

Bio-271



**UNIVERSIDADE EDUARDO MONDLANE**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS**

**DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**Trabalho de Culminação de Curso**  
(Investigação)

Avaliação de dois métodos para multiplicação *in vitro* de três variedades locais de mandioca (*Manihot esculenta* Crants)



**Autora:**  
**Adília de Jesus Faustino Viegas**

**Maputo, Janeiro de 2008**



**UNIVERSIDADE EDUARDO MONDLANE**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS**

**DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**Trabalho de Culminação de Curso**

**Avaliação de dois métodos para multiplicação *in vitro* de três variedades locais de mandioca (*Manihot esculenta* Crants)**

**Autora:**

**Adília de Jesus Faustino Viegas**

**Supervisor**

**Prof. Dr. Orlando Quilambo**

**Co-supervisores:**

**dr<sup>a</sup>.: Célia Martins**

**dr<sup>a</sup>.: Carla Torres do Vale**

**dr.: Sofrimento Matsimbe**

**Maputo, Janeiro de 2008**

## Agradecimentos

Primeiramente, agradeço a Deus por ter me dado a oportunidade de estar no mundo.

Aos meus pais, Vasco de Albuquerque Viegas e Luisa Faustino Mazive, e meus irmãos, agradeço pelo estímulo e apoio incondicional desde a primeira hora, pela paciência e grande amizade com que sempre me ouviram, e sensatez com que sempre me ajudaram, por todo o amor, carinho, compreensão e respeito.

Meus agradecimentos especiais aos meus supervisores pela sua permanente disposição, por todo apoio concedido e pelo encorajamento na realização do presente trabalho.

Meus agradecimentos especiais a esta Faculdade e seus Professores, responsáveis pela minha formação.

A todos meus colegas, amigos e familiares que directa ou indirectamente contribuíram para a realização deste trabalho.

A todos trabalhadores do Laboratório de Biotecnologia do IIAM, pelo auxílio, sugestões, pessoas sem as quais uma grande parte do meu trabalho não seria possível.

Tenho muito a agradecer e a muitas pessoas. Não cito nomes para não ser injusta com pessoas que me auxiliaram. A todos ofereço esta página...

## **Dedicatória**

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, pois sem ele, nada seria possível.

Aos meus pais Vasco de Albuquerque Viegas e Luísa Faustino Mazive, meus irmãos, cunhados, sobrinhos e amigos pelo incentivo, cooperação, apoio, dedicação e compreensão, em todos os momentos desta e de outras caminhadas.

## Declaração de Honra

Declaro, por minha honra, que o presente trabalho de culminação de curso é fruto do meu trabalho, e que os dados colhidos constituem a mais perfeita realidade.

Adília de Jesus Faustino Viegas  
Adília de Jesus Faustino Viegas

## Resumo

O presente trabalho teve como objectivo determinar o melhor meio de cultura e avaliar a eficiência deste na multiplicação *in vitro* de três variedades locais de mandioca (*Manihot esculenta* Cranz). O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, 2 x 3, sendo testados dois diferentes meios de cultura desenvolvidos pelo Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) e International Institute of Tropical Agriculture (IITA), com três variedades locais de mandioca (Chinhembwe, Munhaça e MZ-89186).

No método desenvolvido pelo CIAT foi acrescido ao meio MS, 20 g de sacarose, 0.10g de *m*-inositol, 10ml de tiamina-HCl, 0.4 ml de BAP, 0.5 ml de GA<sub>3</sub>, 0.2 ml de ANA e 10ml de vitaminas e 6.0 g de agar enquanto que o método desenvolvido pelo IITA o meio MS foi acrescido de 20 g de sacarose, 0.10g de *m*-inositol, 10ml de tiamina-HCl, 5ml de BAP, 1ml de ANA e 10 ml de vitaminas e 6.0 g de agar, distribuído em tubos (2,5 cm de diâmetro x 15 cm de altura) e autoclavados a 121°C por 15 minutos.

A inoculação dos explantes foi efectuada em câmara de fluxo laminar. Após o processo de inoculação, o material foi transferido para sala de crescimento com temperatura 30°C e luminosidade (1.000 lux, 12/12 horas de claro/escuro).

Foram efectuados três subcultivos, nos dois métodos, para todas as variedades. Os subcultivos eram realizados a cada trinta dias, Após 30 dias, avaliaram-se o números de mini-estacas, peso da matéria fresca das folhas e das raízes, número das folhas e das raízes, comprimento das raízes e altura da parte aérea da plântula.

O estudo resultou no desenvolvimento e formação de plântulas em mais de metade dos segmentos caulinares independentemente da variedade.

A taxa média de multiplicação foi aceitável para a variedade Mz-89186 no método desenvolvido pelo IITA tendo apresentado um número médio de mini-estacas de 2,8.

Outros níveis aceitáveis alcançados no método desenvolvido pelo IITA pela variedade Mz-89186 foram: na altura da plântula (4,3 cm), comprimento das raízes (3.41 cm) e peso médio da matéria fresca das raízes (0.348g) e pela variedade Chinhembwe foram: número de raízes (2.65), número de folhas (3.38) e peso da matéria fresca da folha (0.0428 g),

Os resultados mostraram uma elevada percentagem de formação de callus, observada no método desenvolvido pelo CIAT, o que pode ter afectado negativamente a taxa de multiplicação.

## Lista de Figuras

<b>Figura 1.</b> Esquema da propagação <i>in vitro</i> , a partir de uma plântula sã produzida <i>in vitro</i> via cultura de meristemas pode se obter de 3 a 5 novas plântulas.....	18
<b>Figura 2.</b> Número médio de mini-estacas produzidas pelas três variedades locais de mandioca ( <i>Manihot esculenta</i> Crants) quando submetidas aos métodos desenvolvidos pelo IITA e CIAT em dois subcultivos. ....	20
<b>Figura 3.</b> Número médio de mini-estacas produzidas pelas três variedades locais de mandioca ( <i>Manihot esculenta</i> Crants) quando submetidas aos métodos desenvolvidos pelo IITA e CIAT em média dos dois subcultivos. ....	21
<b>Figura 4.</b> Altura média das plântulas produzidas pelas três variedades locais de mandioca ( <i>Manihot esculenta</i> Crants) quando submetidas aos métodos desenvolvidos pelo IITA e CIAT em dois subcultivos. ....	22
<b>Figura 5.</b> Altura média das plântulas produzidas pelas três variedades locais de mandioca ( <i>Manihot esculenta</i> ) quando submetidas aos métodos desenvolvidos pelo IITA e CIAT em média dos dois subcultivos . ....	22
<b>Figura 6.</b> Número médio de raízes produzidas pelas três variedades locais de mandioca ( <i>Manihot esculenta</i> Crants) quando submetidas aos métodos desenvolvidos pelo IITA e CIAT em dois subcultivos. ....	23
<b>Figura 7.</b> Número médio de raízes produzidas pelas três variedades locais de mandioca ( <i>Manihot esculenta</i> Crants) quando submetidas aos métodos desenvolvidos pelo IITA e CIAT em média dos dois subcultivos. ....	24
<b>Figura 8.</b> Comprimento médio das raízes produzidas pelas três variedades locais de mandioca ( <i>Manihot esculenta</i> Crants) quando submetidas aos métodos desenvolvidos pelo IITA e CIAT em dois subcultivos. ....	24
<b>Figura 9.</b> Comprimento médio das raízes produzidas pelas três variedades locais de mandioca ( <i>Manihot esculenta</i> ) quando submetidas aos métodos desenvolvidos pelo IITA e CIAT em média dos dois subcultivos. ....	25
<b>Figura 10.</b> Peso médio da matéria fresca das raízes produzidas pelas três variedades locais de mandioca ( <i>Manihot esculenta</i> Crants) quando submetidas aos métodos desenvolvidos pelo IITA e CIAT em dois subcultivos.....	26
<b>Figura 11.</b> Peso médio da matéria fresca das raízes produzidas pelas três variedades locais de mandioca ( <i>Manihot esculenta</i> Crants) quando submetidas aos métodos desenvolvidos pelo IITA e CIAT em média dos dois subcultivos. ....	26

<b>Figura 12.</b> Número médio de folhas produzidas pelas três variedades locais de mandioca ( <i>Manihot esculenta</i> Crants) quando submetidas aos métodos desenvolvidos pelo IITA e CIAT em dois subcultivos. ....	27
<b>Figura 13.</b> Número médio de folhas produzidas pelas três variedades locais de mandioca ( <i>Manihot esculenta</i> Crants) quando submetidas aos métodos desenvolvidos pelo IITA e CIAT em média dos dois subcultivos . ....	28
<b>Figura 14.</b> Peso médio da matéria fresca da folha produzidas pelas três variedades locais de mandioca ( <i>Manihot esculenta</i> Crants) quando submetida aos métodos desenvolvidos pelo IITA e CIAT em dois subcultivos. ....	28
<b>Figura 15.</b> Peso médio da matéria fresca da folha produzidas pelas três variedades locais de mandioca ( <i>Manihot esculenta</i> ) quando submetida aos métodos desenvolvidos pelo IITA e CIAT em media dos dois subcultivos. ....	29

### **Lista de tabelas**

<b>Tabela 1.</b> Quantidade em ml de soluções stocks adicionada ao meio de cultura desenvolvido pelo CIAT .....	16
<b>Tabela 2.</b> Quantidade em ml de soluções stocks adicionadas ao meio de cultura desenvolvido pelo IITA.....	17

## ÍNDICE

AGRADECIMENTOS.....	I
DEDICATÓRIA.....	II
DECLARAÇÃO DE HONRA.....	III
RESUMO .....	IV
LISTA DE FIGURAS .....	V
LISTA DE TABELAS.....	VI
1. INTRODUÇÃO .....	3
1.1. Justificação do Estudo .....	4
1.2. Revisão Bibliográfica .....	5
2. OBJECTIVOS.....	12
2.1. Objectivo Geral .....	12
2.2. Objectivos Específicos .....	12
3. HIPÓTESES.....	12
4. ÁREA DE ESTUDO .....	12
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	13
5.1. Materiais .....	13
5.1.1. Variedades locais de plântulas cultivadas <i>in vitro</i> :.....	13
5.1.2. Outros materiais: .....	13
5.1.3. Reagentes e Soluções .....	14

5.2. Métodos .....	15
5.2.1. Método desenvolvido pelo CIAT .....	15
a) <i>Preparação das soluções stocks de reguladores de crescimento e vitaminas</i> .....	15
b) <i>Procedimentos para a preparação de 1 litro de meio de cultura</i> .....	15
5.2.2 Método desenvolvido pelo IITA .....	16
a) <i>Preparação de solução stock de reguladores de crescimento</i> .....	16
b) <i>Procedimentos para a preparação de 1 litro de meio de cultura</i> .....	16
5.2.3. Técnicas de esterilização .....	17
5.2.4. Procedimento para multiplicação .....	17
5.2.5. Incubação .....	18
5.3. Observação e controle das plântulas .....	19
5.4. Parâmetros medidos e seus métodos .....	19
5.5. Delineamento experimental .....	19
5.6. Análise estatística .....	19
<b>6. RESULTADOS</b> .....	<b>20</b>
6.1. Taxa de multiplicação .....	20
6.1.1. Número de mini-estacas .....	20
6.2. Parâmetros de crescimento .....	21
6.2.1. Altura das Plântulas .....	21
6.2.2. Número de raízes .....	23
6.2.3. Comprimento das raízes .....	24
6.2.4. Peso da matéria fresca das raízes .....	25
6.2.5. Número de folhas .....	27
6.2.6. Peso da matéria frescas das folhas .....	28
<b>7. DISCUSSÃO</b> .....	<b>29</b>
7.1. Taxa de Multiplicação .....	29
7.2. Parâmetros de crescimento .....	30
<b>8. CONCLUSÃO</b> .....	<b>32</b>
<b>9. RECOMENDAÇÕES</b> .....	<b>33</b>
<b>10. BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>34</b>
<b>11. ANEXO</b>	

## 1. Introdução

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é uma planta arbustiva, perene, pertencente à família das Euforbiáceas. É originária do Continente Americano, provavelmente do Brasil Central e já era amplamente cultivada pelos indígenas, por ocasião da descoberta do Brasil. Eles foram os responsáveis pela sua disseminação por quase toda a América, e os portugueses, pela sua difusão por outros continentes, especialmente Africano e Asiático (Ávila, 2002).

Ela é amplamente difundida nas regiões tropicais, onde se constitui como uma importante base alimentar. As suas raízes são a principal fonte de calorias para, aproximadamente, 600 milhões de pessoas, na África, Ásia, América Latina e Oceânia (Roca *et al.*, 1991 citado por Viana *et al.*, 2001), chegando a fornecer 50% das calorias necessárias a dieta alimentar diária. Todas as partes da planta são utilizadas: raízes são empregues na alimentação humana e animal e na indústria; hastes e folhas (32% de proteína) como fonte de proteína na alimentação humana e animal (Faraldo *et al.*, 2002).

Esta cultura constitui o sexto produto alimentar da humanidade, em volume de produção, depois do trigo, arroz, milho, batata e da cevada (Ávila, 2002).

Em Moçambique a mandioca reveste-se de grande importância na dieta da população ocupando a segunda posição na classificação das culturas alimentares mais produzidas no país, depois do milho (Andrade *et al.*, 2004).

A produção de mandioca no país tem sido grandemente afectada pela prevalência de doenças provocadas por vírus. As doenças com maior impacto são o listrado castanho da mandioca e o mosaico africano da mandioca, doenças que provocam uma série de danos nas folhas e caule, causando estragos maiores nas raízes (apodrecimento da raiz) (Do Vale, 2005).

Ciente da importância da mandioca no país, o Ministério de Agricultura decidiu estabelecer o Laboratório de cultura de tecidos como forma de ajudar a minimizar o impacto destas doenças na produção local desta cultura (Do Vale, 2005).

A cultura de tecidos vegetais pode-se definir como um método de propagação que começa com o isolamento de uma parte da planta (célula, tecido ou órgão) para ser cultivado em meio nutritivo asséptico e debaixo de condições controladas de luz, temperatura e humidade, para obter a regeneração de um novo indivíduo, permitindo a rápida multiplicação de plantas livres de doenças (Albarrán *et al.*, 2003).

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 um conhecimento prévio de nutrientes necessários para o desenvolvimento da planta e assim a formulação de protocolos eficazes.

