

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE DOUTORADO**

**MELHORIA DO PROCESSO REGENERATIVO DE ÁPICES
CAULINARES DE MANDIOCA *IN VITRO* E SUA RELEVÂNCIA NA
PROPAGAÇÃO E CRIOCONSERVAÇÃO DE GERMOPLASMA**

HONORATO PEREIRA DA SILVA NETO

**CRUZ DAS ALMAS - BAHIA
JULHO - 2025**

**MELHORIA DO PROCESSO REGENERATIVO DE ÁPICES CAULINARES DE
MANDIOCA *IN VITRO* E SUA RELEVÂNCIA NA PROPAGAÇÃO E
CRIOCONSERVAÇÃO DE GERMOPLASMA**

Honorato Pereira da Silva Neto

Agrônomo
Universidade Federal da Bahia (UFBA), 2005

Tese submetida ao Colegiado do Curso do Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia como requisito para obtenção do título de doutor em Ciências Agrárias.

Orientadora: Prof. Dra. Maria Angelica P. C. Costa
Coorientadora: Dra. Andresa Priscila de S. Ramos
Coorientador: Prof. Dr. Roosevelt Humberto Escobar Pérez

**CRUZ DAS ALMAS - BAHIA
JULHO - 2025**

FICHA CATALOGRÁFICA

S586m

Silva Neto, Honorato Pereira da.

Melhoria do processo regenerativo de ápices caulinares de mandioca *in vitro* e sua relevância na propagação e criopreservação de germoplasma / Honorato Pereira da Silva Neto. _ Cruz das Almas, BA, 2025.

153f.: il.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias Ambientais e Biológicas, Doutorado em Ciências Agrárias.

Orientadora: Prof. Dra. Maria Angelica P. C. Costa.

Coorientadora: Dra. Andresa Priscila de S. Ramos.

Coorientador: Prof. Dr. Roosevelt Humberto Escobar Pérez.


1.Mandioca – Manejo. 2.Mandioca – Propagação *in vitro*. 3.Variabilidade genética – Análise. I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias Ambientais e Biológicas. II.Título.

CDD: 633.68


**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE DOUTORADO**

**MELHORIA DO PROCESSO REGENERATIVO DE ÁPICES
CAULINARES DE MANDIOCA *IN VITRO* E SUA RELEVÂNCIA NA
PROPAGAÇÃO E CRIOPRESERVAÇÃO DE GERMOPLASMA**


Comissão Examinadora de Defesa de Tese de
Honorato Pereira da Silva Neto
Aprovado em 30 de julho de 2025

Documento assinado digitalmente
 **MARIA ANGELICA PEREIRA DE CARVALHO COSTA**
Data: 23/09/2025 07:22:29-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>


Profa. Dr^a Maria Angelica P. C. Costa
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia / UFRB Examinador Interno
(Orientador)

Documento assinado digitalmente
 **FERNANDA DOS SANTOS NASCIMENTO**
Data: 25/09/2025 09:44:07-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>


Dr^a Fernanda dos Santos Nascimento
Embrapa Mandioca e Fruticultura / Examinador Externo

Documento assinado digitalmente
 **LUCYMEIRE SOUZA MORAIS LINO**
Data: 25/09/2025 21:57:31-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr^a Lucymeire Souza Morais Lino
Embrapa Mandioca e Fruticultura / Examinador Externo

Documento assinado digitalmente
 **MARIA INES DE SOUZA MENDES**
Data: 24/09/2025 20:42:05-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr^a Maria Inês de Souza Mendes
Embrapa Mandioca e Fruticultura / Examinador Externo

Documento assinado digitalmente
 **MARIA JOSIRENE SOUZA MOREIRA BASTOS**
Data: 23/09/2025 21:48:37-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dr^a Maria Josirene Souza Moreira Bastos
Centro Universitário AGES / Examinador Externo

DEDICATÓRIA

Primeiramente a Deus, por ter me dado saúde e sabedoria para chegar à conclusão do curso. E a minha mãe e meu pai *in memoriam*, a minha família e amigos por todo o apoio, incentivo, dedicação, amor e carinho.

