativa do fertilizante no crescimento da planta, durante a estação chuvosa (com condições ambientais de baixo “stress”). Sob condições ambientais de “stress” (altas temperaturas e baixa humidade), os mesmos autores, verificaram que a aplicação do fertilizante influenciou, significativamente, não só o crescimento, mas também a sobrevivência das plantas.

c) Efeito do tipo de variedade

A sobrevivência das plantas foi, relativamente, maior na variedade “Chinhembwe” em relação a variedade “6 Meses”. Esta última apenas superou a variedade “Chinhembwe” no substrato Solo arenoso+Estrume animal (tratamento SE-0).

Oliveira *et al.* (2000), na aclimatização de plântulas de 6 variedades durante a avaliação de um sistema de micropropagação massal de variedades da mandioca, verificaram que o tipo de variedade não afectou a sobrevivência das plantas.

A análise de dados referentes ao crescimento, os valores das áreas foliares; o peso fresco das folhas e de raízes e o número de folhas e de raízes foram mais elevados (Figuras 3; 4; 5; 6; 7.1; 7.2; 8.1 e 8.2 e Tabelas 8; 9; 10b e 11b do Anexo D) na variedade

“Chinhembwe” em quase todos os tratamentos, a exceção verificou-se nos tratamentos HV-1 (substrato Hygro-mix+Vermiculite) e VE-1 (substrato Vermiculite+Estrume animal) para o comprimento das raízes e HV-1 (substrato Hygro-mix+Vermiculite) e SE-1 (substrato Solo arenoso+Estrume animal) para o peso fresco das raízes, onde a variedade “6 Meses” superou a “Chinhembwe”.

Estes resultados podem ser sustentadas pelas conclusões de Ceballos & De la Cruz (2002) que consideram que o tamanho da folha, além de ser influenciado por condições ambientais, é uma característica típica de cada variedade, mas que a distribuição das raízes no solo depende tanto dos factores genéticos como culturais.

7.2.2. Efeito das interacções dos factores tipo de substrato, aplicação de NPK 12:24:12 e tipo de variedade na sobrevivência e no crescimento das plantas de mandioca produzidas *in vitro* durante a aclimatização *ex vitro*.

Os resultados mostraram que as interacções (SUB*VAR, VAR*NPK e SUB*NPK) dos diferentes factores (tipo de substrato, aplicação de NPK 12:24:12 e tipo de variedade) não afectaram a sobrevivência das plantas, durante a aclimatização *ex vitro*.

Contrariamente, Jorge *et al.* (2000a) avaliando o efeito da interacção de diferentes substratos (“pine bark”; vermiculite; “mushroom compost” e “rosebush compost”) com NPK 9:25:5 (aplicado em três níveis: 0,0g/L; 1,0g/L e 2,0g/L) na aclimatização *ex vitro* da mandioca verificaram um decréscimo da sobrevivência quando interagiam os substratos “pine bark” com NPK 9:25:5 (1,0g/L e 2,0g/L); vermiculite e “rosebush compost” com NPK 9:25:5 (2,0g/L), situação inversa verificou-se na interacção dos dois últimos substratos com NPK 9:25:5 (1,0g/L).

Em termos de crescimento, o comprimento da raiz foi influenciado, significativamente, pelas interacções VAR*NPK e SUB*VAR, onde se verificou que a presença do fertilizante NPK 12:24:12, na variedade “6 Meses”, foi essencial para o crescimento do sistema radicular enquanto na variedade “Chinhembwe” aplicar ou não o fertilizante resultou no mesmo efeito. Na interacção SUB*VAR verificou-se que, independentemente da variedade, o substrato Vermiculite+Estrume animal condicionou um fraco crescimento

das raízes comparado aos substratos Hygro-mix+Vermiculite e Solo arenoso+Estrume animal.

Os parâmetros área foliar; peso fresco das folhas e das raízes; o número de folhas e de raízes não sofreram influência significativa das interações.

8. Conclusões

Nas condições deste trabalho pode-se chegar as seguintes conclusões:

- i. De um modo geral, o tipo de substrato usado para transplante de plântulas de mandioca produzidas *in vitro* afectou a sobrevivência destas, durante a aclimatização *ex vitro*.
- ii. O tipo de substrato teve efeito significativo no número de folhas e de raízes nas duas variedades, mas no que diz respeito a crescimento das raízes apenas a variedade “6 Meses” sofreu influência dos substratos.
- iii. A aplicação do fertilizante NPK 12:24:12 não influenciou a sobrevivência e, embora tenha beneficiado o crescimento das plantas, apenas produziu efeito significativo em termos do desenvolvimento do sistema radicular na variedade “6 Meses”.
- iv. O substrato Hygro-mix+Vermiculite promoveu maior crescimento e maior índice de sobrevivência das plantas, sendo por isso o mais adequado para a aclimatização *ex vitro* de plântulas de mandioca produzidas *in vitro*.
- v. O substrato Vermiculite+Estrume animal foi o menos eficiente para a aclimatização *ex vitro* de plântulas de mandioca.

9. Recomendações

Diante do constatado, recomenda-se que:

- i. Sejam feitos experimentos desta natureza,
 - em outras regiões do País, particularmente nos locais pré-seleccionados para distribuição deste material, por forma a se estimar os custos envolvidos.
 - tendo como objectivo avaliar o efeito dos outros factores relacionados com a aclimatização *ex vitro* de plântulas produzidas *in vitro*, nomeadamente: a temperatura; a humidade relativa; a intensidade luminosa e sombreamento.
 - com diferentes substratos preparados a base de materiais disponíveis localmente e de baixo custo (por exemplo: serradura; fibras da casca do coco; estrume vegetal; solo e outros) por forma a reduzir-se os custos desta metodologia, atendendo que materiais como hygro-mix e vermiculite são caros e escassos no mercado nacional.
 - para estudar o efeito do pré-endurecimento das plântulas na aclimatização *ex vitro*.
- ii. Se melhore os métodos de esterilização de materiais não estéreis, como solo, estrume e outros.

10. Limitantes

- i. Contrariamente ao previsto não foi possível fazer experimentos com a variedade "Nikwaha" dado que o laboratório não dispunha de material suficiente (plântulas) desta variedade no período da realização do trabalho, tendo esta sido substituída pela variedade "6 Meses".
- ii. Foram feitas análises da composição química dos substratos testados, contudo não foram consideradas por não terem produzido resultados relevantes para o presente estudo, uma vez que muitos dos *itens* pedidos não foram avaliados por falta de reagentes no laboratório, durante o período da realização das análises.