A cultura de tecidos de mandioca é agora um procedimento realmente estabelecido (Stamp e Henshaw, 1986 citados por Souza *et al.*, 2002), tendo em conta que protocolos eficazes já existem há vários anos ( Kartha *et al.*, 1974; Roca, 1984 citados por Souza *et al.*, 2002). Assim torna-se necessário avaliar até que ponto esses protocolos são eficazes para as variedades locais.

O presente trabalho teve como objectivo avaliar a eficácia de dois protocolos comerciais para multiplicação *in vitro* tendo em conta plântulas de três variedades locais de mandioca.

### 1.1. Justificação do Estudo

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é uma cultura tropical que devido a sua capacidade de adaptação as diversas condições agroclimáticas, têm papel importante para a segurança alimentar em Moçambique, constituindo a maior fonte de calorias e carboidratos nas zonas rurais (Zacarias, 2004 citado por Matsimbe, 2006).

A mandioca é propagada vegetativamente, através de pequenos segmentos do caule denominados estacas ou manivas. Esse tipo de propagação apresenta inconvenientes tais como a disseminação de doenças sistémicas através das gerações sucessivas, tal como ocorre com as causadas por vírus, que podem acarretar a degenerescência das estacas (Costa e Kitajima, 1972; Iwanaga & Iglesias, 1994 citados por Palazzo *et al.*, 2007). Muitos são os vírus detectados na cultura da mandioca, sendo que o mais disseminado em todo mundo é o vírus do mosaico comum (*Cassava common mosaic virus*, CsCMV) (Costa e Kitajima, 1972 citados por Palazzo *et al.*, 2007).

A produção da mandioca no país tem sido grandemente afectada por vários factores, dos quais tem maior relevância a prevalência de doenças virais nomeadamente o Listrado Castanho ou Podridão Radicular da Mandioca (*Cassava Brown Streak Disease* - CBSD) e o Mosaico Africano da Mandioca (*African Cassava Mosaic Disease* - ACMV). 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 (Matsimbe, 2006).

Para a limpeza de fitovírus, a técnica mais utilizada, tem sido a cultura de tecidos (*in vitro*) (Palazzo *et al.*, 2007). Na Nigéria e na Índia a utilização desta técnica resultou na obtenção de 80% e 60% de clones de mandioca livres de *African cassava mosaic virus* (ACMV) e *Indian*

*cassava mosaic Virus* (ICMV), respectivamente (Vasanthi *et al.*, 2001; Adejere & Coutts, 1981, citados por Palazzo *et al.*, 2007).

Para o país esta técnica pode constituir um método auxiliar na produção eficiente de estacas de mandioca com alta qualidade fitossanitária e posterior distribuição pelos camponeses.

De acordo com Faria *et al.* (2002) citados por Unemoto *et al.* (2006), o sucesso na tecnologia e aplicação dos métodos de cultura *in vitro* deve-se a uma melhor compreensão dos requerimentos nutricionais das células e tecidos em cultura. A formulação do meio de cultura é essencial para a planta, pois concentra os nutrientes necessários para seu desenvolvimento, podendo ser formulado com diferentes combinações de acordo com os requerimentos de cada espécie.

A variabilidade na resposta morfogénica *in vitro* existe tanto entre espécies do mesmo género como também entre genótipo da mesma espécie (distintas cultivares ou clones) o que significa, com frequência, a necessidade de se definirem protocolos eficazes (Cazé Filho, s/d).

Embora já existam protocolos variados, torna-se necessário avaliar a qualidade do sistema comercial de multiplicação *in vitro*, uma vez que este é influenciado por diversos factores tais como a taxa de multiplicação, altura das plantas, presença e intensidade de estiolamento, forma, coloração e tamanho das folhas, formação de callus, desenvolvimento de raízes, perdas por contaminação microbiana, oxidação e eficiência da aclimação (Oliveira *et al.* 2001 citados por Lima e Morães 2006).

## **1.2. Revisão Bibliográfica**

### **1.2.1. Origem e distribuição da mandioca**

A América do Sul, provavelmente a região amazónica pode ter sido o centro de origem das espécies que ocasionaram o *Manihot esculenta*, embora hajam algumas controversas em relação a origem exacta dos progenitores das cultivares modernas, contudo, arqueológicas apontam para a região amazónica como o centro de domesticação (Hillocks, 2002).

No Séc. XVI, navegadores portugueses levaram a mandioca do Brasil para a costa oeste de África (Jones, 1959, citado por Hillocks, 2002) e mais tarde para este de África através de Madagáscar e Zanzibar (Jennings, 1976 citado por Hillocks, 2002). Em Moçambique, segundo Carter *et al.* (1992) citando Alpers (1975) a primeira introdução foi na Ilha de Moçambique em 1768.

### 1.2.2. Classificação da mandica

A mandioca pertence à família Euphorbiaceae, uma das maiores dentro das dicotiledôneas. Nesta família, são encontrados 290 géneros e aproximadamente 7500 espécies distribuídas em todas as regiões tropicais e subtropicais do globo, principalmente na América e África (Barroso *et al.*, 1984, citados por Dallaqua e Coral, 2002).

Segundo Fukuda e Silva (2002) dentro da botânica sistemática de classificação hierárquia a mandioca pertence a: Classe das Dicotyledoneae, a Sub-classe Archichlamydeae, a Ordem Euphorbiales, a Família Euphorbiaceae, a Sub-família Manihotae, o Género *Manihot*, a Espécie *Manihot esculenta* Crantz.

### 1.2.3. Produção

A Nigéria e o Brasil até 2005 eram os maiores produtores do mundo de mandioca, com 38 e 27 milhões de toneladas respectivamente (FAO, 2006 citado por Palazzo *et al.*, 2007). Em África, Moçambique até 2004 ocupava o 5º lugar na produção, com cerca de 5.4 milhões de toneladas métricas, depois da Nigéria, Congo Democrático, Ghana e Tanzânia (FAO, 2004 citado por Matsimbe, 2006). Até 2004 era maioritariamente produzida na zona norte nas províncias de Cabo Delgado e Nampula, no centro na Zambézia e na zona sul na província de Inhambane, apesar de ao longo do país existirem outros focos de produção de mandioca (INIA/SARRNET, 2003) sendo a província de Nampula até 2004 a maior produtora a nível nacional (Andrade *et al.*, 2004).

### 1.2.4. Factores que afectam a produção em Moçambique

A limitação na produção da mandioca é na maior parte devido às tradicionais práticas de cultura, pois na actual estrutura e funcionamento dos sistemas de cultivo a mandioca vem no fim da rotação; usam-se técnicas de cultivo com pobres rendimentos; combinados com a ausência de insumos especialmente os fertilizantes; e preferem-se normalmente variedades tradicionais que não se adaptam bem e são muito sensíveis a pragas e doenças causadas pelo vírus Listrado Castanho da Mandioca (Alaux e Fauquet, 1987), cuja prevalência chega a atingir cerca de 80-100% de incidência, particularmente nas regiões costeiras (Hillocks *et al.*, 2002). Estudos realizados nestas regiões mostraram que esta doença, pode causar perdas de rendimento na ordem de 52% (Maleia, 2003).

O controle das doenças de origem viral é complexo, envolvendo diferentes métodos, desde a eliminação de plantas infectadas até à aplicação de outros métodos mais sofisticados (Alaux & Fauquet, 1987), como a cultura de tecidos, que se tem mostrado muito eficiente para obtenção de plântulas livres de doenças na cultura de mandioca (IITA, 2002).

#### 1.2.5. Cultura de tecidos vegetais

Esta é uma técnica de multiplicação de células ou tecidos vegetais sob condições controladas, a partir de fragmentos das plantas, tais como: gemas auxiliares, apicais, fragmentos foliares, etc., assepticamente em meio nutritivo. Para chegar à condição de assepsia adequada, são usados frascos de vidro ou tubos de ensaio, razão pela qual, essa técnica é também chamada de cultivo *in vitro* (Embrapa, 2006).

A cultura de tecidos é fundamentada pela totipotencialidade das células, ou seja, pela capacidade das células somáticas regenerarem plantas completas (Souza *et al.*, 2002).

#### 1.2.6. Factores que afectam a regeneração *in vitro*

Existem três factores que afectam a regeneração da planta *in vitro*:

- Genótipo (qual espécie, cultivar ou variedade a usar).

A escolha do genótipo a ser utilizado na cultura de tecidos vai depender dos objectivos experimentais (Andrade, 2002).

As variedades de uma espécie respondem de maneiras diferentes as condições de cultivo (Mantell *et al.*, 1994 citados por Andrade, 2002).

- A fonte de explante (folha, raiz, caule, meristema, etc.).

É um factor importante no sucesso da regeneração *in vitro*, pois a capacidade da regeneração depende da maturidade, dos estágios fisiológicos e do tecido utilizado.

Os tecidos jovens e em crescimento são geralmente os mais usados como fonte de explante (Andrade, 2002).

- A condição de cultura (meio de cultura, luz, temperatura e recipiente).

O meio de cultura é decisivo para o sucesso da regeneração *in vitro*.

O meio de cultura é constituído de sais minerais (micro e macronutrientes), nitrogénio reduzido, uma fonte de carbono, vitaminas e reguladores de crescimento, necessárias para manter a divisão celular e a proliferação do explante. A combinação adequada entre estes componentes associados as demais condições de cultura como, luz (intensidade, qualidade e fotoperíodo), temperatura e

recipientes de cultura (tamanho e permeabilidade gasosa) são a base da tecnologia da cultura de tecidos vegetais (Andrade, 2002).

O sucesso da iniciação e da regeneração da cultura *in vitro* depende da decisão correcta no estabelecimento de todos estes factores (Andrade, 2002).

### **1.2.7. Vantagens e desvantagens de cultura de tecidos**

#### **1.2.7.1. Vantagens de cultura de tecidos**

Segundo Guerra, (2007) a cultura de tecidos apresenta as seguintes vantagens:

- Alta taxa de multiplicação;
- Rapidez na multiplicação;
- Controle das condições de cultivo;
- Propagação contínua ao longo do ano;
- Propágulos livres de doenças e pragas;
- Custo baixo uma vez estabelecido e optimizado o protocolo;
- Espaço reduzido;
- Armazenamento a longo prazo de germoplasma;
- Adaptado para plantas de difícil propagação.

#### **1.2.7.2. Desvantagens de cultura de tecidos**

Segundo Guerra, (2007) a cultura de tecidos apresenta as seguintes desvantagens:

- Exige instalações e equipamentos especializados;
- A capacitação tecnológica deve ser maior;
- Os protocolos regenerativos não estão disponíveis para todas as espécies;
- Laboratórios são caros de instalar.

### **1.2.8. Principais fases na multiplicação *in vitro* de plantas**

O Prof. Murashige (1974) citado por Zavattieri, (2002) definiu 3 fases principais na multiplicação *in vitro* de plantas, tanto para os laboratórios comerciais como para os de investigação.

### 1ª fase

Seleção dos explantes, desinfestação e cultura em meio nutritivo, sob condições assépticas.

### 2ª fase

Multiplicação dos propágulos, mediante sucessivas subculturas em meio próprio para multiplicação.

### 3ª fase

Transferência das partes aéreas produzidas para meio de enraizamento e subsequente transplante das plantas obtidas para substrato ou solo. Nesta fase, a planta fica mais susceptível ao stress hídrico e ainda passa de uma existência heterotrófica para um estado autotrófico.

#### 1.2.9. Técnicas de propagação *in vitro*

Para se fazer a propagação *in vitro*, utilizam-se várias metodologias ou técnicas dentre as quais algumas são usadas com maior ou menor sucesso na reprodução e melhoramento genético de espécies, tais como: cultivo de anteras (Perea-dallós, 1992; Kerbellec, 1993; Assani *et al.*, 2002, citados por Nóbrega, 2006), cultivo de embriões (Shepherd *et al.*, 1994 citados por Nóbrega, 2006) e cultivo de meristemas (Borges *et al.*, 1994; Ruggiero *et al.*, (1986 e 1996); Souza *et al.*, 2000 citados por Nóbrega, 2006).

Dentre as diversas biotécnicas de culturas *in vitro* actualmente empregues, a cultura de ápices caulinares (meristema apical associado a 1-3 primórdios foliares) é a de maior impacto para a agricultura, já que vêm sendo utilizada na propagação de muitas espécies (Souza *et al.*, 2002).

#### 1.2.10. Aplicações de cultura de tecidos em mandioca

As principais aplicações de cultura de tecidos (cultura de ápices caulinares) para mandioca são:

➤ Eliminação de doenças:

devido à sua propagação vegetativa por estacas, a mandioca fica exposta a problemas fitossanitários, especialmente doenças de origem viral (Matos *et al.*, 1988 citados por Souza *et al.*, 2002), as quais podem ser de natureza sistémica, podem permanecer por tempo indeterminado no interior das estacas, dificultando sua detecção e controle especialmente

quando se encontram na forma latente (CIAT, 1980, citado por Souza *et al.*, 2002). A cultura de tecidos em mandioca tem sido amplamente usada como forma de superar os riscos associados ao método de propagação tradicional (Souza *et al.*, 2002).

➤ Recuperação do vigor e da produtividade:

devido ao longo ciclo, propagação assexuada e baixa taxa de multiplicação da mandioca, as plantas ficam sujeitas à acção de diversos factores tais como as pressões bióticas (doenças e pragas) e abióticas (clima, pH do solo, deficiência ou toxidez nutricional), que podem diminuir a qualidade do material de plantio e conseqüentemente, a produção de raízes (Souza *et al.*, 2002). Estudos efectuados por Lozano *et al.* (1984), citados por Souza *et al.* (2002) mostraram que ao usar estacas de plantas regeneradas depois do cultivo de ápices caulinares, os rendimentos de raízes e amido aumentaram em 69.5% e 70.3% respectivamente, em comparação com o material convencional de plantio.

➤ Multiplicação de variedades:

as taxas de propagação alcançadas pela cultura de ápices caulinares são consideradas maiores que os possíveis métodos tradicionais baseados em manivas (Stamp e Henshaw, 1986, citados por Souza *et al.*, 2002). Ao extrair os brotos das plantas de mandioca e criar condições para que cresçam sob condições controladas em laboratório, grande número de indivíduos pode ser produzido em qualquer momento do ano, com características genéticas da planta original (Smith *et al.*, 1986).