AGRADECIMENTOS

Aos meus amados pais, Antônio Pereira da Silva (in memoriam) e Vitalmira Machado de Almeida, pelo exemplo de dedicação e por todo amor que moldou minha personalidade e me guiou na formação do meu caráter. A vocês que me deram a vida e me ensinaram a vivê-la com dignidade e coragem, nenhum simples "obrigado" seria suficiente. Por terem iluminado meus caminhos quando tudo parecia escuro, com afeto e entrega silenciosa, permitindo-me trilhar cada etapa sem medo, carregando esperança no coração. E a vocês, que tantas vezes renunciaram aos próprios sonhos para que eu pudesse alcançar os meus, que esperaram com paciência cada ausência e instante de distância, não bastaria um "muitíssimo obrigado".

A vocês, que me ensinaram o verdadeiro sentido da palavra amor, amor que acolhe, que cuida, que sustenta, eu busco palavras que jamais serão à altura do que sinto. Agora, enquanto tento traduzir em palavras esta emoção única, percebo que o vocabulário me falta. Só posso dizer que amo vocês profundamente e para sempre.

A Deus, por ter me concedido a dádiva da vida, a força nos momentos mais difíceis e a coragem para seguir quando as incertezas pareciam maiores que os sonhos. Por cada obstáculo superado e por cada conquista alcançada, minha eterna gratidão.

À minha família, especialmente à minha esposa Andrea Villar e aos meus filhos Sofia Jimena Villar e Ítalo Villar, que são o meu alicerce, a minha inspiração diária, o motivo maior de todas as minhas lutas e conquistas. Aos meus irmãos Eliana, Antônio, Elizete, Ednalva, Carlos e Edilton, que, de alguma forma, fizeram parte da construção do meu caminho e do meu coração. A Andrea, que esteve ao meu lado nos momentos mais difíceis, que me incentivou e segurou minha mão quando eu precisei acreditar.

À minha orientadora, Dra. Maria Angélica, por compartilhar comigo não apenas seu vasto conhecimento, mas também sua generosidade, dedicação, paciência e amizade. Por me desafiar a ir além e me ajudar a crescer como profissional e como ser humano.

Ao amigo, colega e mestre, Dr. Antônio da Silva Souza, pelos ensinamentos valiosos, conselhos e apoio constante, por ser uma referência de ética, sabedoria e humanidade.

À Dra. Fernanda Vidigal, pela confiança, oportunidade e constante incentivo para que este trabalho se concretizasse.

Aos coorientadores Dr. Roosevelt Humberto Escobar Pérez e Dra. Andresa Priscila de Souza Ramos, pelas orientações, sugestões e contribuições fundamentais.

Aos colegas Tania Maria, Antoniel, Carlos Melo e Karen Fialho, por cada ensinamento, cada palavra de incentivo e cada momento compartilhado na Embrapa. A todos os colegas da instituição, que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos estagiários do Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Mandioca e Fruticultura, especialmente Simone, Lucymeire, Tamyres, Jorge, Mileide, Juraci, Danilo, Gabriel, Larissa, Maria Luiza, Bruna, Adriele, Manoela, Michele, Milena e Welly, que caminharam ao meu lado nesta jornada, oferecendo amizade, companheirismo e trabalho incansável. Um agradecimento especial a Jorge, Bruna, Larissa e Simone, que tanto contribuíram para o desenvolvimento dos experimentos.

À Embrapa Mandioca e Fruticultura, por acreditar no meu trabalho desde os primeiros passos na graduação, passando pelo mestrado, e agora no doutorado. Pela estrutura, pelo apoio e por abrir as portas para que eu pudesse trilhar este caminho.

À UFRB e a todos os professores que fizeram parte da minha formação acadêmica e humana, meu reconhecimento e gratidão.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, estiveram presentes, contribuíram, torceram ou apoiaram este projeto, eu deixo registrado o meu muito obrigado de coração.

Sem vocês, esta conquista jamais teria sido possível.

EPÍGRAFE

“A menos que modifiquemos à nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo”.