11. Referências Bibliográficas

- Adediran J. A. & O. Awolowo. (2005). Growth of tomato and lettuce seedlings in soilless media. In: Journal of Vegetable Science. Vol. 11. Issue: 1.
- Almeida J. M. R. (1995). Manual de mandioca. Associação de Técnicos de Culturas Tropicais. Porto. 118 pp.
- Babaleye T. (1996). Cassava, Africa's food security crop. IITA
- Cagnon J. R.; M. P. Cereda & S. Pantarotto. (2005). Glicosídeos cianogénicos da mandioca: Biossíntese, distribuição, desintoxicação e métodos de dosagem. In: Manual da mandioca. V. 2. Agricultura: Culturas Tuberosas Amiláceas Latino Americano. Brasil. 82-99 pp.
- Carter S. E.; L. O. Fresco; P. G. Jones & J. N. Fairbairn. (1997). Introduction and diffusion of cassava in Africa. IITA Research Guide 49. Training Program, IITA. Ibadan. Nigeria.
- Carvalho L. J. C. B.; G. B. Cabral & L. Campos. (2000). Raiz de reserva da mandioca: Um sistema biológico de múltipla utilidade. Brasília; Empresa de Pesquisa Agro-pecuária, Centro de Recursos Genéticos e Biotecnologia. 16 pp. (EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia. Documentos, 44).
- Ceballos H. & G. A. De la Cruz. (2002). Taxonomia y morfología de la yuca. In: La yuca en el tercer milenio: Sistemas modernos de producción, procesamiento, utilización y comercialización. Publicación CIAT N° 327. Producción Artes Gráficas. CIAT, Cali, Colombia. 16-32 pp.
- Chambo J. J. (2004). Termoterapia e Radiação no controlo do mosaico africano da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). Tese de Licenciatura em Engenharia Agronómica, *in press*. Maputo. 31 pp.

Couto M.; A. Wagner Jr. & A. C. Quezada. (2003). Efeito de diferentes substratos durante a aclimatização de plantas micropropagadas do porta-enxerto Mirabolano 29C (*Prunus cerasifera* EHRH.) em casa de vegetação. In: R. Bras. Agrociência. Vol. 9, Nº2. 125-128 pp.

Dallaqua M. A. M. & D. J. Coral. (2005). Morfo-anatomia. In: Manual da mandioca. V. 2. Agricultura: Culturas Tuberosas Amiláceas Latino Americano. Brasil. 48-65 pp.

Do Vale C. T. (2005). Laboratório de Biotecnologia: Cultura de Tecidos. Panfleto. IIAM. Maputo.

Ekanayake I. J.; D. S. O. Osiru & M. C. M. Porto. (1997). Morphology of cassava. IITA Research Guide 61. Training Program, IITA, Ibadan, Nigeria. First edition. 30 pp.

El-Sharkawy M. (2005). Cassava biology and physiology. In: Plant molecular biology. Review article. Vol. 56. Nº 4. Kluwer Academic Publishers. Natural Resources Institute. University of Greenwich. Chatham. UK. 481-501 pp.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). (2006). Crops Production Statistics Database.

Flower J. & L. Cohen. (1996). Practical Statistics for Field Biology. John Wiley & Sons. New York. 227 pp.

Franzon R. C.; A. Wagner Jr.; M. Couto & A. C. Quezada (2002). Efeito da composição de diferentes substratos durante a aclimatização de plantas micropropagadas do porta-enxerto Marianna 2624 (*Prunus* sp.) em casa de vegetação. In: XVII Congresso Brasileiro de Fruticultura. 17. Belém. 5 pp.

Fregene M.; J. Tohme; W. Roca; P. Chavarriaga; R. Escobar & H. Ceballos. (2002). Biotecnología para la yuca. In: La yuca en el tercer milenio: Sistemas modernos de producción, procesamiento, utilización y comercialización. Publicación CIAT Nº 327. Producción Artes Gráficas. CIAT, Cali, Colombia. 377-405 pp.

Fukunda W. M. G. & S. O. Silva. (2005). Melhoramento de mandioca no Brasil. In: Manual da mandioca. V. 2. Agricultura: Culturas Tuberosas Amiláceas Latino Americano. Brasil. 243-257 pp.

Gomez K. A. & A. A. Gomez. (1984). Statistical procedures for agricultural research. 2nd edition. Laguna. Filipinas.

Hazarika B. N. (2003). Acclimatization of tissue-cultured plants. Review articles. Current science. Vol. 85. Nº 12. Department of Horticulture. Assam Agricultural University. Jorhat. India.

Hillocks R. J.; J. M. Thresh; J. Tomas; M. Botão; R. Macia & R. Zavier. (2002). Cassava brown streak disease in Northern Mozambique. In: International Journal of Pest Management. Volume 48. Nº 3. Taylor and Francis Ltd. 17-18 pp.

Hoffmann A.; M. Pasqual; N. N. J. Chalfun & C. B. Fráguas. (2001). Efeito de substratos na aclimatização de plantas micropropagadas do porta-enxerto de macieira "Marubakaido". In: Ciênc. Agrotec., Lavras. Vol. 25. Nº 2. Comunicação. 462-467 pp.

IITA (International Institute of Tropical Agriculture). (2002). Post flask management of cassava and yams. IITA Research guide 69. Information services and training. Ibadan, Nigeria. 22 pp.

IITA (International Institute of Tropical Agriculture). (1998). Post flask management of micro propagated bananas and plantains – A manual on how to handle tissue-cultured banana and plantains plants. Ibadan, Nigeria. 15 pp.

INIA (Instituto Nacional de Investigação Agronómica). (2003). Relatório anual 2001/2002. Relatório da Mandioca. Maputo.

INIA-DTA (Instituto Nacional de Investigação Agronómica – Departamento de Terra e Água). (1993). Carta de Solos, legenda explicativa. In: Os solos das províncias de

Maputo e Gaza, explicações dos mapas de solos (escala 1:50000). INIA. Série Terra e Água. Comunicação Nº 76. Maputo – Moçambique. 132 pp.

Jorge M. A. B. (2002). Factors Affecting the Hardening and Acclimatization of Tissue-Cultured Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) Plantlets. Thesis submitted in partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Philosophy. Department of Crop Science. Faculty of Agriculture, University of Zimbabwe. Zimbabwe. 234 pp.

Jorge M. A. B.; I. Robertson; B. Mashingaidze & E. Keogh (2001). Distinguishing the effects of light and temperature variations on the growth, development, multiplication potential and *ex vitro* survival rates of *in vitro* cassava. In: Annals of applied biology. Vol. 138. Nº 3. Association of Applied Biologists. Crop Department. University of Zimbabwe. Harare. Zimbabwe. 363-370 pp.

Jorge M. A. B.; I. Robertson; B. Mashingaidze & E. Keogh (2000). How *in vitro* light affects growth and survival rates of *ex vitro* cassava. In: Annals of applied biology. Vol. 137. Nº 3. Association of Applied Biologists. Crop Department. University of Zimbabwe. Harare. Zimbabwe. 311-319 pp.