➤ Intercâmbio de germoplasma:

o movimento de plantas e de parte de plantas entre regiões ou países desempenha um papel importante no processo de transferência de tecnologia realizado por instituições nacionais e internacionais (Roca, 1982, citado por Souza *et al.*, 2002). No entanto, tal movimento está restringido por regulamentação que dificulta a introdução de germoplasma, especialmente de propagação vegetativa, como é o caso da mandioca, devido aos riscos de disseminação de pragas e doenças (CIAT, 1980 citado por Souza *et al.*, 2002). É por este motivo que o intercâmbio internacional de germoplasma de mandioca na forma vegetativa se encontra restringido por regulamentações quarentenárias (CIAT, 1980 citado por Souza *et al.*, 2002),

que variam de país para país, desde aqueles em que a introdução de estacas é permitida até aqueles onde a sua entrada é proibida (Souza *et al.*, 2002).

O sistema de cultivo *in vitro* têm sido adoptado em diversos países como uma forma de controlar aspectos fitossanitários, facilitando e agilizando o intercâmbio internacional de germoplasma de mandioca (Roca *et al.*, 1984 citados por Smith *et al.*, 1986). A propagação da mandioca por cultura de tecidos proporciona algumas vantagens que permitem o seu emprego na transferência de germoplasma tais como:

- a) Limpeza de doenças, de tal forma que possa satisfazer os regulamentos de quarentena;
- b) Pequeno porte, que permite transferir um grande número de acessos de mandioca;
- c) Taxa de propagação potencialmente alta (CIAT, 1980 e 1982 citados por Smith *et al.*, 1986).

➤ **Conservação de germoplasma:**

como um método valioso de apoio a preservação do germoplasma de mandioca no campo, a conservação *in vitro* sob condições de crescimento mínimo, mediante o cultivo de ápices caulinares, torna-se um procedimento adequado para manter uma grande colecção em pequeno espaço físico, livre de doenças e pragas, e sem risco de perdas por problemas edafoclimáticos, por outro lado permiti uma elevada taxa de propagação de plantas saudias em qualquer época do ano (Roca *et al.*, 1982; Mafla *et al.*, 1993 citados por Souza *et al.*, 2002). Desta forma, este sistema de conservação assegura uma alta viabilidade do material e ainda traz como vantagem o facto de ser um procedimento simples e de rápido estabelecimento (CIAT, 1980 citado por Souza *et al.*, 2002).

### **1.2.11. Importância de cultura de tecidos para Moçambique**

A cultura de tecidos é aplicada a culturas de propagação vegetativa como o caso da mandioca e batata-doce (Cossa, 2005). Estas culturas são de extrema importância no que diz respeito a segurança alimentar dos mais necessitados, pois são culturas resistentes à seca.

Contudo, a cultura da mandioca no norte do país esta sendo atacada pelo vírus do Listrado Castanho da Mandioca, assim esta técnica será de extrema importância no que concerne a produção de plantas de mandioca livres do vírus e posterior distribuição pelos camponeses, ou mesmo para uma exploração comercial com vantagens económicas (Cossa, 2005).

## 2. Objectivos

### 2.1. Objectivo Geral

- Avaliar e comparar dois métodos para multiplicação *in vitro* de três variedades locais de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz).

### 2.2. Objectivos Específicos

- Determinar e comparar as taxas de multiplicação dos dois métodos para propagação *in vitro* de três variedades locais de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz).
- Determinar e comparar as taxas de crescimento dos dois métodos para multiplicação *in vitro* de três variedades locais de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz).

## 3. Hipóteses

$H_0$ : As taxas de multiplicação e de crescimento nos dois métodos não irão diferir

$H_1$ : As taxas de multiplicação e de crescimento nos dois métodos irão diferir

## 4. Área de Estudo

O experimento foi realizado no laboratório de biotecnologia do Instituto de Investigação Agrária de Moçambique (IIAM) situado na Avenida das FPLM, Bairro de Mavalane A, Maputo, durante os meses de Setembro a Novembro de 2007.

A principal missão do laboratório de biotecnologia do IIAM é a produção massiva de plantas livres de doenças para sua multiplicação em campo, com equipamento moderno. O Laboratório serve igualmente para diagnóstico e limpeza de doenças e facilita a importação e exportação de plantas *in vitro* com destaque para culturas de propagação vegetativa como mandioca, batata reno e banana.

## 5. Materiais e Métodos

Na multiplicação *in vitro* foram utilizados métodos desenvolvidos pelo CIAT e IITA. As variedades foram multiplicadas por três subcultivos de 30 dias (subcultivo 1 a 3) e em meio de cultura composto por macros e micronutrientes do meio MS (Murashige e Skoog).

### 5.1. Materiais

#### 5.1.1. Variedades locais de plântulas cultivadas *in vitro*:

- Chinhembwe
- Munhaça
- MZ-89186

#### 5.1.2. Outros materiais:

- Tubos de ensaio com tampas (2,5 cm de diâmetro x 15 cm de altura)
- Frascos contendo as plântulas *in vitro*
- Conta-gotas
- Lápis ou caneta
- Papel de alumínio
- Parafilme
- Pinças
- Bisturis
- Pipetas graduadas (1ml, 2ml, 5ml, 10ml)
- Autoclave
- Medidor de pH
- Agitador magnético
- Câmara de fluxo laminar
- Lamparina
- Balanças analítica
- Régua

- Marcador de tinta permanente
- Etiquetas
- Algodão
- Sabão
- Bloco de notas
- Balão volumétrico (100ml, 200ml, 1000ml)
- Copos (100ml, 200ml, 500ml, 1000ml)
- Microondas

### 5.1.3. Reagentes e Soluções

- Água destilada
- Meio MS
- Etanol a 70% e 95%
- Sacarose
- Agar
- BAP
- ANA
- GA<sub>3</sub>
- HCl
- Tiamina-HCl
- *m*-inositol
- KOH e NaOH a 0.1 e 0.5N

## 5.2. Métodos

### 5.2.1. Método desenvolvido pelo CIAT

#### *a) Preparação das soluções stocks de reguladores de crescimento e vitaminas*

**Benzilaminopurina (BAP) (0.01M)** - dissolveu-se 20 mg de BAP num volume de 1,0 N de HCl, completou-se com água destilada até obter um volume de 200 ml, que correspondeu a 0.1M solução de hormonas. Levou-se 20 ml da solução de 0.1M e acrescentou-se água destilada até obter um volume de 200 ml (que corresponde a solução de 0.01M). Rotulou-se como Solução stock de BAP.

**Ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) (0.01M)** - dissolveu-se 22 mg (90% Ácido giberélico) num volume de 1,0 N de KOH, completou-se com água destilada até obter um volume de 200 ml. Levou-se 20 ml da solução acrescentou-se água destilada até obter um volume de 200 ml (que corresponde a solução de 0.01M). Rotulou-se como Solução stock de (GA<sub>3</sub>).

**Ácido naftaleno acético (ANA) (0.01M)** - dissolveu-se 20 mg de ANA num volume de 1,0 N de KOH, completou-se com água destilada até obter um volume de 200 ml. Levou-se 20 ml da solução acrescentou-se água destilada até obter um volume de 200 ml (que corresponde a solução de 0.01M). Rotulou-se como Solução stock de ANA.

**Solução stock de vitamina** - Pesou-se os 0.2g de tiamina-HCl, dissolveu-se com 100ml de água destilada. Depois de se tornar homogênea, colocou-se a solução num balão volumétrico de 200ml e adicionou-se água destilada até ao volume final e rotulou-se como Solução stock de mistura de vitaminas.

#### *b) Procedimentos para a preparação de 1litro de meio de cultura*

1. Encheu-se um copo para 1 litro com 200 ml a 300 ml de água destilada colocou-se num agitador magnético e adicionou-se 20 g de sacarose.
2. Adicionou-se 0.10g de *m*-inositol, 10ml de tiamina-HCl.
3. Adicionou-se soluções stocks de acordo com a tabela 1 abaixo
4. Dissolveu-se 6.0 g de ágar
5. Completou-se com água destilada até obter um volume de 1000ml de solução.

6. Ajustou-se o pH para 5.7 usando gotas de HCl e NaOH, ambos 0.1 N.
7. Colocou-se o copo contendo a solução no microondas durante 10 minutos.
8. Distribuiu-se 2.5ml do meio em tubos de ensaio com tampas e autoclavou-se o meio por 15 minutos a temperatura de 121°C.
9. Colocou-se os frascos com o meio num lugar fresco até o ágar solidificar.

**Tabela 1.** Quantidade em ml de soluções stocks adicionada ao meio de cultura desenvolvido pelo CIAT.

Soluções stocks	Quantidade (ml)
Solução stock de BAP	0.4
Solução stock de GA <sub>3</sub>	0.5
Solução stock de ANA.	0.2
Solução stock de vitaminas	10

### 5.2.2 Método desenvolvido pelo IITA

#### *a) Preparação de solução stock de reguladores de crescimento*

**Solução stock de ANA** - mesmo procedimento que o do método desenvolvido pelo CIAT.

**Soluções stock de BAP** - mesmo procedimento que o do método desenvolvido pelo CIAT.

**Solução stock de vitamina** - mesmo procedimento que o do método desenvolvido pelo CIAT

#### *b) Procedimentos para a preparação de 1 litro de meio de cultura*

1. Encheu-se um copo para 1 litro com 200 ml a 300 ml de água destilada e adicionou-se 20g de sacarose e 0.1g de *m*-inositol,
2. Adicionou-se stocks de acordo com a tabela 2 abaixo.
3. Dissolveu-se 6.0 g de ágar.
4. Completou-se com água destilada até obter um volume de 1000 ml de solução.

5. Ajustou-se o pH para 5.7 usando gotas de HCl e NaOH, ambos a 0.1 M.
6. Colocou-se o copo contendo a solução no microondas durante 10 minutos.
7. Distribuiu-se 2.5 ml do meio em tubos de ensaio, tapou-se e autoclavou-se o meio por 15 minutos a temperatura de 121°C.
8. Colocou-se os tubos de ensaio com o meio num lugar fresco até o ágar solidificar.

**Tabela 2.** Quantidade em ml de soluções stocks adicionadas ao meio de cultura desenvolvido pelo IITA

Soluções stocks	Quantidade (ml)
Solução stock de BAP	5
Solução stock de ANA	1
Solução stock de vitaminas	10

### 5.2.3. Técnicas de esterilização

- Trabalhou-se em condições de assepsia, para evitar a contaminação de frascos com bactérias e fungos. Para tal desinfetou-se a área de trabalho (câmara de fluxo laminar) com algodão humedecido em água para remover o pó e as impurezas.
- Limpou-se de novo com algodão humedecido em etanol a 70%.
- Ligou-se a câmara de fluxo laminar trinta (30) minutos antes do seu uso, regulou-se a pressão para 180.
- Lavou-se as mãos com sabão e água.
- Limpou-se as mãos e os braços com etanol a 70%.

### 5.2.4. Procedimento para multiplicação

Os procedimentos para a multiplicação foram iguais para os dois métodos e foram feitos na câmara de fluxo laminar. Assim, retirou-se as folhas e cortou-se a parte aérea das plântulas de mandioca, produzidas *in vitro*, em segmentos de cerca 1cm contendo uma gema lateral com auxílio de pinça e bisturi esterilizados em álcool a 95% (Figura 1) e passados pela chama. Estes segmentos foram utilizados como explantes.

Foram introduzidos 30 explantes de cada variedade nos tubos de ensaio contendo o meio de cultura, foram escolhidas, ao acaso, 10 plântulas de cada variedade originárias dos explantes como amostra. E estas mesmas plântulas forneceram o explantes para o cultivo subsequente.

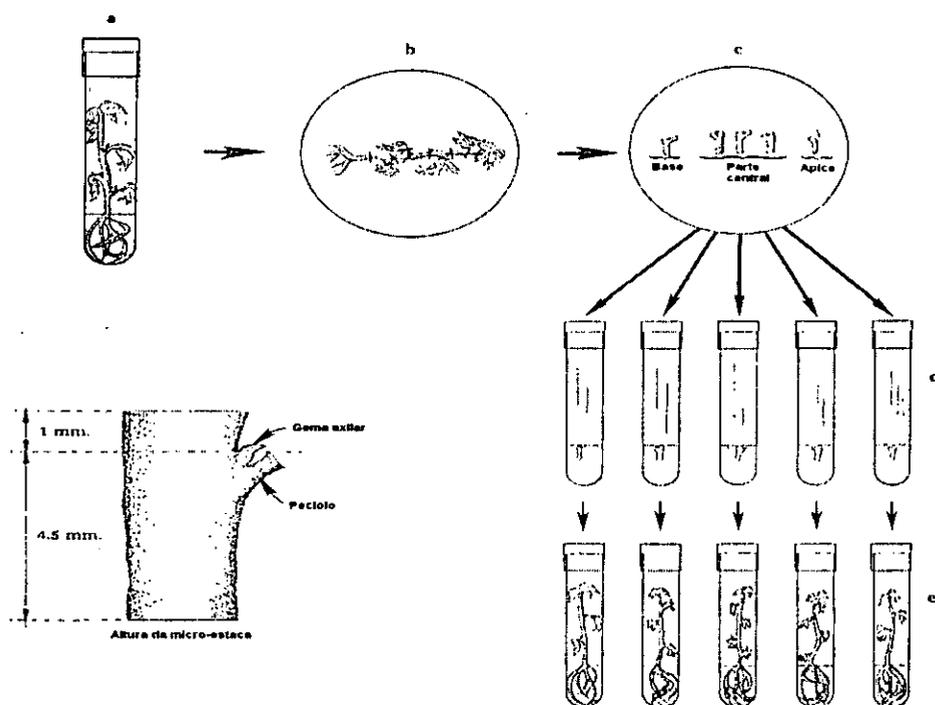


Figura 1. Esquema da propagação *in vitro*, a partir de uma plântula sã produzida *in vitro* via cultura de meristemas pode se obter de 3 a 5 novas plântulas (CIAT, 1982 e Roca, 1984 citados por Fregene *et al.*, 2002).

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*.

### 5.2.5. Incubação

As culturas inoculadas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura 30°C e luminosidade (1.000 lux, 12/12 horas de claro/escuro).