(Albert Einstein)

Melhoria do processo regenerativo de ápices caulinares de mandioca *in vitro* e sua relevância na propagação e crioconservação de germoplasma

RESUMO GERAL

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é uma cultura de grande importância socioeconômica para países tropicais, destacando-se pela rusticidade, tolerância a estresses abióticos e alto valor energético. A multiplicação clonal por métodos convencionais, no entanto, está sujeita à disseminação de patógenos e compromete a conservação de longo prazo do germoplasma. A recuperação *in vitro* de ápices caulinares representa uma alternativa eficiente para a propagação e recuperação de materiais isentos de doenças, além de ser fundamental para a viabilidade de estratégias de crioconservação. Entretanto, a eficiência dos protocolos regenerativos permanece um desafio, podendo comprometer a viabilidade e a integridade morfológica dos tecidos. Para superar esses desafios, este estudo integrou três objetivos complementares: a otimização das condições morfogênicas para brotações a partir de ápices caulinares sob diferentes regimes de temperatura e suplementação com água de coco (AC); a validação do protocolo de introdução *in vitro* em larga escala utilizando 520 acessos do Banco Ativo de Germoplasma de mandioca; a avaliação de uma nova estratégia de criopreservação baseada em crio-canaletas e vitrificação (CCV), bem como da recuperação dos ápices criopreservados sob suplementação com AC e temperatura otimizada, visando comparações futuras com métodos convencionais. Portanto, os objetivos do trabalho foram otimizar o processo de recuperação *in vitro* de ápices caulinares de mandioca, visando obter brotações vigorosas durante o estabelecimento *in vitro* e aplicar a metodologia à recuperação morfofisiológica de meristemas criopreservados, contribuindo para programas de conservação e melhoramento genético da espécie. O uso combinado de meio modificado com AC e temperatura adequada resultou na recuperação e formação de brotos a partir de ápices caulinares com elevadas taxas de estabelecimento (>92%), apresentando melhor desempenho quantitativo com dois ápices por acesso e maior eficiência qualitativa com três ou quatro, mantendo boa qualidade fisiológica. Além disso, os meristemas submetidos à criopreservação demonstraram capacidade de recuperação morfofisiológica satisfatória quando cultivados sob as condições otimizadas. Esses resultados reforçam a aplicabilidade da metodologia proposta como ferramenta estratégica para micropropagação segura e conservação de germoplasma de mandioca em coleções de base.

Palavras-chave: *Cocos nucifera*, criobanco, introdução *in vitro*, *Manihot esculenta* Crantz, pós-congelamento, recuperação de meristemas.

Improvement of the in vitro regenerative process of cassava shoot apices and its relevance for germplasm propagation and cryopreservation

GENERAL ABSTRACT

Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) is a crop of major socioeconomic importance for tropical countries, distinguished by its hardiness, tolerance to abiotic stresses, and high energy value. However, clonal multiplication by conventional methods is prone to pathogen dissemination and compromises the long-term conservation of germplasm. In vitro recovery of shoot apices represents an efficient alternative for the propagation and recovery of disease-free materials and is also fundamental for the feasibility of cryopreservation strategies. Nevertheless, the efficiency of regenerative protocols remains a challenge, potentially compromising tissue viability and morphological integrity. To address these constraints, this study integrated three complementary objectives: the optimization of morphogenic conditions for shoot development from apical meristems under different temperature regimes and coconut water supplementation; the large-scale validation of the in vitro introduction protocol using 520 accessions from the Active cassava Germplasm Bank; and the evaluation of a new cryopreservation approach based on cryo-gutters vitrification (CGV), as well as the recovery of cryopreserved apices under coconut water supplementation and optimized temperature, aiming at future comparisons with conventional methods. Therefore, the objectives of this study were to optimize the in vitro recovery process of cassava shoot apices to obtain vigorous shoots during establishment, and to apply the methodology to the morphophysiological recovery of cryopreserved meristems, thus contributing directly to conservation and genetic breeding programs of the species. The combined use of a modified medium, coconut water, and optimized temperature resulted in shoot recovery from apical meristems with high establishment rates (>92%), showing better quantitative performance with two apices per accession and greater qualitative efficiency with three or four, while maintaining high physiological quality. In addition, meristems subjected to cryopreservation exhibited satisfactory morphophysiological recovery when cultured under the optimized conditions. These results reinforce the applicability of the proposed methodology as a strategic tool for safe micropropagation and germplasm conservation of cassava in base collections.

Keywords: *Cocos nucifera*, cryobank, in vitro introduction, *Manihot esculenta* Crantz, meristem recovery, post-freezing.