Jorge M. A. B. & A. I. Robertson. (2000a). Factors Affecting the Acclimatization of *ex vitro* Cassava in the semi-arid regions. In Cassava Biotechnology, Proceedings IV International Scientific Meeting Cassava Biotechnology Network, November 1998. Salvador. Bahia, Brasil. 396-407 pp. Eds L. J. C. B. Carvalho; A. M. Thro & A. D. Vilarinhos. EMBRAPA/CENARGEN/CBN. Brasilia.

Jorge M. A. B. (1997). Acclimatization in Mozambique. In: Thro A. M. & M. O. Akoroda. African Journal of root and tuber crops. Contributions of Biotechnology to Cassava for Africa – Proceedings of the cassava biotechnology network. Third International Scientific Meeting. Vol. 2 (1&2). ISTRC – AB (International Society for Tropical Root Crops – Africa Branch). Kampala – Uganda 26-31 August 1996.

Loach K. (1998). Controlling environmental conditions to improve adventitious rooting. In: Davis T. D.; B. E. Haissig & N. Sankhla. Adventitious root formation in cuttings. Portland: Dioscorides. 248-278 pp.

Maciel S. C.; J. A. Voltolini & E. L. Pedrotti. (2002). Enraizamento *ex vitro* e aclimatização do porta-enxerto de macieira Marubakaido micropropagado. In: Rev. Bras. Frutic. Jaboticabal – SP. Vol. 24. Nº 2. 289-292 pp.

MADER (Ministério de Agricultura e Desenvolvimento Rural) (2003). Departamento de aviso prévio para a segurança alimentar. Banco de dados. Maputo.

Maleia M. P. (2003). Avaliação de Perdas Causadas pelo Vírus do Listrado Castanho na cultura da Mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), na Província da Zambézia. Tese de Licenciatura em Engenharia Agronómica. *In press*. Maputo.

Martin T. N.; L. B. Lima; A. Rodrigues; E. Girardi; E. G. Fabri & K. Minami. (2006). Utilização de vermiculita, casca de pínus e carvão na produção de mudas de pepino e de pimentão. In: Acta Sci. Agron. Vol. 28. Nº 1. Maringá. 107-113 pp.

Mattos P. L. E. & J. C. Gomes. (2000). O Cultivo da mandioca. 122 pp. Embrapa. Brasil.

Moraes L. M.; L. C. D. Cavalcante & R. T. Faria. (2002). Substratos para aclimatização de plântulas de *Dendrobium nobile* Lindl. (Orchidaceae) propagadas *in vitro*. In: Acta Scientiarum. Vol. 24. Nº 5. 1397-1400 pp.

Okole B. & B. Odhav. (2002). Commercialisation of Plants in Africa In: Rebirth of Science in Africa – A Shared Vision for Life and Environmental Sciences. Edited by Himansu Baijinath and Yashica Singh. UMDAUS PRESS. South Africa. 106-115 pp.

Oliveira R. P.; T. S. Gomes & A. D. Vilarinhos. (2000). Avaliação de um sistema de micropropagação massal de variedades de mandioca. In: Pesq. Agropec. Bras., Brasília. Vol. 35. Nº 12. 2329-2334 pp.

Pereira M. C. T.; S. Nietsche; A. C. França; C. F. Nunes; C. De Lima; V. D. Gonçalves; B. P. Salles; D. L. B. Moraes & M. K. Kobayashi. (2005). Aclimatização de mudas micropropagadas de bananeira sob diferentes condições de luminosidade. 238-240 pp.

Piza I. M. T. & R. S. Pinho. (2005). Protocolo de micropropagação da mandioca. In: Manual da mandioca. V. 2. Agricultura: Culturas Tuberosas Amiláceas Latino Americano. Brasil. 179-186 pp.

Segovia R. J.; A. Bedoya; W. Trivino; H. Ceballos; G. Gálvez & B. Ospina. (2002). Metodología para el endurecimiento masivo de "vitroplantas" de la yuca. In: La yuca en el tercer milenio: Sistemas modernos de producción, procesamiento, utilización y comercialización. Publicación CIAT N° 327. Producción Artes Gráficas. CIAT, Cali, Colombia. 572-585 pp.

Silva A. B.; M. Pasqual; A. L. R. Maciel & L. F. Dutra. (2003). BAP e substratos na aclimatização de plântulas de gloxínia (*Sinningia speciosa* Lood. Hiern.) provenientes de cultura de tecidos. In: Ciên. Agrotec. Lavras. Vol. 27. N° 2. 255-260 pp.

Skrebsky E. C.; F. T. Nicoloso & J. Maldaner. (2006). Substratos na aclimatização de *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen produzida *in vitro* sob diferentes doses de sacarose. In: Ciência Rural. Vol. 36. N° 5. 1416-1423 pp.

Sousa A. S.; T. G. Junghans, & W. M. G. Fukunda. (2005). Técnicas e aplicações de cultura de tecidos em mandioca. In: Manual da mandioca. V. 2. Agricultura: Culturas Tuberosas Amiláceas Latino Americano. Brasil. 118-178 pp.

Tafur M. S. M. (2002). Fisiologia de la yuca (*Manihot esculenta* Crantz). In: La yuca en el tercer milenio: Sistemas modernos de producción, procesamiento, utilización y comercialización. Publicación CIAT N° 327. Producción Artes Gráficas. CIAT, Cali, Colombia. 34-45 pp.

Ternes M. (2005). Fisiologia da planta. In: Manual da mandioca. V. 2. Agricultura: Culturas Tuberosas Amiláceas Latino Americano. Brasil. 66-83 pp.

Thresh J. M. & R. J. Cooter (2005). Strategies for controlling cassava mosaic virus disease in Africa. In: Plant pathology. Research article. Vol. 54. Nº 5. Blackwell Publishing. Crop Department. University of Zimbabwe. Harare. Zimbabwe. 587-614 pp.

Thresh J. M. (2001). Report on visit to Mozambique. 41 pp.

✓ Zacarias A. M.; C. E. Cuambe & M. P. Maleia. (2004). Relatório: Avaliação de perdas causadas pela Podridão Radicular da Mandioca (Listrado Castanho da Mandioca) nas províncias de Cabo Delgado, Nampula e Zambézia. Programa de Nacional de Raizes e Tubérculos. INIA. 69 pp.

✓ Zacarias A. M. (2004). Promotion and control measures for Cassava Brown Streak Disease Project. National roots and tubers research programme. INIA. 26 pp.

Wagner Jr. A.; A. Chaves; M. Couto; M. B. Malgarin & G. R. L. Fortes. (2002). Avaliação de níveis de vermiculite na aclimatização de plântulas micropropagadas de amoreira-preta (*Rubus* spp.). In: XVII Congresso Brasileiro de Fruticultura. Belém. PA: Embrapa Amazônia Oriental. Vol. 1. 1-5 pp.