### 5.3. Observação e controle das plântulas

O ensaio foi controlado regularmente para ver se existiam contaminações e o material contaminado foi retirado para evitar que contamina-se outros materiais.

Os dados foram colhidos de 30 em 30 dias, e teve-se em conta a taxa de multiplicação, aparência e vigor no crescimento das plântulas.

### 5.4. Parâmetros medidos e seus métodos

A análise da taxa de multiplicação das plântulas foi feita pela contagem directa de números de mini-estacas produzidas por cada plântula.

A análise de crescimento das plântulas de mandioca foi feita através da determinação de:

- peso da matéria fresca das folhas e das raízes por pesagem na balança analítica independentemente de seu tamanho;
- Número das folhas e das raízes por contagem directa nas plântulas, independentemente de seu tamanho;
- Medição do comprimento das raízes usando uma régua;
- Altura da parte aérea da plântula usando uma régua.

### 5.5. Delineamento experimental

O delineamento experimental adoptado foi inteiramente casualizado considerando as condições (temperatura; humidade relativa; luz e fotoperíodo) homogéneas, 2 tratamentos, 3 variedades e 10 repetições.

### 5.6. Análise estatística

Os dados foram analisados no *Excel*, para comparação dos dois métodos em cada variedade foi usado o teste de comparação de médias (*teste-t pareado*).

## 6. Resultados

As mini-estacas usadas para o estudo desenvolveram-se independentemente da variedade. Ocorreu formação e desenvolvimento de plântulas em mais de metade dos segmentos caulinares inoculados nos dois métodos, tanto no primeiro, como no segundo subcultivo, tendo este número reduzido drasticamente no terceiro subcultivo devido a elevadas contaminações por fungos, o que resultou no descarte.

### 6.1. Taxa de multiplicação

#### 6.1.1. Número de mini-estacas

A variedade "Mz-89186" obteve maior número de mini-estacas nos dois métodos e nos dois subcultivos, tendo esta se destacado no método desenvolvido pelo IITA (Figura 2), apesar das diferenças não terem sido estatisticamente significativas (teste-t,  $P > 0.05$ ).

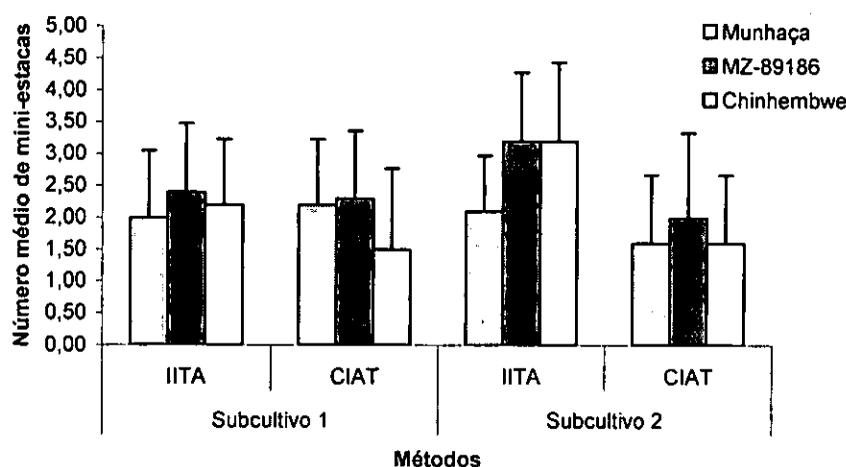
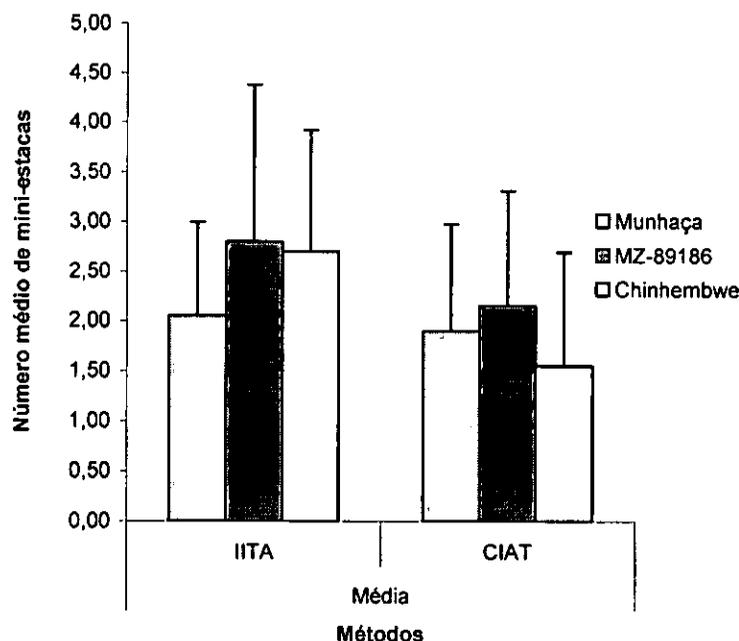


Figura 2. Número médio de mini-estacas produzidas pelas três variedades locais de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) quando submetidas aos métodos desenvolvidos pelo IITA e CIAT em dois subcultivos. Cada barra representa a média de 10 plântulas por variedades ± desvio padrão.

Na variedade Munhaça o número de mini-estacas foi linear nos dois métodos e nos dois subcultivos, não havendo também diferenças significativas (teste-t,  $P > 0.05$ ), enquanto que a variedade Chinhembwe e Mz-89186 no subcultivo 2, apresentaram-se com maior número de mini-estacas no método desenvolvido pelo IITA.



**Figura 3.** Número médio de mini-estacas produzidas pelas três variedades locais de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) quando submetidas aos métodos desenvolvidos pelo IITA e CIAT em média dos dois subcultivos. Cada barra representa a média de 20 plântulas por variedades  $\pm$  desvio padrão.

Na média dos dois subcultivos as variedades Mz-89186 e Chinhembwe apresentaram diferenças significativas (teste-t,  $P < 0,05$ ), obtendo maior número médio de mini-estacas no método IITA com 2,8 e 2,7 respectivamente (Figura 3 e Tabela 7 em anexo).

## 6.2. Parâmetros de crescimento

### 6.2.1. Altura das Plântulas

As alturas médias das plântulas foram maiores nas variedades inoculadas no método desenvolvido pelo IITA (Figura 4), no entanto as diferenças não foram significativas para a variedade Mz-89186 nos dois subcultivos e para as variedades Munhaça e Chinhembwe (Teste-t,  $P > 0,05$ ) no primeiro subcultivo.

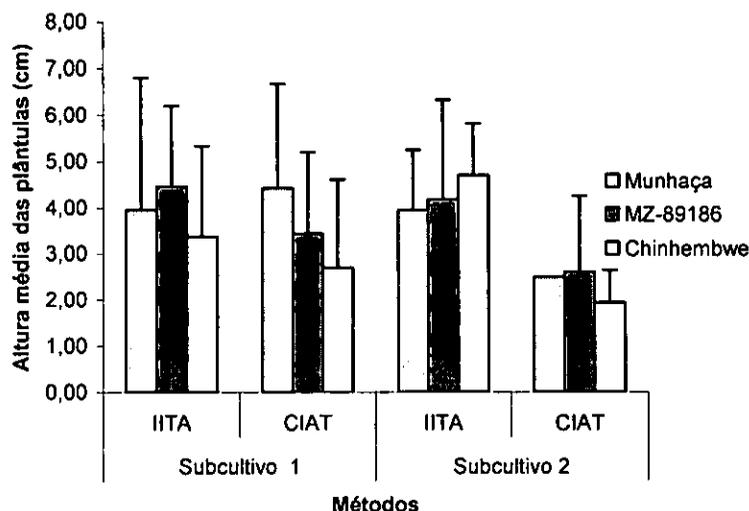


Figura 4. Altura média das plântulas produzidas pelas três variedades locais de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) quando submetidas aos métodos desenvolvidos pelo IITA e CIAT em dois subcultivos. Cada barra representa a média de 10 plântulas por variedades  $\pm$  desvio padrão.

Na média dos dois subcultivos foram encontradas diferenças estatísticas (teste-t,  $P < 0.05$ ) nas variedades Mz-89186 e Chinhembwe (Tabela 6 em anexo) no método desenvolvido pelo IITA e a maiores alturas atingidas foram 4.325 cm e 3.020 cm para as duas variedades respectivamente (Figura 5).

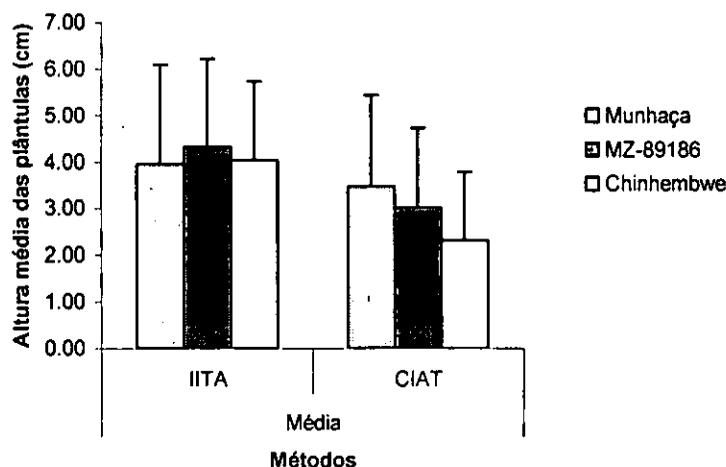


Figura 5. Altura média das plântulas produzidas pelas três variedades locais de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) quando submetidas aos métodos desenvolvidos pelo IITA e CIAT em média dos dois subcultivos. Cada barra representa a média de 20 plântulas por variedades  $\pm$  desvio padrão.

### 6.2.2. Número de raízes

As variedades inoculadas no método desenvolvido pelo IITA obtiveram maior número de raízes nos dois subcultivos do que as variedades inoculadas no método desenvolvidas pelo CIAT (Figura 6) e as variedades Mz-89186 e Chinhembwe obtiveram maior número de raízes no segundo subcultivo com uma média de 3,1 raízes por plântula.

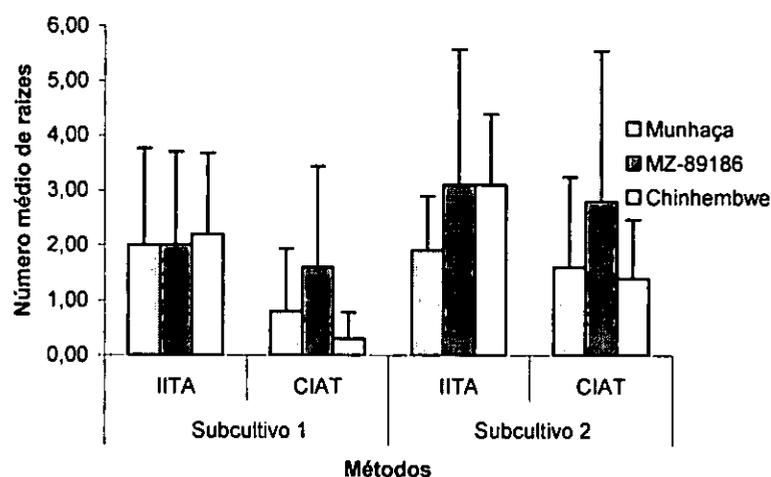


Figura 6. Número médio de raízes produzidas pelas três variedades locais de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) quando submetidas aos métodos desenvolvidos pelo IITA e CIAT em dois subcultivos. Cada barra representa a média de 10 plântulas por variedades  $\pm$  desvio padrão.

Apesar de maior número de raízes no método desenvolvido pelo IITA apenas a variedade Chinhembwe mostrou diferenças significativas (2,65 raízes em média) (teste-t,  $P < 0.05$ ) (Figura 7 e Tabela 4 em anexo).

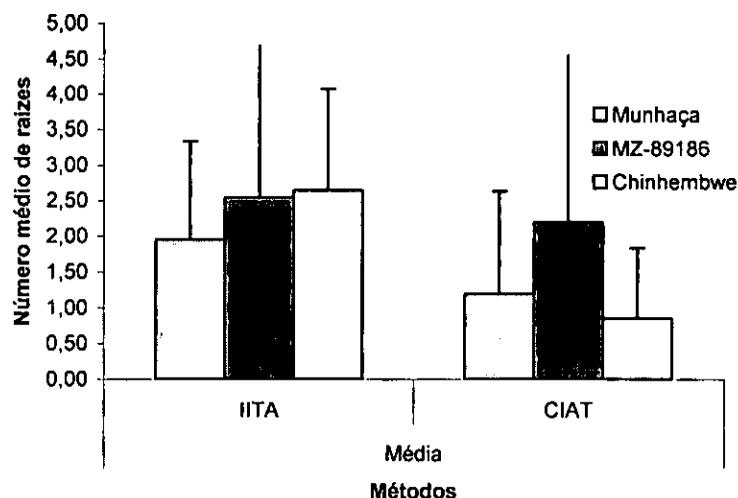


Figura 7. Número médio de raízes produzidas pelas três variedades locais de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) quando submetidas aos métodos desenvolvidos pelo IITA e CIAT em média dos dois subcultivos. Cada barra representa a média de 20 plântulas por variedades  $\pm$  desvio padrão.

### 6.2.3. Comprimento das raízes

As raízes tiveram maiores médias de comprimento no método desenvolvido pelo IITA (Figura 8).