LISTA DE ABREVIATURAS

AC = Água de coco
AG₃ = ácido giberélico (GA₃)
ANA = ácido 1-naftalenoacético
AP = Altura de planta
AP1 = Altura da brotação no estabelecimento *in vitro*
AP2 = Altura de planta na etapa de multiplicação
BAG = Banco Ativo de Germoplasma
BAP = 6-benzilaminopurina
BCa = bias-corrected and accelerated
BOD = Câmara de crescimento B.O.D
BRS = Benefício, Resistência e Safras (Variedades lançada pela Embrapa)
CCV = Cryo-Canaleta e Vitrificação
CGV = Cryo-gutter vitrification
DA = Desenvolvimento
DMP = Diferença entre as médias dos postos
DMSO = Dimetilsulfóxido ou sulfóxido de dimetilo
DV = Droplet-vitrification
EP = Erro padrão
FC = Formação de calo
fe = Frequência esperada
fo = Frequência observada
FR = Formação de raiz
GL = Grau de liberdade
GLMM = Modelos lineares generalizados mistos
IC = Intervalo de confiança
iP = (N⁶-isopenteniladenina)
K0.5 = Meio de recuperação de plantas criopreservada
K0.5+ = Meio de recuperação de plantas criopreservada suplementado com 10% de água de coco
LS = Solução de carga (solução de osmoproteção)
MFPA = Massa fresca da parte aérea
MFRC = Massa fresca de raiz e calo
MR = Meio de repicagem
MS = Meio de cultura de Murashige e Skoog
MSPA = Massa seca da parte aérea
MSRC = Massa seca de raiz e calo
NAP = Número de ápice
NFP = Número de primórdios foliares
NL = Nitrogênio líquido
NmE = Número de miniestacas
NmE2 = Número de miniestacas na multiplicação
ns = não significativo
OR = Odds ratio (Razão de chance de um evento ocorrer em um grupo em relação a outro)
PC1 = Componente principal 1
PC2 = Componente principal 2
PCA = Análise de componentes principais
pH = Potencial de hidrogênio

PIF4 = Phytochrome-Interacting Factor 4 (Fator de Interação com Fitocromo 4)

PVS2 = Plant Vitrification Solution 2 (solução vitrificante de planta)

R3 = Meio de pós descongelamento e recuperação

rp = Resíduo padronizado ajustado

TC = Taxa de contaminação

Temp. = Temperatura

VL1 = validação do protocolo no estabelecimento

VL2 = validação do protocolo no início da multiplicação

VMR = validação do meio de repicagem.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

- Tabela 1.** Teste de qui-quadrado de ápices caulinares de 10 acessos de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) estabelecidos *in vitro* em meio de cultura 4E, suplementado com diferentes concentrações de AC, após 45 dias de incubação a 27 °C 61
- Tabela 2.** Teste de comparações múltiplas de Dunn das diferenças entre as médias dos postos das variáveis de desenvolvimento de ápices caulinares dos 10 acessos de mandioca em diferentes concentrações de AC (0, 5, 10, 15 e 20%), com p -value ajustadas pelo método de Bonferroni, aos 45 dias de cultivo 62
- Tabela 3.** Teste de qui-quadrado dos ápices caulinares de 10 acessos de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) estabelecidos *in vitro* em meio de cultura 4E, suplementado com 10% de AC, após 20 dias de cultivo em diferentes temperaturas 64
- Tabela 4.** Teste de comparações múltiplas de Dunn das diferenças entre as médias dos postos das variáveis de desenvolvimento de ápices caulinares dos 10 acessos de mandioca nos diferentes regimes de temperatura (27°C, 29°C, 31°C, 33°C e 35°C), com p -value ajustadas pelo método de Bonferroni, aos 20 dias de cultivo 66

CAPÍTULO 2

- Tabela 1.** Teste de qui-quadrado para formação de calos e de raiz, validação da metodologia e do meio de cultura na 1ª repicagem, em resposta ao número de ápices na validação de protocolo de introdução de acessos de mandioca em meio 4E suplementado com AC, após 20 dias de incubação a 33 ± 1 °C 89
- Tabela 2.** Sobrevivência e mortalidade de explantes de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) estabelecidos *in vitro* em função do número de ápices por acesso (2, 3 e 4), com resultados expressos por ápice ($n = 480$ em cada tratamento) e por acesso (n ajustado) nas diferentes fases de cultivo (estabelecimento no meio 4E e primeira repicagem nos meios MS0,01 ou 4E) 93
- Tabela 3.** Estimativas dos coeficientes logísticos (β), erros padrão, estatística z , p -valores, odds ratios e intervalos de confiança (IC95%) para os fatores avaliados (formação de calo, número de ápices e meio de repicagem) sobre parâmetros morfofisiológicos (altura da brotação, validação inicial e número de miniestacas) na introdução *in vitro* de ápices de mandioca. β_0 = intercepto (log odds na ausência de efeitos); β_i = coeficientes logísticos das variáveis independentes 101