ANEXOS

Anexo A.

Figuras

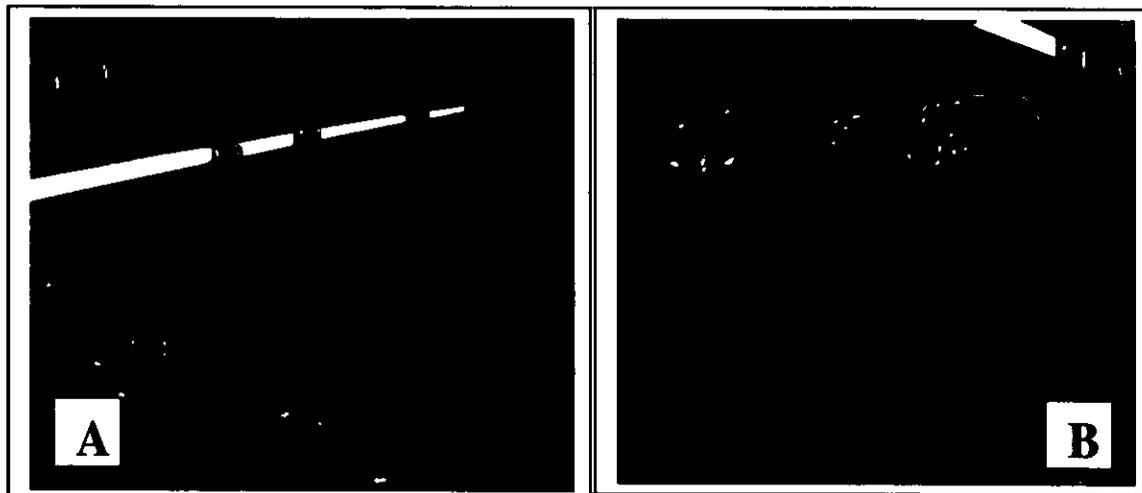


Figura 9. Sala de crescimento do Laboratório de Biotecnologia do IIAM (A) e plântulas de mandioca *in vitro* (B) (Fotos: IIAM, 2006).



Figura 10. Preparação de uma câmara de humidade (A) e lavagem das plântulas para remoção do meio de cultura (B) (Fotos: IIAM, 2006).

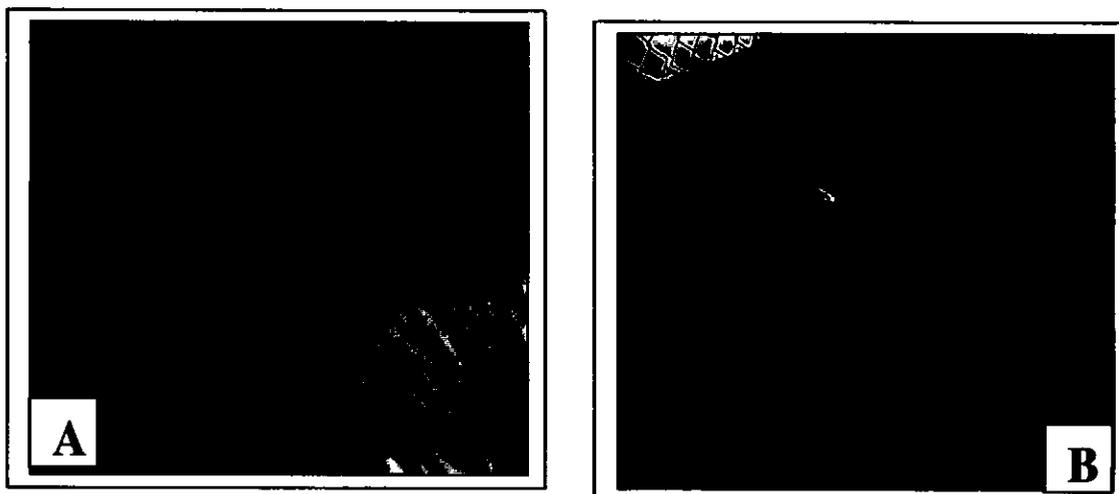


Figura 11. Transplante das plântulas em bandejas contendo substrato (A) e a rega das plântulas após o transplante (B) (Fotos: IIAM, 2006).

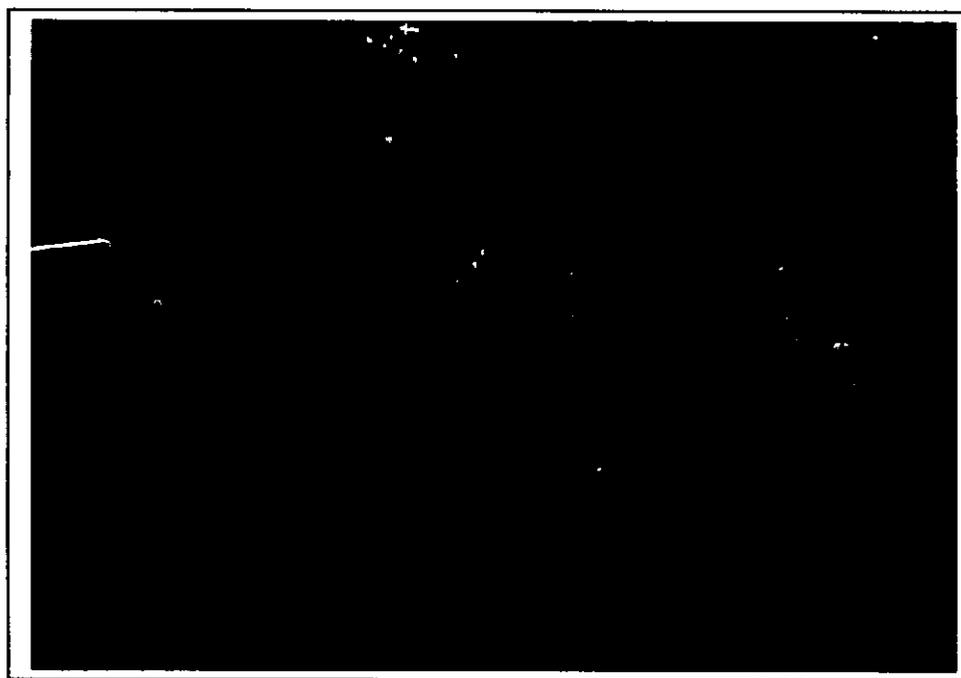


Figura 12. Colocação das câmaras de humidade contendo bandejas com plântulas dentro da estufa (Foto: IIAM, 2006).