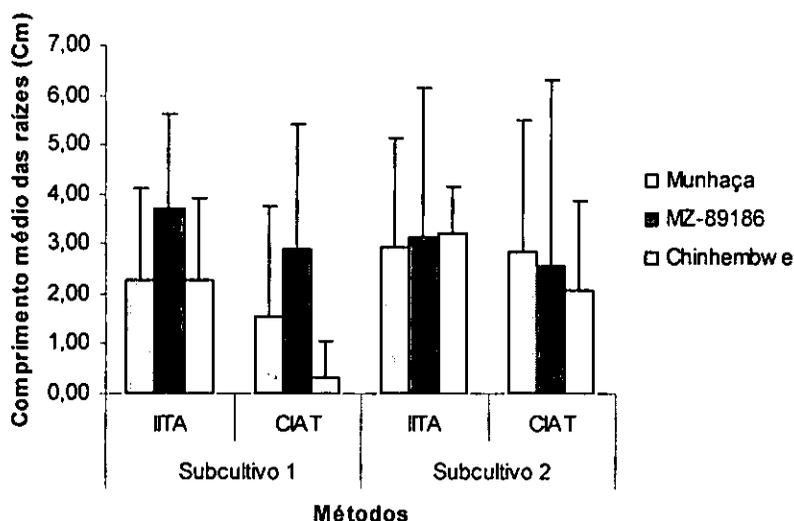
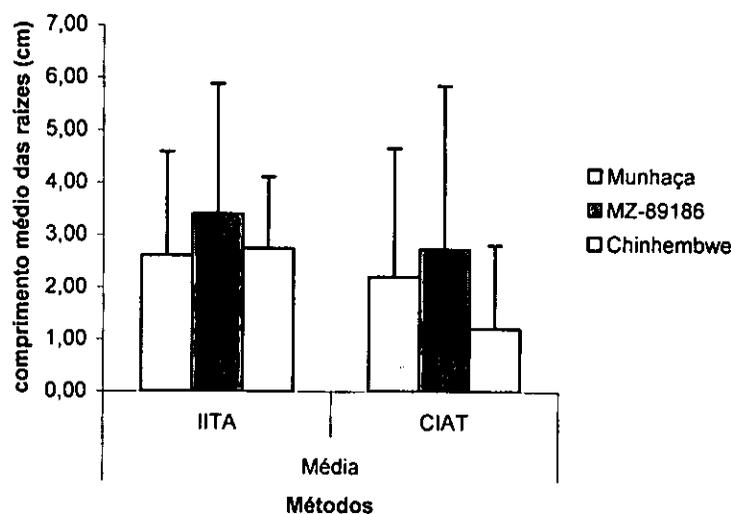


Figura 8. Comprimento médio das raízes produzidas pelas três variedades locais de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) quando submetidas aos métodos desenvolvidos pelo IITA e CIAT em dois subcultivos. Cada barra representa a média de 10 plântulas por variedades  $\pm$  desvio padrão.

O maior número médio de raízes ocorreu no subcultivo 2, para o método desenvolvido pelo IITA, e menor para subcultivo 1 no método desenvolvido pelo CIAT. Nas variedades Munhaça e MZ-89186 as diferenças no comprimento das raízes entre os dois métodos não foram significativas (teste t,  $P > 0,05$ ) (Tabela 4 em anexo).

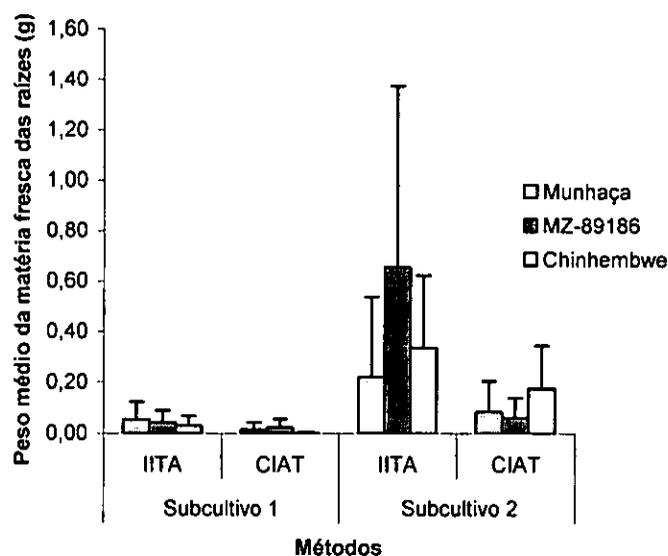


**Figura 9.** Comprimento médio das raízes produzidas pelas três variedades locais de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) quando submetidas aos métodos desenvolvidos pelo IITA e CIAT em média dos dois subcultivos. Cada barra representa a média de 10 plântulas por variedades  $\pm$  desvio padrão.

Na média dos dois subcultivos as médias dos comprimento das raízes na variedade Chinhembwe diferiram estatisticamente (teste-t,  $P < 0,05$ ), tendo as plântulas do método desenvolvido pelo IITA apresentando raízes mais compridas que as plântulas do método desenvolvido pelo CIAT (em média 2,65 e 0,85 cm respectivamente) segundo o teste-t a 5% (Figura 9).

#### 6.2.4. Peso da matéria fresca das raízes

O peso da matéria fresca das raízes foi maior no método desenvolvido pelo IITA (Figura 10) tanto nas três variedades como nos dois subcultivos, mas estatisticamente não foram encontradas diferenças significativas (teste-t,  $P > 0,05$ ) (Tabela 1 em anexo) exceptuando a variedade MZ-89186 no subcultivo 2 que apresentou diferenças significativas (teste-t,  $P > 0,05$ ) (Tabela 1 em anexo), apresentando maior peso da matéria fresca das raízes no método desenvolvido pelo IITA.



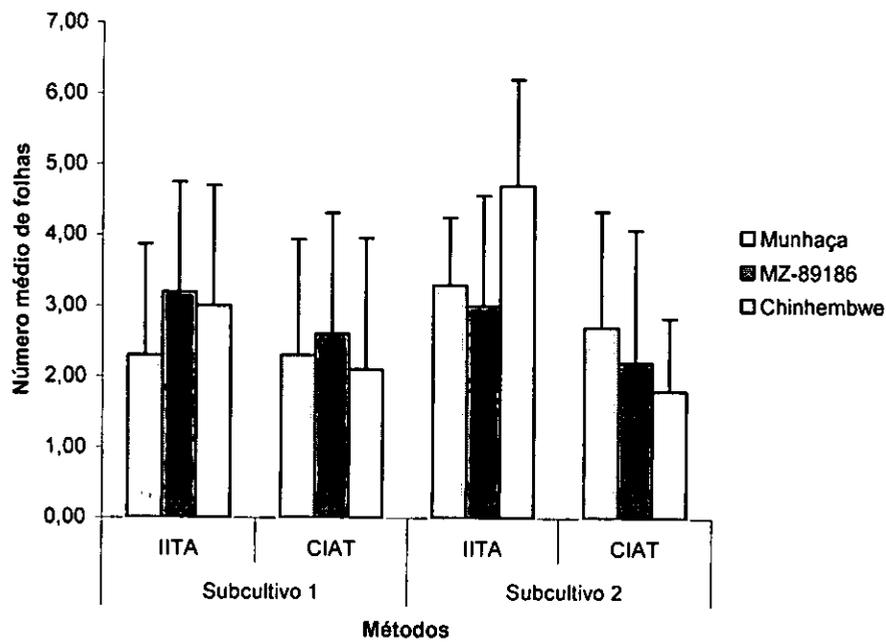
**Figura 10.** Peso médio da matéria fresca das raízes produzidas pelas três variedades locais de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) quando submetidas aos métodos desenvolvidos pelo IITA e CIAT em dois subcultivos. Cada barra representa a média de 10 plântulas por variedades  $\pm$  desvio padrão.

Na média dos dois subcultivos a variedade MZ-89186 apresentou maior peso da matéria fresca das raízes no método desenvolvido pelo IITA (Figura 11).

**Figura 11.** Peso médio da matéria fresca das raízes produzidas pelas três variedades locais de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) quando submetidas aos métodos desenvolvidos pelo IITA e CIAT em média dos dois subcultivos. Cada barra representa a média de 10 plântulas por variedades  $\pm$  desvio padrão.

#### 6.2.5. Número de folhas

A quantidade de folhas mostrou-se elevada no método desenvolvido pelo IITA nos dois subcultivos (Figura 12), não havendo diferenças significativas no número de folhas (teste-t,  $P < 0,05$ ) exceptuando na variedade Chinhembwe no segundo subcultivo no método desenvolvido pelo IITA (Tabela 3 em anexo).



**Figura 12.** Número médio de folhas produzidas pelas três variedades locais de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) quando submetidas aos métodos desenvolvidos pelo IITA e CIAT em dois subcultivos. Cada barra representa a média de 10 plântulas por variedades  $\pm$  desvio padrão.

Na média dos dois subcultivos o método desenvolvido pelo IITA apresentou maiores números médios de folhas do que o método desenvolvido pelo CIAT (Figura 13) mostrando diferenças significativas (teste-t,  $P < 0,05$ ) na variedade Chinhembwe, apresentando em média 3,85 folhas por plântula.

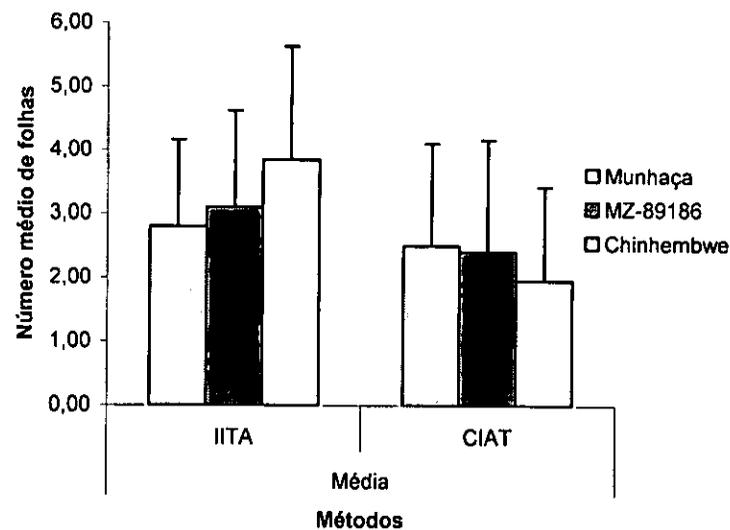


Figura 13. Número médio de folhas produzidas pelas três variedades locais de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) quando submetidas aos métodos desenvolvidos pelo IITA e CIAT em média dos dois subcultivos. Cada barra representa a média de 20 plântulas por variedades  $\pm$  desvio padrão.

#### 6.2.6. Peso da matéria fresca das folhas

O peso da matéria fresca da folha no primeiro subcultivo foi linear nos dois métodos, e no segundo subcultivo apresentou maior peso da matéria fresca das folhas no método desenvolvido pelo IITA (Figura 14) e a variedade Chinhembwe foi a que mais se destacou. A variedade Munhaça não apresentou diferenças significativas (teste-t,  $P > 0,05$ ).

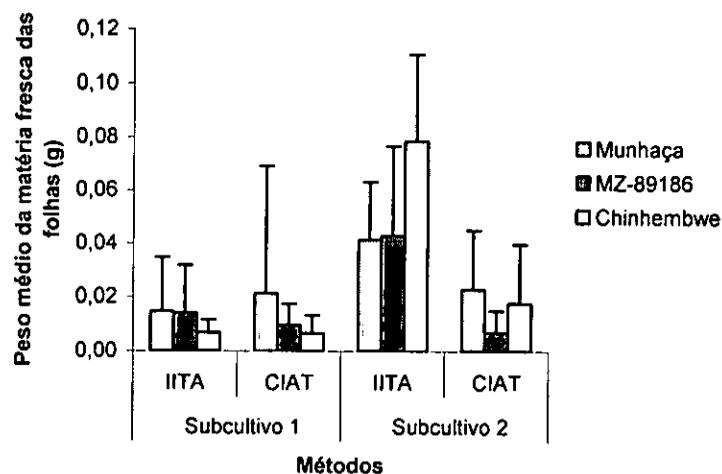


Figura 14. Peso médio da matéria fresca da folha produzidas pelas três variedades locais de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) quando submetidas aos métodos desenvolvidos pelo IITA e CIAT em dois subcultivos. Cada barra representa a média de 10 plântulas por variedades  $\pm$  desvio padrão.

Em contrapartida as variedades Mz-89186 e Chinhembwe na média dos dois subcultivos apresentaram diferenças significativas (teste-t,  $P < 0.05$ ) (Tabela 2 em anexo) tendo apresentado maiores valores do peso da matéria fresca da folha no método desenvolvido pelo IITA 0,029g e 0,0428g respectivamente.(Figura 15).

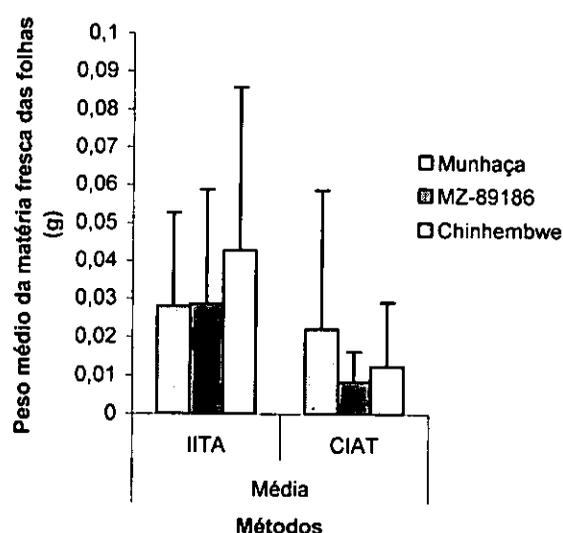


Figura 15. Peso médio da matéria fresca da folha produzidas pelas três variedades locais de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) quando submetidas aos métodos desenvolvidos pelo IITA e CIAT em média dos dois subcultivos. Cada barra representa a média de 20 plântulas por variedades  $\pm$  desvio padrão.

## 7. Discussão

### 7.1. Taxa de Multiplicação

Os resultados obtidos no método desenvolvido pelo IITA nas variedades Mz-8918 e Chinhembwe que apresentaram uma taxa média de multiplicação de 2,8 e 2,7 respectivamente, estão de acordo com estudos feitos por De Oliveira *et al.* (2000), que obteve uma taxa média de multiplicação de 2,9 por subcultivos de 30 dias, utilizando diferentes métodos e variedades.

Por outro lado Acedo (1994), obteve taxas de 4 – 6 em subcultivos de até 60 dias. Broomes e Lacon (1994) obtiveram 2 – 6 utilizando diferentes métodos e variedades.

Esta comparação permite afirmar que a taxa de multiplicação obtida pelas variedades Mz-89186 e Chinhembwe no método desenvolvido pelo IITA permitem níveis aceitáveis para multiplicação.

Segundo Cheema & Sharma (1983), o BAP induz uma alta taxa de multiplicação. O efeito benéfico do BAP na multiplicação dos brotos pode ser relacionado com a influência deste regulador de crescimento na divisão celular e na quebra de dormência das gemas axilares, até então inibidas pela dominância apical. Por outro lado Para Pierik (1990), um adequado balanço entre auxina citocininas estabelece um eficiente controle no crescimento e na diferenciação das culturas *in vitro*.