Tabela 4. Impacto da formação de calos na altura de brotações: estimativa por bootstrap da diferença mediana (IC 95% BCa) e validação com teste de Wilcoxon	106
--	-----

CAPÍTULO 3

Tabela 1. Efeito combinado dos tratamentos controle (Absoluto, LS e PVS2) e dos meios de recuperação (K0.5 e K0.5+) sobre características morfofisiológicas da mandioca aos 30 dias de cultivo, com comparações estatísticas não paramétricas	124
--	-----

APÊNDICE A

Quadro A.1. Modelos logísticos ajustados para os eventos dicotômicos avaliados durante a introdução <i>in vitro</i> de ápices caulinares de mandioca, com respectivos coeficientes, equações estimadas e interpretação dos odds ratios (IC95%). Os modelos foram obtidos a partir das estimativas apresentadas na Tabela 3 (pag. 101), segundo a forma geral $\text{logit}(p)=\beta_0+\sum\beta_iX_i$, em que β_0 é o intercepto, β_i são os coeficientes logísticos das variáveis independentes X_i e p é a probabilidade do evento de interesse	152
---	-----

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

- Figura 1.** (A) Ápice caulinar de mandioca obtido a partir de brotações em manivas; (B) redução até os primórdios foliares; (C) excisão do ápice caulinar reduzido para 0,2 mm - 0,3 mm para inoculação no meio de cultura; (D) planta desenvolvida a partir do ápice caulinar após 20 dias de cultivo em meio 4E 58
- Figura 2.** Análise de Componentes Principais (PCA) representando a distribuição das variáveis associadas ao desempenho *in vitro*. Os pontos vermelhos indicam as diferentes concentrações de AC avaliadas, enquanto as setas azuis representam os vetores das variáveis analisadas: número de primórdios foliares (NFP), massa fresca de raiz e calo (MFRC), número de miniestacas (NmE), altura de planta (AP) e massa fresca da parte aérea (MFPA) 63
- Figura 3.** Análise de Componentes Principais (PCA) representando a distribuição das variáveis associadas ao desempenho *in vitro*. Os pontos vermelhos indicam as diferentes temperaturas avaliados, enquanto as setas azuis representam os vetores das variáveis analisadas: altura de planta (AP), número de primórdios foliares (NFP), número de miniestacas (NmE), massa fresca da parte aérea (MFPA), massa fresca de raiz e calo (MFRC), massa seca da parte aérea (MSPA) e massa seca de raiz e calo (MSRC) ... 67
- Figura 4.** Boxplot comparativos das distribuições dos valores de altura de brotações (cm) de 10 acessos de *M. esculenta* Crantz introduzidos *in vitro* em meio de cultura 4E+, suplementado com diferentes concentrações de AC no meio de cultura e diferentes temperaturas de incubação, aos 45 dias de cultivo 68
- Figura 5.** Boxplot comparativos das distribuições dos valores de altura de brotações (cm) de 10 acessos de *M. esculenta* Crantz introduzidos *in vitro* em meio de cultura 4E+, suplementado com 10% de AC no meio de cultura e submetidos a diferentes temperaturas de incubação, aos 20 dias de cultivo 70
- Figura 6.** Análise de Componentes Principais (PCA) representando a distribuição de genótipos de mandioca com base em variáveis associadas ao desempenho *in vitro*. Os pontos vermelhos indicam os diferentes genótipos avaliados, enquanto as setas azuis representam os vetores das variáveis analisadas: altura de planta (AP), número de primórdios foliares (NFP), número de miniestacas (NmE), massa fresca da parte aérea (MFPA) e massa fresca de raiz e calo (MFRC) 72
- Figura 7.** Biplot das contribuições das variáveis respostas e posicionamentos do aporte dos 10 genótipos de mandioca (*M. esculenta* Crantz), conforme a variação dos dados das CP1 e CP2 no estabelecimento *in vitro* dos ápices caulinares de mandioca, cultivado em ambientes com diferentes temperaturas de incubação 74