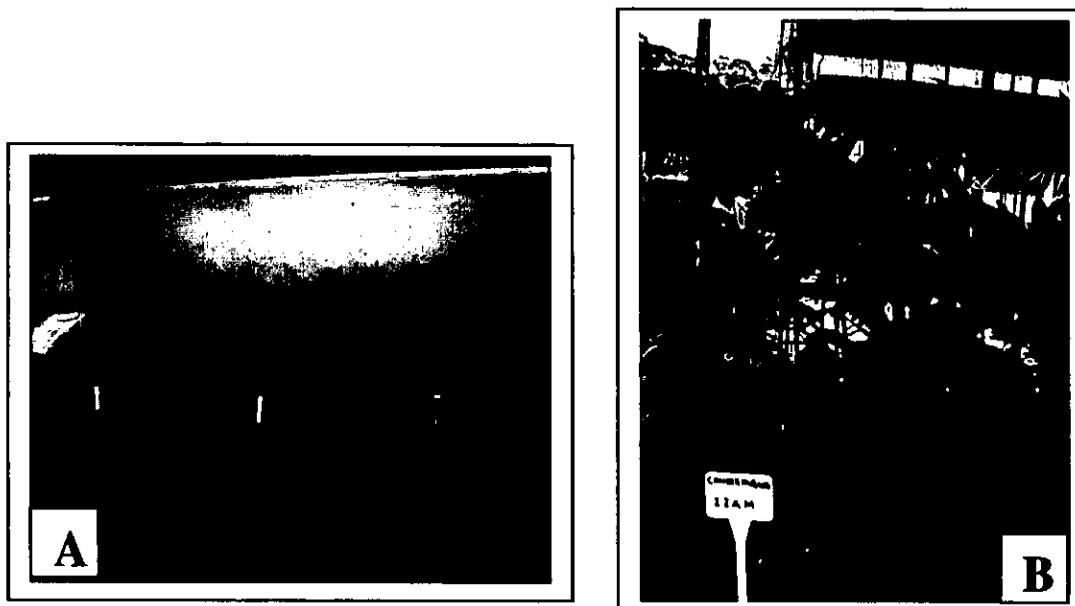


Figura 13. Bandejas contendo plantas após a remoção das câmaras de humidade (A) e plantas já em vasos plásticos (após a transferência a um único substrato – solo) um mês após a remoção das câmaras de humidade (B) (Fotos: IIAM, 2006).

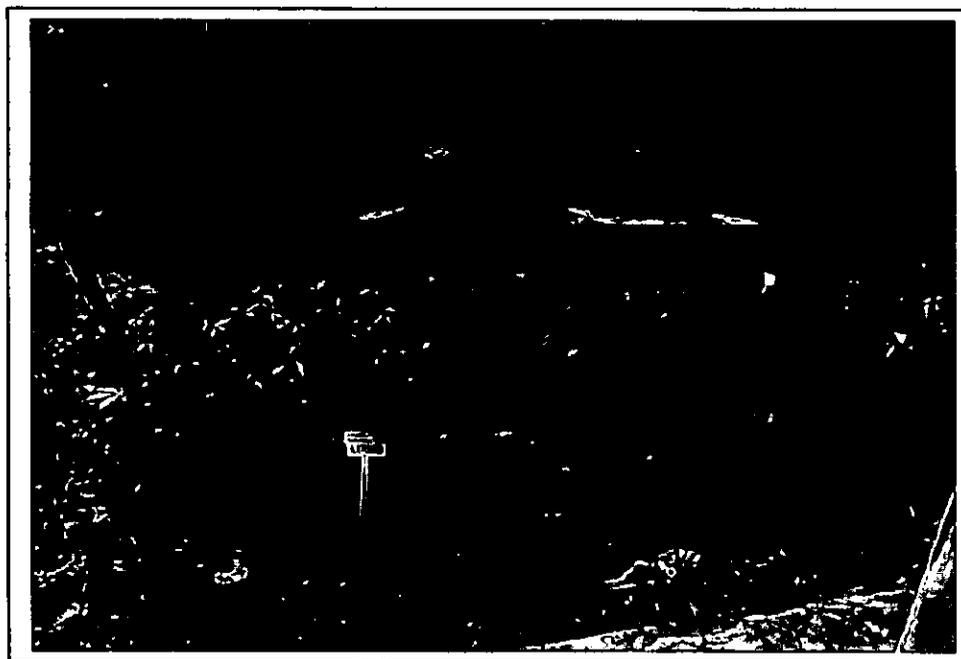


Figura 14. Plantas de mandioca na sombrite (Foto: IIAM, 2006).

Anexo B.

Glossário.

Aclimatização – processo de adaptação da plântula produzida *in vitro* às condições ambientais antes da transferência desta para a estufa ou para o campo.

Câmara de humidade – estrutura, consistindo de uma base circular ou rectangular no interior de um plástico transparente completamente fechado, que ajuda a aumentar a temperatura do solo, mantém a humidade e permite a penetração da luz.

Cipermetrina – insecticida não sistémico que actua por contacto e ingestão. É muito usado em grande número de culturas devido a sua baixa toxicidade para os mamíferos e seu controle que é efectivo. Controla uma grande gama de pragas nas culturas.

Cultura de meristema – excisão da cúpula meristemática apical com um ou dois primórdios foliares (onde ainda não se observa conexão vascular com os tecidos da planta), sendo cultivado em meio nutritivo adequado para diferenciação e desenvolvimento dos sistemas caulinar e radicular.

Endurecimento in vitro – preparação das plântulas enquanto elas ainda estão nas condições *in vitro* através de certas manipulações de modo a torna-las adaptáveis facilmente ao ambiente natural (estufa ou campo).

Erosão genética – perda de diversidade genética. Perda de material genético, incluindo genes individuais ou combinações de genes (complexos genéticos); genótipos; espécies.

Ex vitro – crescimento fora do corpo vivo, em ambiente natural.

Galactocitos – células secretoras responsáveis pela produção da secreção leitosa, característica nas plantas da família Euphorbiaceae.

Germoplasma – estrutura física vegetal, animal ou de microrganismos, dotada de caracteres hereditários, capaz de gerar um novo indivíduo, transmitindo as suas características de geração para geração. O germoplasma vegetal é representado por sementes, mudas, estacas ou outra parte que possa transmitir suas características hereditárias.

Hygro-mix – um composto orgânico usado, normalmente, para germinação de sementes, é leve e poroso, de composição uniforme, com alto valor nutricional.

In vitro – significa "crescimento fora do corpo vivo, em ambiente artificial", isto é, designa todos os processos biológicos que têm lugar fora dos sistemas vivos, no ambiente controlado e fechado de um laboratório e que são feitos normalmente em recipientes de vidro.

Indexação de vírus – método usado para diagnosticar se a planta está ou não infectada por vírus usando técnicas da biologia molecular, exemplo: PCR (“Polymerase Chain Reaction” = Reacção em Cadeia da Polimerase), ELISA (“Enzyme-Linked Immusorbent Assay” = Ensaio de Imunoadsorção Ligado á Enzima).