## 7.2. Parâmetros de crescimento

Maior altura das plântulas foi obtido no método desenvolvido pelo IITA contudo, o método desenvolvido pelo CIAT deveria ter apresentado maiores comprimento devido a presença da hormona GA<sub>3</sub>, porque segundo Serrano & Piñol (1996), o cultivo de plantas em meio com GA<sub>3</sub> induz o alongamento do caule, afectando assim o tamanho das plantas. Esta divergência ocorreu provavelmente devido ao facto do método IITA apresentar maior razão entre as hormonas ANA/BAP e esta relação segundo Bilgrami & Pandey (1998), promove o desenvolvimento da parte aérea.

Do mesmo modo, Abreu & Trevisan (1999), verificaram que o meio com ANA e BAP proporcionou melhor desenvolvimento da parte aérea em segmentos de internódais, principalmente com baixas concentrações de auxina. Por seu lado Diniz *et al.* (2003), em estudos com macela [*Egletes viscosa* (L.) Less.] observou maior crescimento em altura das plantas no tratamento com GA<sub>3</sub> na ausência de BAP, e com adição de BAP ao meio de cultura causou redução no crescimento em altura.

Os resultados mostram que as variedades desenvolvidas no método desenvolvido pelo IITA obtiveram maior número de raízes, estes resultados não estão de acordo com os obtidos por Diniz *et al.* (2003), nos estudos efectuados com macela [*Egletes viscosa* (L.) Less.], onde verificou um maior número de plantas com raízes quando foram utilizadas concentrações crescentes de GA<sub>3</sub>. por outro lado Pasqual *et al.* (1990) citados por Diniz *et al.* (2003), indicou que o GA<sub>3</sub> aumentou a taxa de enraizamento de plantas.

Neste estudo o método desenvolvido pelo CIAT é o que deveria apresentar um maior número de raízes devido à presença de GA<sub>3</sub>. Esta divergência ocorreu provavelmente devido a presença de altas concentrações de ANA no método desenvolvido pelo IITA quando comparado com o

método desenvolvido pelo CIAT. Segundo Nair *et al.* (1979), citados por Lima *et al.* (2002), altas concentrações de ANA induzem a formação de raízes mais vigorosas em plântulas regeneradas de mandioca. As diferenças referentes às concentrações de ANA, que proporcionam melhores frequências de enraizamento, podem ter sido devido aos diferentes níveis endógenos de auxina presentes nas diferentes variedades de mandioca.

O método desenvolvido pelo (IITA) mostrou-se ideal para a multiplicação da variedade Chinhembwe, pois a presença de raízes em quantidades equilibradas nas plântulas de mandioca são benéficas a multiplicação, uma vez que promovem maior absorção de nutrientes e conseqüentemente a produção de gemas para os subcultivos subsequentes (Oliveira & Silva, 1997 citados por De Olivera *et al.*, 2000).

A presença de pelo menos uma raiz forte é essencial na transferência das plântulas para o solo (Love *et al.* 1987), como aconteceu com esta variedade no método desenvolvido pelo IITA.

As variedades apresentaram maiores comprimentos da raiz no método desenvolvido pelo IITA, estes resultados se devem provavelmente a razão auxinas e citocininas, Segundo Skoog e Miller (1957) citados por Brum *et al.* (2002), o aumento da concentração de auxinas em relação às citocininas, promoveria a formação de raízes. De uma maneira geral, as auxinas são as que mais influenciam o processo de enraizamento. No entanto, Brum *et al.* (2002) alcançou os melhores resultados em figo (*Ficus carica*) para comprimento da maior raiz quando se adicionou BAP no meio de cultivo, sendo os maiores valores observados com a utilização de 2 a 4 mg L<sup>-1</sup> de BAP.

A variedade Chinhembwe apesar de ter obtido maior número de raízes no método desenvolvido pelo IITA, o peso da matéria fresca das raízes não mostrou diferenças significativas provavelmente porque os segmentos nodais inoculados no método desenvolvido pelo IITA emitiam raízes de imediato e raízes finas, por seu lado as do método desenvolvido pelo CIAT apresentaram formação de callus (tecidos não diferenciados) e só depois é que emitiram raízes de espessura delgada.

O peso médio da matéria fresca das folhas foi maior no método desenvolvido pelo IITA, resultados que contrariam os verificados por com Bertolucci *et al.* (2000), que trabalhando com segmentos nodais de *Tournifortia paniculata*, verificaram que a presença dos reguladores GA<sub>3</sub> e

ANA induzia a hiperhidratação das folhas nos brotos formados. Este resultado favorece o método desenvolvido pelo CIAT que apresenta estas hormonas na sua composição.

O método desenvolvido pelo IITA apresentou maiores pesos da matéria fresca das folhas, provavelmente devido a relação entre as hormonas BAP/ANA, que é elevada. Pois segundo Bilgrami & Pandey (1998), esta relação promove o desenvolvimento da parte aérea e se esta relação for balanceada na proporção de 1:1, promove o desenvolvimento de callus, o que provavelmente aconteceu no método desenvolvido pelo CIAT, e segundo Roca (1986) citado por De Oliveira *et al.* (2000) a formação de callus em sistemas de micropropagação a partir de gemas laterais e ápices é indesejável, pois pode promover o aparecimento de variantes somaclonais e inibir o crescimento das plântulas.

## 8. Conclusão

- O método desenvolvido pelo IITA mostrou-se mais eficiente que o método desenvolvido pelo CIAT. O método desenvolvido pelo IITA apresentou: maior número médio de mini-estacas, maiores alturas médias das plântulas, maior número médio de raízes, maior comprimento médio de raízes e maior peso médio da matéria fresca das raízes na variedade Mz-89186. A variedade Chinhembwe apresentou maior número médio de folhas e maior peso médio de matéria fresca das folhas quando submetido ao mesmo método.
- A variedade Munhaça respondeu do mesmo modo aos dois métodos podendo-se usar tanto um como outro método para sua multiplicação.
- As variedades Mz-89186 e Chinhembwe foram as que obtiveram resultados aceitáveis no método desenvolvido pelo IITA. Desta forma, este método pode ser utilizado para produção em maior escala destas variedades.

## 9. Recomendações

Diante do constatado, recomenda-se que:

- Sejam testadas modificações nas concentrações de sacarose, nitrogénio e outros nutrientes;
- Se avalie estes métodos com outras variedades locais ou vice e versa;
- Sejam feitos experimentos usando meios modificados de Murashige e Skoog, com diferentes substratos preparados a base de materiais disponíveis localmente e de baixo custo (água de coco) por forma a reduzir-se os custos desta metodologia, atendendo que materiais são caros e escassos no mercado nacional.

## 10. Bibliografia

- Abreu, P. S. S. & Trevisan, M. T. S. (1999). *Iniciação de Cultura de Células, Cultura de Partes Aéreas e Micropropagação de Egletes viscosa* Less. In: Encontro Universitário de Iniciação à Pesquisa, 18., Fortaleza-Brasil
- Acedo, V.Z. (1994). *Meristem culture and in vitro maintenance of Philippine cassava*. In: International Scientific Meeting On Cassava Biotechnology Network, 2. Bogor. Cassava Biotechnology Network., p.202-209.
- Alaux, P. J. & Fauquet, C. (1987). *African cassava mosaic disease*. CTA. Universal. Wettern Belgica. 55pp
- Albarrán J.; F. Fuenmayor & M. Fuchs. (2003). *Propagación Clonal Rápida de Variedades Comerciales de Yuca Mediante Técnicas Biotecnológicas*. Disponível em: [www.ceniap.gov.ve/ceniaphoy/articulos/n3/texto/albaran.htm](http://www.ceniap.gov.ve/ceniaphoy/articulos/n3/texto/albaran.htm) Acessada em 15/05/2007
- Andrade, M. I.; A. Aico; J. Ricardo & A. Sandramo. (2004). *Estudo sobre o Rendimento da Mandioca e Batata doce em Moçambique*. IITA e INIA. Maputo. 19pp
- Andrade, S. R. M. (2002). *Princípios da Cultura de Tecidos Vegetais*. Embrapa. Documentos 58. Brasil.
- Ávila, G. A. C. (2002). *A Cultura da Mandioca de Mesa*. [http://www.emater.mg.gov.br/site\\_emater/Serv\\_Prod/Livraria/Olericultura/CulturaMa...](http://www.emater.mg.gov.br/site_emater/Serv_Prod/Livraria/Olericultura/CulturaMa...) 10/17/aaaa. Acessada em 25/05/2007
- Bertolucci, S. K. V.; Pinto, J. E. B. P.; Cardoso, M. G.; Gavilanes, M. L.; Santiago, E. J. A. & Lameira, O. A. (2000). *Micropropagação de Tournefortia cf paniculata* Cham. Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, Botucatu, v. 3, n. 1, p. 43-49,
- Bilgrami, K. S. & Pandey. (1998). *Introduction to Biotechnology*. CBS Publishers & Distributors. Delhi-India. 178 pp

Broomes, V.F. & Lacon, R. (1994). *Influence of medium components on hardening of cassava after micropropagation in liquid nutrient medium*. In: International Scientific Meeting On Cassava Biotechnology Network, 2.,

Brum, G. R.; A. B. DA Silva, & M. Pasqual. (2002). *Efeito de Diferentes Concentrações de BAP E ANA Na Propagação In Vitro Da Figueira (Ficus carica L.)*. Ciênc. agrotec., Lavras. Edição Especial, p.1403-1409

Carter, S. E.; Fresco, L. O.; Jones, P. G. & Fairbairn, J. N. (1992). *An atlas of cassava in Africa: Historical, agroecological and demografic aspects of crop distribution*. CIAT Publication Nº 206. Cali, Colombia.

Cazé Filho, J. (s/d). *Clonagem do Inhame (Dioscorea sp.) por meio de Métodos Biotecnológicos*. <http://www.emepa.org.br/anais/volume1/av108.pdf>. Acessada em 15/05/2007

Cheema, G. S. & Sharma, D. P. (1983). *In vitro propagation of apple rootstocks-EMLA Acta Horticulturae*, Wageningen, v. 131, p. 75-88.

Cossa, N. S. (2005). *Cultura de tecidos*. IIAM. Poster. Maputo.

Dallaqua, M. A. M. & Coral, D. J. (2002). *Morfo-anatomia*. In: CEREDA, M.P Agricultura: tuberosas amiláceas Latino Americanas. São Paulo: p. 48-65. (Série Culturas de Tuberosas Amiláceas Latino Americanas, v. 2).

De Oliveira, R.; Pedroso, T.; Da S. Gomes & A. D. Vilarinhos; (2000). *Avaliação de um Sistema de Micropropagação Massal De Variedades De Mandioca* Pesq. agropec. bras., Brasília, v.35, n.12, p.2329-2334,

Diniz, J. D. N.; J. L. Almeida; A. L. De A. Teixeira; E. S. Gomes & F. F. F. Hernandez; (2003). *Ácido Giberélico (GA<sub>3</sub>) e 6-Benzilaminopurina (BAP) No Crescimento In Vitro De Macela [Egletes viscosa (L.) Less.]*, Ciênc. agrotec., Lavras. V.27, n.4, p.934-938,

Do Vale, C. (2005). *Laboratório de Cultura de Tecidos*. IIAM. Poster. Maputo.

Embrapa (2006). *Cultura de Tecidos: A Importância desta Técnica para a Biotecnologia e o Agronegócio*. Embrapa e Ministerio da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Brasília

Erig, A. C.; Schuch, M. W.; Silva, L. C. (2004). *In Vitro" Multiplication of Apple Plants (Malus Domestica Borkh.) Cv. Galaxy: Culture Medium*. R. bras. Agrociência, v.10, n. 3, p. 297-302

Faraldo, M. I. F.; R. M. da Silva; A. Ando, & E. A. Veasey. (2002). *Marcadores Moleculares em Mandioca*. In: CEREDA, M.P Agricultura: tuberosas amiláceas Latino Americanas. São Paulo: p.100-117. (Série Culturas de Tuberosas Amiláceas Latino Americanas, v. 2).

Fregene, M.; J. Tohme; W. Roca; P. Chavarriaga; R. Escobar & H. Ceballos. (2002). *Biotecnologia para 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. 377-405 pp.

Fukuda, W. M. G. & S. O. Silva,. (2002). *Melhoramento de mandioca no Brasil*. In: In: CEREDA, M.P Agricultura: tuberosas amiláceas Latino Americanas. São Paulo: p. 242-273 (Série Culturas de Tuberosas Amiláceas Latino Americanas, v. 2)

Guerra, M. P.; (2007). *Introdução à Biotecnologia*. Disponível em: <http://www.cca.ufsc.br/lfdgv/aula1biotago04.pdf>. Acessada em 30/11/2007

Hillocks, R. J. (2002). *Cassava in Africa*, Natural resources institute, University of Greenwich. Chatham marine. Reino Unido. 54pp

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

IITA/UNICEF. (1999). *A Mandioca na África Tropical*. Um manual de referência. IITA. Ibadan, Nigeria.

INIA/SARRNET (2003). *Inquérito Sobre produção Processamento e Mercado da Mandioca e Batata doce em Moçambique*. Relatório Sobre Inquérito realizado em Junho-Agosto 2002. Maputo

Lima, G. P. P; C. Barsalobres; I. M. T. Piza & M. P. Cereda (2002). *Efeito do BAP e ANA na Actividade da Peroxidase em Mandioca (Manihot esculenta CRANTS CV MCOL 22) Cultivada In Vitro*. Revista Brasileira Agociência. V. 8, n. 2 p. 107-110

Lima, J. D. & W. da S. Morães. (2006). *Concentração de Benzilaminopurina e Avaliação de Protocolo para Multiplicação In Vitro de Genótipos de Bananeira*. Pesquisa Agropecuária Tropical, 36 (1): 13-19,

Love, S.L.; B.B Rhodes & S.P Gernil. (1987). *Meristem-tip culture and virus indexing of sweet potatoes. Practical manuals for handling crop germplasm "in vitro"*. Roma: International Board for Plant Genetic Resources, 46 p.