CAPÍTULO 2

- Figura 1.** Altura das brotações (cm) na fase de introdução *in vitro*, comparando explantes com e sem formação de calo, estratificados por número de ápices (2, 3 ou 4), com disposição dos valores observados, medianas e intervalo interquartil (25-75%) 95
- Figura 2.** Distribuição da altura das brotações (cm) na fase de estabelecimento *in vitro* de mandioca, estratificada por número de ápices introduzidos (2, 3 ou 4) e categorias de desenvolvimento: baixa (< 0,8 cm), média (0,8–1,2 cm) e alta (> 1,2 cm). Os números na parte superior indicam a quantidade de acessos validados em cada categoria de altura..... 98
- Figura 3.** Proporção de sobrevivência acumulada de acessos de mandioca cultivados *in vitro*, estratificada por número inicial de ápices (2, 3 ou 4). As barras à esquerda representam a sobrevivência 20 dias após a inoculação em meio 4E acrescido de AC; as barras à direita exibem plantas viáveis após 45 dias de cultivo, derivadas da repicagem dos ápices que se desenvolveram no meio 4E modificado. Cada barra empilhada demonstra: na base, acessos com todos os ápices viáveis; nas camadas superiores, perda progressiva de 1 ápice; e no topo, acessos sem sobreviventes. Valores absolutos de viabilidade de acessos são apresentados nas barras, com os totais por tratamento na base do gráfico 104
- Figura 4.** Brotações *in vitro* de ápices de mandioca com e sem a formação de calo na etapa de estabelecimento, (A) plantas aos 20 dias de cultivo, (B) plantas livres de folhas e calos para etapa de multiplicada em meio MS 0,01 ou 4E a depender do tamanho 107
- Figura 5.** Plantas *in vitro* na etapa de multiplicação aos 45 dias, meio MS0,01 (tubos 15 mm x 150 mm) ou 4E (tubos 12 mm x 150 mm) 108

CAPÍTULO 3

- Figura 1.** Esquema das etapas metodológicas empregadas na criopreservação de germoplasma de mandioca por meio de vitrificação em crio-canaletas 122
- Figura 2.** Porcentagem de sobrevivência aos 10, 20 e 30 dias e recuperação dos ápices caulinares aos 30 dias de cultivo *in vitro* de 20 acessos de mandioca sob três condições controle (absoluto, solução osmoprotetora (LS) e PVS2), empregando dois meios de recuperação (K0.5 e K0.5+) 126
- Figura 3.** Altura das brotações regeneradas aos 30 dias em função dos tratamentos controle (absoluto, osmoprotetor e PVS2) e dos meios de

recuperação (K0.5 e K0.5+) em 20 acessos de <i>Manihot esculenta</i> cultivados <i>in vitro</i>	127
Figura 4. Porcentagem geral de sobrevivência e recuperação de ápices caulinares de mandioca submetidos à criopreservação, cultivados em dois meios (K0.5 e K0.5 + 10% de AC) e duas temperaturas (28 °C e 33 °C). Avaliações aos 10, 20 e 30 dias para sobrevivência e aos 30 dias para recuperação	129
Figura 5. Odds ratios (OR) para probabilidade de recuperação (Reg30) estimados por GLMM binomial (link logit) com efeito aleatório de repetição. Pontos = OR estimada para cada acesso (exp(coef)); barras horizontais = IC95% (exp(confint)). Linha tracejada vermelha em OR = 1 indica ausência de efeito em relação ao intercepto (acesso de referência: BGM 0029). OR > 1 indica maior chance de recuperação que a referência. Cálculos realizados em R (pacote lme4/glmmTMB; versão 4.2); IC95% obtidos por método Wald	131
Figura 6. Porcentagem média de recuperação por acesso de mandioca (\pm EP), em função da temperatura (28 °C e 33 °C) e do meio (K0.5 e K0.5+). O padrão descritivo apresentado confirma as tendências inferenciais estimadas pelo GLMM (Figura 5)	132
Figura 7. Altura média de brotações regeneradas de ápices caulinares de mandioca aos 30 dias após criopreservação em nitrogênio líquido, em função do acesso, da temperatura de incubação (28 °C e 33 °C) e do meio de recuperação (K0.5 e K0.5+). Resultados expressos como distribuição de valores por ambiente de cultivo e em ordem decrescente de desenvolvimento, evidenciando as diferenças genotípicas na resposta morfogênica	135
Figura 8. Correlação de Spearman (ρ) entre os valores médios de recuperação aos 30 dias de acessos de mandioca nas diferentes fases do experimento: (A) controle (sem congelamento) versus pós-crio a 28 °C; (B) controle versus pós-crio a 33 °C; (C) 28 °C versus 33 °C; e (D) controle versus média geral dos ambientes pós-criogênicos. Cada ponto representa um acesso genético. As linhas tracejadas indicam a tendência linear; os coeficientes ρ e os respectivos valores de p estão apresentados em cada painel	139
Figura 9. Etapa da aclimatização das plantas regeneradas da criopreservação, (A) copos plásticos com mistura de substrato, (B) plantas em processo de aclimatização mantida em câmara úmida pela união de 2 copos, (C) plantas aclimatizadas aos 30 dias na etapa de avaliação	141
Figura 10. Taxa de sobrevivência de plantas de mandioca durante a aclimatização, de acordo com (A) o meio de cultura utilizado na recuperação <i>in vitro</i> (K0.5 e K0.5+), (B) a temperatura de incubação (28 °C e 33 °C) e (C) os diferentes acessos genéticos avaliados. Os números	