Lux – unidade de intensidade de iluminação correspondente à iluminação de uma superfície que recebe de um modo uniforme o fluxo luminoso de um lúmen por metro quadrado.

Meio de cultura – também conhecido como solo artificial, é o substrato onde são incorporados em quantidades pesadas cuidadosamente, os nutrientes básicos para o crescimento e desenvolvimento das plantas em condições de ambiente artificial controladas.

Meristema – região de rápida divisão celular (mitose). Tecido indiferenciado a partir do qual as células tendem a formar tecidos diferenciados e especializados. Os meristemas encontram-se nas áreas de crescimento como gomos e ápices.

Micropropagação – propagação de plantas usando técnicas de cultura de tecidos. A micropropagação pode restringir-se somente a fase *in vitro* ou incorporar a *ex vitro*, isto é a aclimatização das plantas provenientes das condições *in vitro*.

Plântula – condição do embrião vegetal após o processo de germinação, isto é, embrião vegetal já desenvolvido

Protogenia – forma de dicogamia ou de hermafroditismo em que os gâmetas femininos se desenvolvem antes dos masculinos.

Vermiculite – minério da família das argilas usado na agricultura como condicionador do solo e substratos. Apresenta as seguintes características: é leve (baixa densidade), uniforme na composição, estéril e possui grande capacidade de retenção de água, ar e fertilizantes.

Anexo C.

Plano experimental.

Tabela 6. Plano de experimentação

	Fases de aclimatização					
	Estufas					Sombrite
	Câmara de humidade				Fora da câmara de humidade	
Actividade & Período de execução	Fez-se 3 furos (1 cm de Ø) 8 DDT	Abriu-se uma 1ª janela (14 cm de Ø) 11 DDT	Abriu-se a 2ª janela (14 cm de Ø) 14 DDT	Retirou-se as plantas da câmara 16 DDT	22 DDT transferiu-se as plantas para os vasos plásticos (14X7 cm) contendo solo e deixou-se numa Sombrite	Transferiu-se as plantas para o campo definitivo 52 DDT
Período total						52 dias

Anexo D.

Valores medidos durante o ensaio.

Tabela 7. Taxas de sobrevivência nas variedades "Chinhembwe" e "6 Meses".

VARIIDADE	TRATAMENTO	SUBSTRATO	PT	PS	TS (%)
Chinhembwe	Sem NPK	SE	30 [#]	3 ⁺	10 [*]
Chinhembwe	Sem NPK	HV	30	28	93,3
Chinhembwe	Sem NPK	VE	30	7	23,3
Chinhembwe	Com NPK	SE	30	20	66,7
Chinhembwe	Com NPK	HV	30	30	100
Chinhembwe	Com NPK	VE	30	10	33,3
6 Meses	Sem NPK	SE	30	7	23,3
6 Meses	Sem NPK	HV	30	22	73,3
6 Meses	Sem NPK	VE	30	3	10
6 Meses	Com NPK	SE	30	16	53,3
6 Meses	Com NPK	HV	30	26	86,7
6 Meses	Com NPK	VE	30	4	13,3

[#] Número de plântulas transplantadas por SUB*TRAT*VAR.

⁺ Número de plantas sobreviventes por SUB*TRAT*VAR., ao fim de 52 DDT.

^{*} Taxas de sobrevivência por SUB*TRAT*VAR, ao fim de 52 DDT.

PT = Plântulas transplantadas PS = Plantas sobreviventes; TS = Taxas de sobrevivência; SE = Solo arenoso+Estrume animal; HV = Hygro-mix+Vermiculite e VE = Vermiculite+Estrume animal.

Tabela 8. Valores médios do número de folhas e de raízes nas duas variedades.

VARIETADE	TRATAMENTO	SUBSTRATO	FASE [#]	NF	NR
Chinhembwe	Sem NPK	SE	1	1,3*	7,3 ⁺
Chinhembwe	Sem NPK	SE	2	3,3	13,3
Chinhembwe	Sem NPK	SE	3	8,7	21,3
Chinhembwe	Sem NPK	HV	1	1,7	7,7
Chinhembwe	Sem NPK	HV	2	4,3	11,7
Chinhembwe	Sem NPK	HV	3	9,7	19,7
Chinhembwe	Sem NPK	VE	1	1,7	7,0
Chinhembwe	Sem NPK	VE	2	2,3	8,3
Chinhembwe	Sem NPK	VE	3	5,7	13,0
Chinhembwe	Com NPK	SE	1	1,7	6,7
Chinhembwe	Com NPK	SE	2	3,3	10,3
Chinhembwe	Com NPK	SE	3	9,3	20,0
Chinhembwe	Com NPK	HV	1	2,0	6,3
Chinhembwe	Com NPK	HV	2	5,3	11,0
Chinhembwe	Com NPK	HV	3	11,3	20,7
Chinhembwe	Com NPK	VE	1	1,7	6,0
Chinhembwe	Com NPK	VE	2	3,3	9,0
Chinhembwe	Com NPK	VE	3	6,7	15,0
6 Meses	Sem NPK	SE	1	2,3	6,7
6 Meses	Sem NPK	SE	2	4,7	8,7
6 Meses	Sem NPK	SE	3	7,3	10,7
6 Meses	Sem NPK	HV	1	2,3	5,3
6 Meses	Sem NPK	HV	2	3,7	7,3
6 Meses	Sem NPK	HV	3	9,0	11,0
6 Meses	Sem NPK	VE	1	2,3	5,0
6 Meses	Sem NPK	VE	2	3,3	5,3
6 Meses	Sem NPK	VE	3	5,7	7,3
6 Meses	Com NPK	SE	1	2,0	5,0
6 Meses	Com NPK	SE	2	3,7	8,3
6 Meses	Com NPK	SE	3	9,3	13,3
6 Meses	Com NPK	HV	1	3,0	5,0
6 Meses	Com NPK	HV	2	5,3	7,7
6 Meses	Com NPK	HV	3	10,7	14,0
6 Meses	Com NPK	VE	1	2,0	4,7
6 Meses	Com NPK	VE	2	3,0	7,0
6 Meses	Com NPK	VE	3	5,7	9,3

* Médias de número de folhas de três plantas por fase da aclimatização.

⁺ Médias de número de raízes de três plantas por fase da aclimatização.

[#] Fase da aclimatização, onde a **Fase 1** = período de transplante; **Fase 2** = período da transferência das plantas dos diferentes substratos de transplante para o solo e da estufa para a sombrite (22 DDT) e **Fase 3** = Fim da experiência (52 DDT).

NF = Número de folhas; NR = Número de raízes; SE = Solo arenoso+Estrume animal; HV = Hygro-mix+Vermiculite e VE = Vermiculite+Estrume animal.