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. Universidade Eduardo Mondlane. Maputo

Matsimbe, S. F. (2006). *Aclimatização das variedades locais da mandioca produzidas in vitro*. Tese de licenciatura. UEM. Dep. de Ciências Biológicas.

Nóbrega, J. P. R. (2006). *Produção de Mudas de Bananeira (Musa Sp. Aab) em Função da Poda e Doses de Nitrogênio e Boro*. Tese. Mestrado em Agronomia. Universidade Federal da Paraíba. 97pp.

Palazzo, S.R.L; T.L. Valle; J.C. Feltran; A. Colariccio. (2007). *Eliminação do Cassava common mosaic virus -Cscmv por Cultura de Meristema Associada a Termoterapia*. [http://www.biologico.sp.gov.br/biologico/v68\\_supl\\_raib/278.PDF](http://www.biologico.sp.gov.br/biologico/v68_supl_raib/278.PDF). Acessada em 25/05/2007

Pierik, R. L. M. (1990). *Cultivo in vitro de las plantas superiores*. Madrid: Mundi-Prensa,. 356 p.

Roca, W.M; J.A. Rodríguez; G. Mafla & J. Roa (1984). *Procedures for Recovering Cassava Clones Distributed in vitro*. CIAT. Cali, Colombia. 8pp

Smith, M.K.; Biggs, B.J.& Scott, K.J. (1986). *In vitro propagation of cassava (Manihot esculenta Crantz)*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, Dordrecht, v.6, p.221-228

Serrano, M. S. ; Piñol S. M. T. (1996). *Biotecnologia vegetal*. Ciencias de la vida p.285.

Souza, A. Da S.; T.G. Junghans; W. M. G. Fukuda. (2002). *Técnicas e aplicações da cultura de tecidos em mandioca*. In: CEREDA, M.P Agricultura: tuberosas amiláceas Latino Americanas. São Paulo: p.118-178. (Série Culturas de Tuberosas Amiláceas Latino Americanas, v. 2).

Unemoto, L. K; R. T. de Faria; B. Meneguice & A. M. de Assis. (2006). *Estabelecimento de um protocolo para a propagação in vitro de rainha-do-abismo, Sinningia leucotricha (Hoehne) Moore- (Gesneriaceae)*. Acta Sci. Agron., v. 28, n. 4, p. 503-506,

Viana, A. E. S.; T. Sedyama, S. C. Lopes; P.R. Cecon & A. A. da Silva (2001). *Efeito do comprimento e de incisões no córtex da maniva sobre o cultivo da mandioca (Manihot esculenta Crantz)* Acta Scientiarum. Maringá, v. 23, n. 5, p. 1263-1269

Zavattieri, A. (2002). *Biotecnologia Vegetal 1*. Universidade de Évora

# 11. Anexo

Tabela 1. Comparação do peso da matéria fresca das raízes nos dois métodos (IITA e CIAT) nas 3 variedades, em dois subcultivos.

	Munhaça						Mz-89186						Chinhembwe					
	Subcultivo 1		Subcultivo 2		Média		Subcultivo 1		Subcultivo 2		Média		Subcultivo 1		Subcultivo 2		Média	
	IITA	CIAT	IITA	CIAT	IITA	CIAT	IITA	CIAT	IITA	CIAT	IITA	CIAT	IITA	CIAT	IITA	CIAT	IITA	CIAT
Mean	0,0523	0,0145	0,2187	0,0828	0,1355	0,0486	0,0406	0,0229	0,6553	0,0599	0,3479	0,0414	0,0298	0,0067	0,3357	0,1752	3,8500	1,9500
Variance	0,0049	0,0008	0,1016	0,0146	0,0577	0,0085	0,0023	0,0010	0,5149	0,0061	0,3444	0,0038	0,0014	0,0000	0,0824	0,0287	3,1868	2,1553
n	10	10	10	10	20	20	10	10	10	10	20	20	10	10	10	10	20	20
Pooled Variance	0,0029		0,0581		0,0331		0,0017		0,2605		0,1741		0,0007		0,0555		2,6711	
Hypothesized Mean Dif	0		0		0		0		0		0		0		0		0	
df	18		18		38		18		18		38		18		18		38	
t-Test	1,5790		1,2614		1,5096		0,9681		2,6081		2,3230		1,9553		1,5224		3,6763	
P(T<=t) one-tail	0,0659		0,1116		0,0697		0,1729		0,0089		0,0128		0,0331		0,0726		0,0004	
t Critical one-tail	1,7341		1,7341		1,6860		1,7341		1,7341		1,6860		1,7341		1,7341		1,6860	
P(T<=t) two-tail	0,1317		0,2233		0,1394		0,3458		0,0178		0,0256		0,0663		0,1453		0,0007	
t Critical two-tail	2,1009		2,1009		2,0244		2,1009		2,1009		2,0244		2,1009		2,1009		2,0244	

Tabela 2. Comparação do peso da matéria fresca das folhas nos dois métodos (IITA e CIAT) nas 3 variedades em dois subcultivos.

	Munhaça						Mz-89186						Chinhembwe					
	Subcultivo 1		Subcultivo 2		Média		Subcultivo 1		Subcultivo 2		Média		Subcultivo 1		Subcultivo 2		Média	
	IITA	CIAT	IITA	CIAT	IITA	CIAT	IITA	CIAT	IITA	CIAT	IITA	CIAT	IITA	CIAT	IITA	CIAT	IITA	CIAT
Mean	0,0146	0,0213	0,0415	0,0229	0,0280	0,0221	0,0141	0,0097	0,0431	0,0071	0,0286	0,0084	0,0069	0,0067	0,0786	0,0179	0,0428	0,0123
Variance	0,0004	0,0023	0,0005	0,0005	0,0006	0,0013	0,0003	0,0001	0,0011	0,0001	0,0009	0,0001	0,0000	0,0000	0,0010	0,0005	0,0018	0,0003
n	10	10	10	10	20	20	10	10	10	10	20	20	10	10	10	10	20	20
Pooled Variance	0,0014		0,0005		0,0010		0,0002		0,0006		0,0005		0,0000		0,0008		0,0011	
Hypothesized Mean Dif	0		0		0		0		0		0		0		0		0	
df	18		18		38		18		18		38		18		18		38	
t-Test	-0,4045		1,8824		0,6071		0,7111		3,2847		2,8952		0,0781		4,9394		2,9517	
P(T<=t) one-tail	0,3453		0,0380		0,2737		0,2431		0,0021		0,0031		0,4693		0,0001		0,0027	
t Critical one-tail	1,7341		1,7341		1,6860		1,7341		1,7341		1,6860		1,7341		1,7341		1,6860	
P(T<=t) two-tail	0,6906		0,0761		0,5474		0,4861		0,0041		0,0062		0,9386		0,0001		0,0054	
t Critical two-tail	2,1009		2,1009		2,0244		2,1009		2,1009		2,0244		2,1009		2,1009		2,0244	

Tabela 3. Comparação de número médio de folhas nos dois métodos (IITA e CIAT) nas 3 variedades, em dois subcultivos.

	Munhaça						Mz-89186						Chinhembwe					
	Subcultivo 1		Subcultivo 2		Média		Subcultivo 1		Subcultivo 2		Média		Subcultivo 1		Subcultivo 2		Média	
	IITA	CIAT	IITA	CIAT	IITA	CIAT	IITA	CIAT	IITA	CIAT	IITA	CIAT	IITA	CIAT	IITA	CIAT	IITA	CIAT
Mean	2,3000	2,3000	3,3000	2,7000	2,8000	2,5000	3,2000	2,6000	3,0000	2,2000	3,1000	2,4000	3,0000	2,1000	4,7000	1,8000	3,8500	1,9500
Variance	2,4556	2,6778	0,9000	2,6778	1,8526	2,5789	2,4000	2,9333	2,4444	3,5111	2,3053	3,0947	2,8889	3,4333	2,2333	1,0667	3,1868	2,1553
n	10	10	10	10	20	20	10	10	10	10	20	20	10	10	10	10	20	20
Pooled Variance	2,5667		1,7889		2,2158		2,6667		2,9778		2,7000		3,1611		1,6500		2,6711	
Hypothesized Mean Dif	0		0		0		0		0		0		0		0		0	
df	18		18		38		18		18		38		18		18		38	
t-Test	0,0000		1,0031		0,6373		0,8216		1,0366		1,3472		1,1319		5,0483		3,6763	
P(T<=t) one-tail	0,5000		0,1646		0,2639		0,2110		0,1568		0,0930		0,1363		0,0000		0,0004	
t Critical one-tail	1,7341		1,7341		1,6860		1,7341		1,7341		1,6860		1,7341		1,7341		1,6860	
P(T<=t) two-tail	1,0000		0,3291		0,5277		0,4221		0,3136		0,1859		0,2725		0,0001		0,0007	
t Critical two-tail	2,1009		2,1009		2,0244		2,1009		2,1009		2,0244		2,1009		2,1009		2,0244	

Tabela 4. Comparação de número médio de raízes nos dois métodos (IITA e CIAT) nas 3 variedade, em dois subcultivos.

	Munhaça						Mz-89186						Chinhembwe					
	Subcultivo 1		Subcultivo 2		Média		Subcultivo 1		Subcultivo 2		Média		Subcultivo 1		Subcultivo 2		Média	
	IITA	CIAT	IITA	CIAT	IITA	CIAT	IITA	CIAT	IITA	CIAT	IITA	CIAT	IITA	CIAT	IITA	CIAT	IITA	CIAT
Mean	2,0000	0,8000	1,9000	1,6000	1,9500	1,2000	2,0000	1,6000	3,1000	2,8000	2,5500	2,2000	2,2000	0,3000	3,1000	1,4000	2,6500	0,8500
Variance	3,1111	1,2889	0,9889	2,7111	1,9447	2,0632	2,8889	3,3778	6,1000	7,5111	4,5763	5,5368	2,1778	0,2333	1,6556	1,1556	2,0289	0,9763
n	10	10	10	10	20	20	10	10	10	10	20	20	10	10	10	10	20	20
Pooled Variance	2,2		1,85		2,0039		3,13333		6,805556		5,0566		1,2055556		1,4055556		1,5026	
Hypothesized Mean Dif	0		0		0		0		0		0		0		0		0	
df	18		18		38		18		18		38		18		18		38	
t-Test	1,8091		0,4932		1,6754		0,5053		0,2571		0,4922		3,8694		3,2063		4,6435	
P(T<=t) one-tail	0,0436		0,3139		0,0510		0,3097		0,4000		0,3127		0,0006		0,0024		2E-05	
t Critical one-tail	1,7341		1,7341		1,6860		1,7341		1,7341		1,6860		1,7341		1,7341		1,686	
P(T<=t) two-tail	0,0872		0,6278		0,1021		0,6195		0,8000		0,6254		0,0011		0,0049		4E-05	
t Critical two-tail	2,1009		2,1009		2,0244		2,1009		2,1009		2,0244		2,1009		2,1009		2,0244	

Tabela 5. Comparação de comprimento de raízes nos dois métodos (IITA e CIAT) nas 3 variedades, em dois subcultivos.

	Munhaça						Mz-89186						Chinhembwe					
	Subcultivo 1		Subcultivo 2		Média		Subcultivo 1		Subcultivo 2		Média		Subcultivo 1		Subcultivo 2		Média	
	IITA	CIAT	IITA	CIAT	IITA	CIAT	IITA	CIAT	IITA	CIAT	IITA	CIAT	IITA	CIAT	IITA	CIAT	IITA	CIAT
Mean	2,2750	1,5500	2,9500	2,8600	2,6125	2,2050	3,7000	2,9000	3,1200	2,5600	3,4100	2,7300	2,2900	0,3300	3,2000	2,0900	2,6500	0,8500
Variance	3,3396	4,8028	4,6783	6,9849	3,9179	6,0352	3,6222	6,3222	9,1218	14,1493	6,1252	9,7275	2,5610	0,5112	0,9244	3,1454	2,0289	0,9763
n	10	10	10	10	20	20	10	10	10	10	20	20	10	10	10	10	20	20
Pooled Variance	4,0712		5,8316		4,9765		4,9722		11,6356		7,9263		1,5361		2,0349		1,5026	
Hypothesized Mean Dif	0		0		0		0		0		0		0		0		0	
df	18		18		38		18		18		38		18		18		38	
t-Test	0,803		0,083		0,578		0,802		0,367		0,764		3,536		1,740		4,644	
P(T<=t) one-tail	0,216		0,467		0,283		0,216		0,359		0,225		0,001		0,049		0,000	
t Critical one-tail	1,734		1,734		1,686		1,734		1,734		1,686		1,734		1,734		1,686	
P(T<=t) two-tail	0,432		0,935		0,567		0,433		0,718		0,450		0,002		0,099		0,000	
t Critical two-tail	2,101		2,101		2,024		2,101		2,101		2,024		2,101		2,101		2,024	

Tabela 6. Comparação de altura média das plântulas nos dois métodos (IITA e CIAT) nas 3 variedades, em dois subcultivos.

	Munhaça						Mz-89186						Chinhembwe					
	Subcultivo 1		Subcultivo 2		Média		Subcultivo 1		Subcultivo 2		Média		Subcultivo 1		Subcultivo 2		Média	
	IITA	CIAT	IITA	CIAT	IITA	CIAT	IITA	CIAT	IITA	CIAT	IITA	CIAT	IITA	CIAT	IITA	CIAT	IITA	CIAT
Mean	3,9550	4,4300	3,9400	2,5000	3,9475	3,4650	4,4700	3,4300	4,1800	2,6100	4,3250	3,0200	3,3700	1,5000	4,7100	1,9300	4,0400	2,3150
Variance	8,0814	4,9490	1,7027	1,1956	4,6346	3,8908	2,9623	3,1334	4,5818	2,6788	3,5957	2,9301	3,8623	1,6111	1,2077	0,5134	2,8741	2,1413
n	10	10	10	10	20	20	10	10	10	10	20	20	10	10	10	10	20	20
Pooled Variance	6,5152		1,4491		4,2627		3,0479		3,6303		3,2629		2,7367		0,8606		2,5077	
Hypothesized Mean Dif	0		0		0		0		0		0		0		0		0	
df	18		18		38		18		18		38		18		18		38	
t-Test	-0,4161		2,6748		0,7390		1,3320		1,8425		2,2846		2,5276		6,7010		3,4447	
P(T<=t) one-tail	0,3411		0,0077		0,2322		0,0997		0,0410		0,0140		0,0105		0,0000		0,0007	
t Critical one-tail	1,7341		1,7341		1,6860		1,7341		1,7341		1,6860		1,7341		1,7341		1,6860	
P(T<=t) two-tail	0,6822		0,0155		0,4644		0,1995		0,0819		0,0280		0,0211		0,0000		0,0014	
t Critical two-tail	2,1009		2,1009		2,0244		2,1009		2,1009		2,0244		2,1009		2,1009		2,0244	

Tabela 7. Comparação de número de mini-estacas nos dois métodos (IITA e CIAT) nas 3 variedades, em dois subcultivos.