Tabela 9. Valores médios da área foliar, comprimento da raiz, peso fresco das folhas e das raízes nas duas variedades

VAR	TRAT	SUB	AF (cm ²)	CR (cm)	PFF (g)	PFR (g)
Chinhembwe	Sem NPK	SE	232,44 [*]	4,82 ⁺	2,04 [#]	0,74 [§]
Chinhembwe	Sem NPK	HV	362,50	5,87	2,12	0,67
Chinhembwe	Sem NPK	VE	142,48	3,98	1,55	0,42
Chinhembwe	Com NPK	SE	280,52	5,32	2,40	0,72
Chinhembwe	Com NPK	HV	388,74	6,54	2,62	0,78
Chinhembwe	Com NPK	VE	237,88	4,80	2,04	0,51
6 Meses	Sem NPK	SE	55,61	4,69	0,87	0,61
6 Meses	Sem NPK	HV	84,48	4,08	1,10	0,33
6 Meses	Sem NPK	VE	36,56	3,28	0,52	0,36
6 Meses	Com NPK	SE	144,93	6,58	2,27	1,14
6 Meses	Com NPK	HV	131,49	6,13	2,14	0,72
6 Meses	Com NPK	VE	38,14	4,87	0,73	0,42

* Médias da área foliar de três plantas por SUB*TRAT*VAR.

+ Médias do comprimento das raízes de três plantas por SUB*TRAT*VAR..

Médias do peso fresco das folhas de três plantas por SUB*TRAT*VAR.

§ Médias do peso fresco das raízes de três plantas por SUB*TRAT*VAR.

VAR = Variedade; TRAT = Tratamento; SUB = Substrato; AF = Área foliar; CR = Comprimento das raízes; PFF = Peso fresco das folhas; PFR = Peso fresco das raízes; SE = Solo arenoso+Estrume animal; HV = Hygro-mix+Vermiculite e VE = Vermiculite+Estrume animal.

Tabela 10. Efeito dos factores SUB (tipo de substrato) e Tipo de tratamento (presença ou ausência de NPK) na AF (área foliar); CR (crescimento das raízes); PFF (peso fresco das folhas); PFR (peso fresco das raízes); NF (número de folhas) e NR (número de raízes) de plantas de mandioca da variedade "Chinhembwe", durante a aclimatização *ex vitro*.

10a. Tipo de substrato

SUB	AF (cm ²)	CR (cm)	PFF (g)	PFR (g)	NF	NR
HV	421,61a [*]	6,46a	2,42a	0,73a	5,72a	12,85a
SE	256,48a	5,07a	2,22a	0,73a	4,60ab	13,15a
VE	236,66a	4,91a	1,97a	0,55a	3,57b	9,72b

* Médias seguidas pelas mesmas letras na coluna não diferem entre si ao nível de 5% pelo teste de Tukey (HSD).

10b. Tipo de tratamento

Tratamento	AF (cm ²)	CR (cm)	PFF (g)	PFR (g)	NF	NR
Com NPK	302,38a [*]	6,07a	2,35a	0,73a	4,96a	12,14a
Sem NPK	245,81a	4,89a	1,90a	0,61a	4,30a	11,67a

* Médias seguidas pelas mesmas letras na coluna não diferem entre si ao nível de 5% pelo teste de Tukey (HSD).

10c. Fases durante a aclimatização

Fases	NR	NF
1	6,83a [*]	1,68a
2	10,60b	3,63b

3	18,28c	8,57c
---	--------	-------

* Médias seguidas pelas mesmas letras na coluna não diferem entre si ao nível de 5% pelo teste de Tukey (HSD).

Tabela 11. Efeito dos factores SUB (tipo de substrato) e Tipo de tratamento (presença ou ausência de NPK) na AF (área foliar); CR (crescimento das raízes); PFF (peso fresco das folhas); PFR (peso fresco das raízes); NF (número de folhas) e NR (número de raízes) de plantas de mandioca da variedade "6 Meses", durante a aclimatização *ex vitro*.

11a. Tipo de substrato

SUB	AF (cm ²)	CR (cm)	PFF (g)	PFR (g)	NF	NR
HV	107,99a*	5,10a	1,62a	0,52a	5,67a	8,38a
SE	100,27a	5,63a	1,57a	0,87a	4,88ab	8,78ab
VE	37,35a	4,07b	0,62a	0,39a	3,67b	6,43b

* Médias seguidas pelas mesmas letras na coluna não diferem entre si ao nível de 5% pelo teste de Tukey (HSD).

11b. Tipo de tratamento

Tratamento	AF (cm ²)	CR (cm)	PFF (g)	PFR (g)	NF	NR
Com NPK	104,85a*	5,86a	1,71a	0,76a	4,97a	8,25a
Sem NPK	58,88a	4,02b	0,83a	0,43a	4,51a	7,48a

* Médias seguidas pelas mesmas letras na coluna não diferem entre si ao nível de 5% pelo teste de Tukey (HSD).

11c. Fases durante a aclimatização

Fases	NR	NF
1	6,83a*	2,31a
2	10,60b	3,95b
3	18,28c	7,95c

* Médias seguidas pelas mesmas letras na coluna não diferem entre si ao nível de 5% pelo teste de Tukey (HSD).

Anexo E.

Tabelas de análise de variância (ANOVA).

Tabela 12. ANOVA da variedade "Chinhembwe"

12a. Área foliar

F. V.	GL	SQ	QM	F	P
NPK (A)	1	41929.9	41929.9	5.35	0.1469
SUB (B)	2	82489.4	41244.7	5.26	0.1598
Erro	2	15684.4	7842.19		
Total	5	140104			

* diferenças estatisticamente significativas a 5% de probabilidade
CV = 33.186%

12b. Comprimento das raízes

F. V.	GL	SQ	QM	F	P
NPK (A)	1	4.17720	4.17720	4.35	0.1722
SUB (B)	2	5.81360	2.90680	3.03	0.2481
Erro	2	1.91840	0.95920		
Total	5	11.9092			

*diferenças estatisticamente significativas a 5% de probabilidade
CV = 17.233%

12c. Peso fresco das folhas

F. V.	GL	SQ	QM	F	P
NPK (A)	1	1.08000	1.08000	9.88	0.0880
SUB (B)	2	0.40667	0.20333	1.86	0.3496
Erro	2	0.21860	0.10930		
Total	5	1.70527			

*diferenças estatisticamente significativas a 5% de probabilidade
CV = 17.144%

12d. Peso fresco das raízes

F. V.	GL	SQ	QM	F	P
NPK (A)	1	0.04320	0.04320	1.61	0.3320
SUB (B)	2	0.08640	0.04320	1.61	0.3829
Erro	2	0.05360	0.02680		
Total	5	0.18320			

*diferenças estatisticamente significativas a 5% de probabilidade
CV = 22.339%

12e. Número das folhas

F. V.	GL	SQ	QM	F	P
NPK (A)	1	1.93389	1.93389	1.84	0.2043
SUB (B)	2	13.8744	6.93722	6.62	0.0148*
Fase (C)	2	151.041	75.5206	72.02	0.0000*
Erro	10	10.4856	1.04856		
Total	17	177.636			

*diferenças estatisticamente significativas a 5% de probabilidade
CV = 69.850%

12f. Número das raízes

F. V.	GL	SQ	QM	F	P
NPK (A)	1	1.02722	1.02722	0.35	0.5657
SUB (B)	2	43.3911	21.6956	7.45	0.0104*
Fase (C)	2	408.648	204.324	70.20	0.0000*
Erro	10	29.1056	2.91056		
Total	17	485.829			

*diferenças estatisticamente significativas a 5% de probabilidade
CV = 48.653%

Tabela 13. ANOVA da variedade "6 Meses"**13a. Área foliar**

F. V.	GL	SQ	QM	F	P
NPK (A)	1	395.110	395.110	5.02	0.2673
SUB (B)	2	20.6924	10.3462	0.13	0.8899
Erro	1	78.7683	78.7683		
Total	4	494.571			

*diferenças estatisticamente significativas a 5% de probabilidade

CV = 57.553%

13b. Comprimento das raízes

F. V.	GL	SQ	QM	F	P
NPK (A)	1	5.09682	5.09682	186.92	0.0053*
SUB (B)	2	2.51693	1.25847	46.15	0.0212*
Erro	2	0.05453	0.02727		
Total	5	7.66828			

*diferenças estatisticamente significativas a 5% de probabilidade

CV = 25.077%

13c. Peso fresco das folhas

F. V.	GL	SQ	QM	F	P
NPK (A)	1	1.17042	1.17042	6.29	0.1290
SUB (B)	2	1.25703	0.62852	3.38	0.2286
Erro	2	0.37243	0.18622		
Total	5	2.79988			

*diferenças estatisticamente significativas a 5% de probabilidade

CV = 58.845%

13d. Peso fresco das raízes

F. V.	GL	SQ	QM	F	P
NPK (A)	1	0.16007	0.16007	5.50	0.1437
SUB (B)	2	0.25063	0.12532	4.30	0.1885
Erro	2	0.05823	0.02912		
Total	5	0.46893			

*diferenças estatisticamente significativas a 5% de probabilidade

CV = 51.326%

13e. Número das folhas

F. V.	GL	SQ	QM	F	P
NPK (A)	1	0.93389	0.93389	0.89	0.3688
SUB (B)	2	12.1878	6.09389	5.78	0.0215*
Fase (C)	2	100.804	50.4022	47.81	0.0000*
Erro	10	10.5422	1.05422		
Total	17	126.343			

*diferenças estatisticamente significativas a 5% de probabilidade

CV = 57.527%

13f. Número das raízes

F. V.	GL	SQ	QM	F	P
NPK (A)	1	2.72222	2.72222	1.72	0.2143
SUB (B)	2	18.9700	9.48500	5.99	0.0157*
Fase (C)	2	97.8700	48.9350	30.91	0.0000*
Erro	12	18.9978	1.58315		
Total	17	138.560			

*diferenças estatisticamente significativas a 5% de probabilidade
CV = 36.291%

Tabela 14. ANOVA das interações entre o tipo de substrato; aplicação de NPK e tipo de variedade.

14a. Área foliar

F. V.	GL	S.Q	Q.M	F	P
VAR	1	110851	110851	83.68	0.0117*
NPK	1	7886.35	7886.35	5.95	0.1348
SUB	2	32788.1	16394.1	12.38	0.0748
VAR*NPK	1	84.3230	84.3230	0.06	0.8244
VAR*SUB	2	8535.71	4267.86	3.22	0.2369
NPK*SUB	2	526.009	263.005	0.20	0.8343
Erro	2	2649.26	1324.63		
Total	11	163321			

CV = 20.449%

14b. Comprimento das raízes

F. V.	GL	S.Q	Q.M	F	P
VAR	1	0.24083	0.24083	7.64	0.1098
NPK	1	4.71253	4.71253	149.49	0.0066*
SUB	2	4.49255	2.24628	71.25	0.0138*
VAR*NPK	1	1.04430	1.04430	33.13	0.0289*
VAR*SUB	2	1.38762	0.69381	22.01	0.0435*
NPK*SUB	2	0.01712	0.00856	0.27	0.7865
Erro	2	0.06305	0.03152		
Total	11	11.9580			

CV = 3.495%

14c. Peso fresco das folhas

F. V.	GL	S.Q	Q.M	F	P
VAR	1	2.21021	2.21021	19.95	0.0466*
NPK	1	1.32667	1.32667	11.98	0.0743
SUB	2	1.45472	0.72736	6.57	0.1322
VAR*NPK	1	0.13868	0.13868	1.25	0.3795
VAR*SUB	2	0.15122	0.07561	0.68	0.5943
NPK*SUB	2	0.15545	0.07772	0.70	0.5877
Erro	2	0.22155	0.11078		
Total	11	5.65849			

CV = 19.588%

14d. Peso fresco das raízes

F. V.	GL	S.Q	Q.M	F	P
VAR	1	0.00563	0.00563	0.27	0.6565
NPK	1	0.11213	0.11213	5.32	0.1474
SUB	2	0.28152	0.14076	6.68	0.1301
VAR*NPK	1	0.05333	0.05333	2.53	0.2525
VAR*SUB	2	0.06102	0.03051	1.45	0.4084
NPK*SUB	2	0.02102	0.01051	0.50	0.6671
Erro	2	0.04212	0.02106		
Total	11	0.57677			

CV = 23.469%

14e. Número de folhas

F. V	GL	S.Q	Q.M	F	P
VAR	1	1.24694	1.24694	0.74	0.3993
NPK	1	1.73361	1.73361	1.03	0.3218
SUB	2	25.9072	12.9536	7.67	0.0030
VAR*NPK	1	0.61361	0.61361	0.36	0.5527
VAR*SUB	2	4.76389	2.38194	1.41	0.2651
NPK*SUB	2	9.94389	4.97194	2.95	0.0735
VAR*SUB*NPK	2	3.89389	1.94694	1.15	0.3339
Erro	22	37.1311	1.68778		
Total	35	271.263			

CV = 27.723%

14f. Número de raízes

F. V.	GL	S.Q	Q.M	F	P
VAR	1	109.203	109.203	12.49	0.0019
NPK	1	4.48028	4.48028	0.51	0.4817
SUB	2	29.1106	14.5553	1.66	0.2123
VAR*NPK	1	12.6025	12.6025	1.44	0.2428
VAR*SUB	2	15.6950	7.84750	0.90	0.4221
NPK*SUB	2	16.4672	8.23361	0.94	0.4053
VAR*SUB*NPK	2	2.70500	1.35250	0.15	0.8577
Erro	22	192.424	8.74657		
Total	35	764.703			

CV = 29.098%