	Munhaça						Mz-89186						Chinhembwe					
	Subcultivo 1		Subcultivo 2		Média		Subcultivo 1		Subcultivo 2		Média		Subcultivo 1		Subcultivo 2		Média	
	IITA	CIAT	IITA	CIAT	IITA	CIAT	IITA	CIAT	IITA	CIAT	IITA	CIAT	IITA	CIAT	IITA	CIAT	IITA	CIAT
Mean	2,0000	2,2000	2,1000	1,6000	2,0500	1,9000	2,4000	2,3000	3,2000	2,0000	4,3250	3,0200	2,2000	1,5000	3,2000	1,6000	2,7000	1,5500
Variance	1,1111	1,0667	0,7667	1,1556	0,8921	1,1474	1,1556	1,1222	3,7333	1,7778	3,5957	2,9301	1,0667	1,6111	1,5111	1,1556	1,4842	1,3132
n	10	10	10	10	20	20	10	10	10	10	20	20	10	10	10	10	20	20
Pooled Variance	1,0889		0,9611		1,0197		1,1389		2,7556		3,2629		1,3389		1,3333		1,3987	
Hypothesized Mean Dif	0		0		0		0		0		0		0		0		0	
df	18		18		38		18		18		38		18		18		38	
t-Test	-0,4286		1,1404		0,4697		0,2095		1,6164		2,2846		1,3527		3,0984		3,0749	
P(T<=t) one-tail	0,3367		0,1345		0,3206		0,4182		0,0617		0,0140		0,0964		0,0031		0,0019	
t Critical one-tail	1,7341		1,7341		1,6860		1,7341		1,7341		1,6860		1,7341		1,7341		1,6860	
P(T<=t) two-tail	0,6733		0,2691		0,6412		0,8364		0,1234		0,0280		0,1929		0,0062		0,0039	
t Critical two-tail	2,1009		2,1009		2,0244		2,1009		2,1009		2,0244		2,1009		2,1009		2,0244	

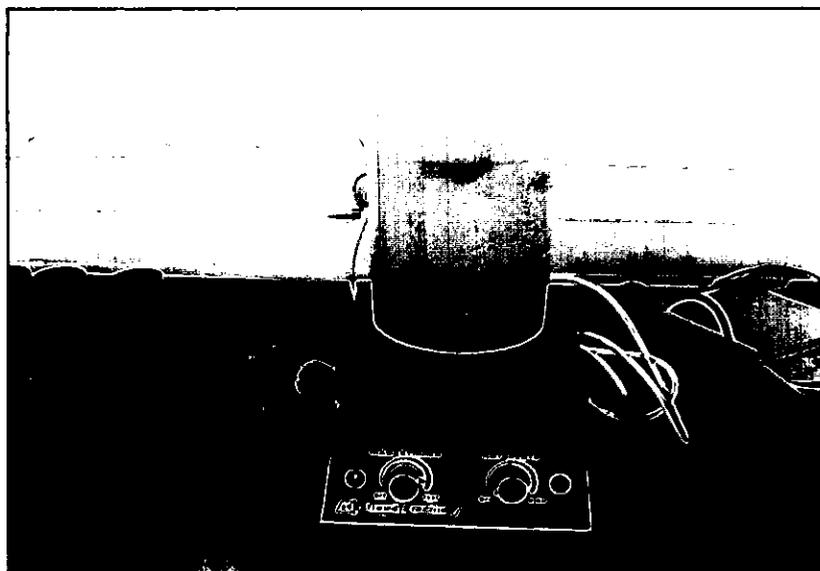


Figura 1. Preparação do meio de cultura desenvolvido pelo CIAT num agitador magnético.

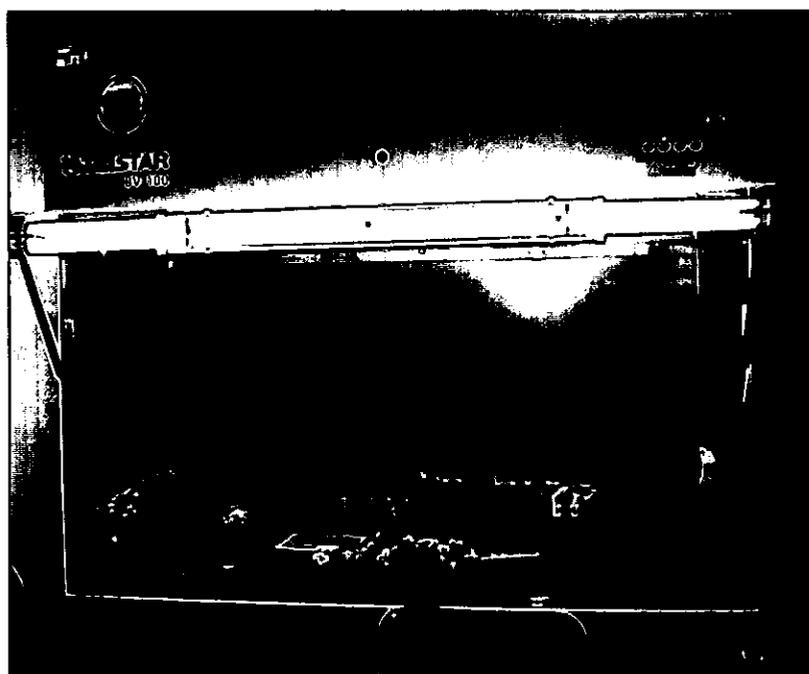


Figura 2. Inoculação das mini-estacas na câmara de fluxo laminar.

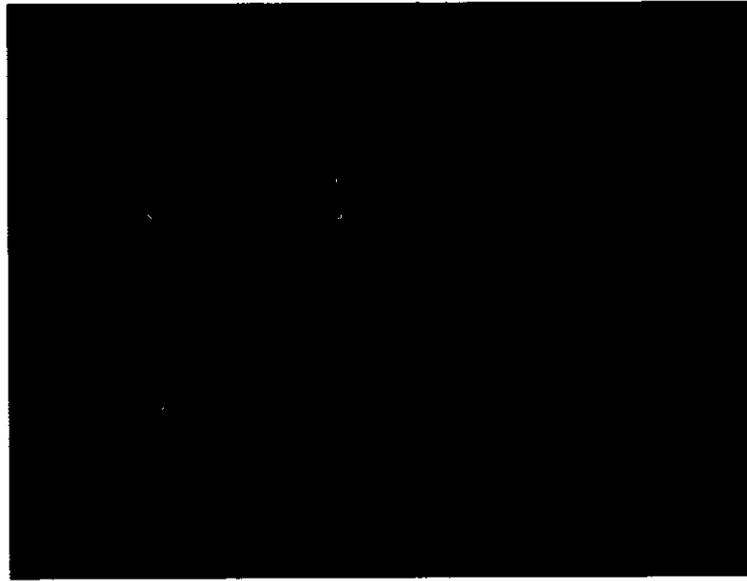


Figura3. Mini-estacas de aproximadamente 1 cm de comprimento, contendo um nó.

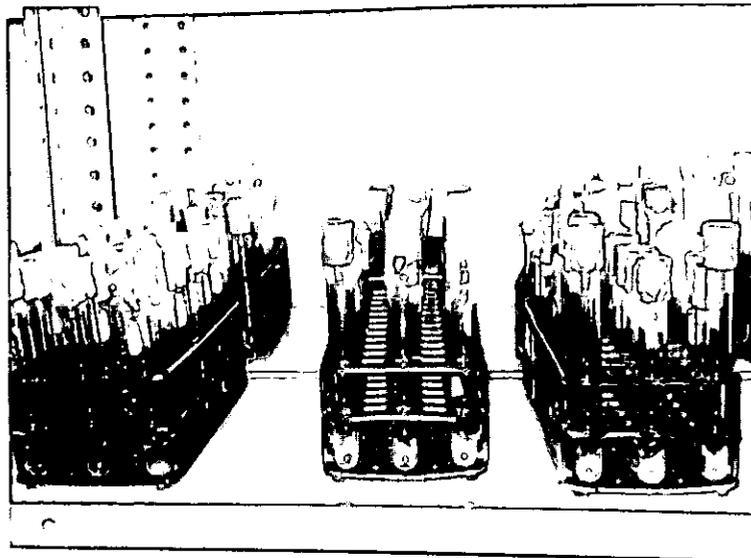


Figura 4. Mini-estacas inoculadas na sala de crescimento.

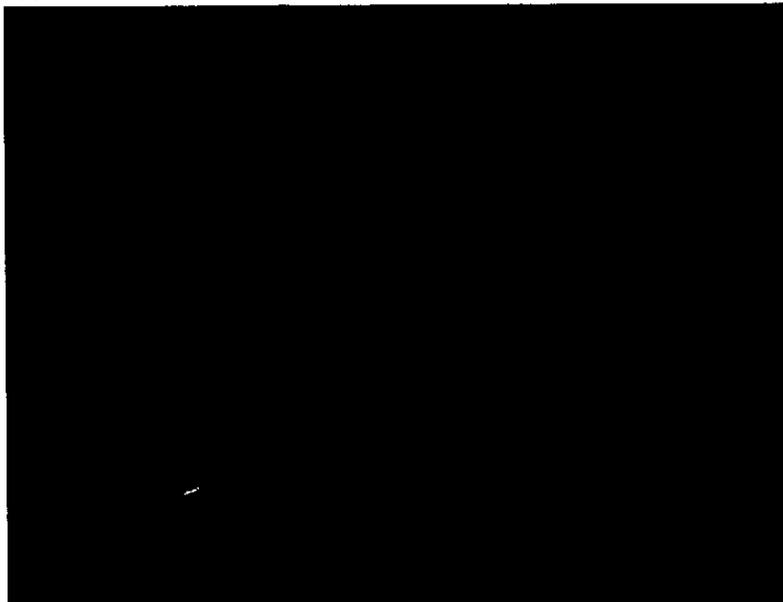


Figura 5. Tubos de ensaio contaminados com fungos.

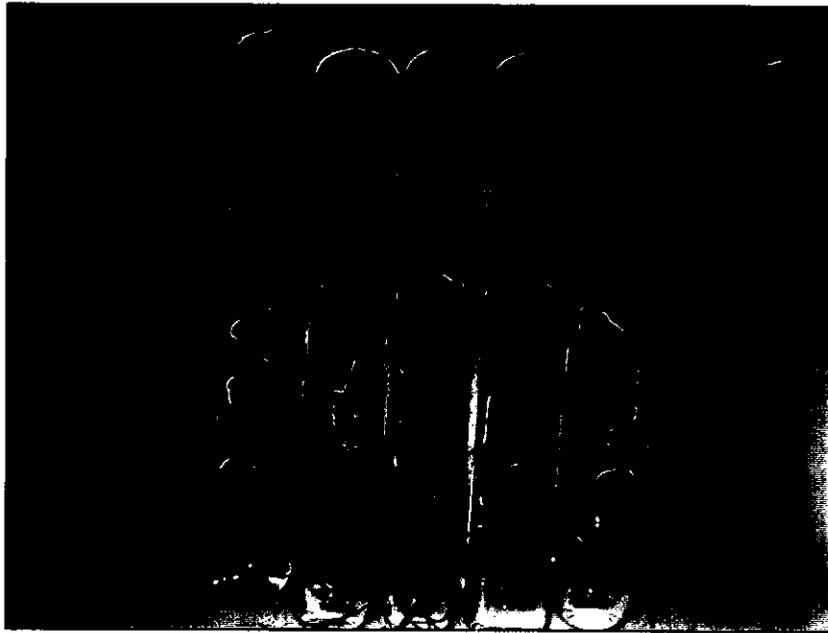


Figura 6. Plântula apresentando raízes e callus no método desenvolvido pelo CIAT.

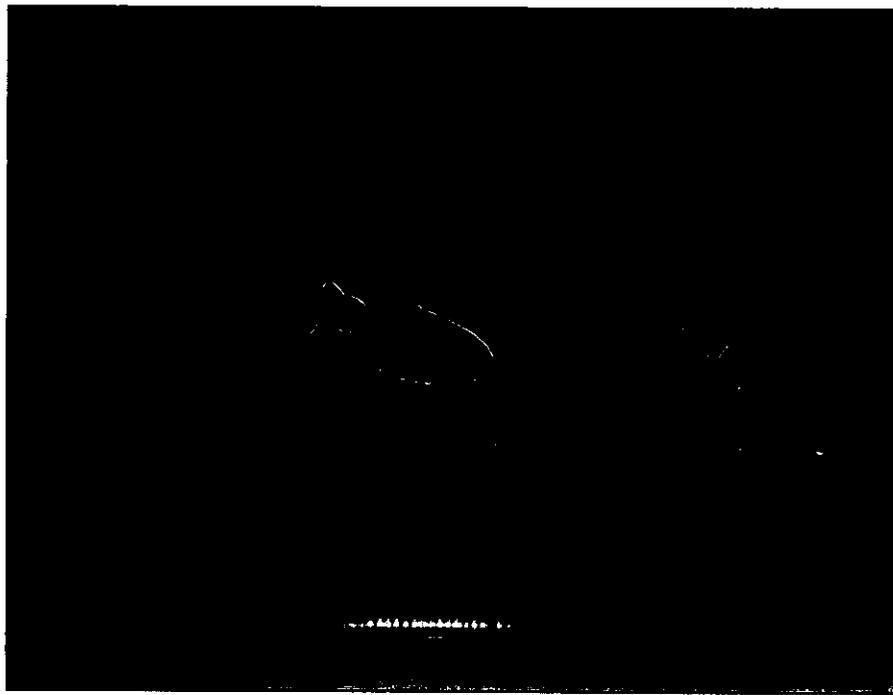


Figura 7. Medição do comprimento da plântula usando uma régua.