dentro das barras indicam a quantidade total de ápices utilizados na acclimatização 142

APÊNDICE A

Figura A.1. Ranqueamento da recuperação pós-criopreservação de ápices caulinares de 20 acessos de mandioca submetidos ao método de vitrificação em crio-canaletas. As barras representam as probabilidades preditas de recuperação aos 30 dias e estão dispostas em ordem decrescente de desempenho. A escala de cores realça os acessos com maior e menor sucesso regenerativo 153

SUMÁRIO

1.0	INTRODUÇÃO GERAL	21
2.0	REFERÊNCIAL TEÓRICO	24
2.1	A cultura da mandioca	24
2.2	Cultivo <i>in vitro</i> da mandioca	27
2.2.1	Escolha da planta matriz e tipos de explantes.....	28
2.2.2	Importância da utilização dos meristemas no cultivo <i>in vitro</i>	30
2.2.3	Morfogênese via organogênese e papel dos reguladores.....	31
2.2.4	Aditivos orgânicos no meio de cultura: água de coco.....	32
2.2.5	Influência da temperatura no cultivo <i>in vitro</i>	34
2.3	Criopreservação	36
3.0	REFERÊNCIAS	38
	CAPÍTULO 1 - Potencial morfogênico de genótipos de mandioca suplementados com água de coco sob diferentes regimes de temperatura	52
	RESUMO	53
	ABSTRACT	54
1.0	INTRODUÇÃO	55
2.0	MATERIAL E MÉTODOS	56
2.1	Estabelecimento <i>in vitro</i> de ápices caulinares de mandioca	57
2.2	Delineamento experimental e recuperação <i>in vitro</i> de ápices caulinares de mandioca em meio de cultura suplementado com água de coco	59
2.3	Delineamento experimental e influência da temperatura na recuperação <i>in vitro</i> de ápices caulinares de mandioca	59
2.4	Metodologia estatística	60
3.0	RESULTADOS E DISCUSSÃO	60
3.1	Influência da água de coco na recuperação <i>in vitro</i> de ápices caulinares de mandioca.....	60
3.2	Influência da temperatura na recuperação <i>in vitro</i> de ápices caulinares de mandioca.....	63
3.3	Análise de componentes principais: Resposta dos diferentes genótipos com base em variáveis associadas ao desempenho <i>in vitro</i>	72
4.0	CONCLUSÕES	75
5.0	REFERÊNCIAS	75
	CAPÍTULO 2 - Validação de protocolo com suplementação de água de coco e temperatura otimizada para o estabelecimento <i>in vitro</i> de ápices caulinares de mandioca	81
	RESUMO	82
	ABSTRACT	83
1.0	INTRODUÇÃO	84
2.0	MATERIAL E MÉTODOS	86
2.1	Local do experimento	86
2.2	Meio de cultivo	86
2.3	Estabelecimento <i>in vitro</i> de ápices caulinares	86
2.4	Condições de cultivo e avaliações	87
2.5	Delineamento experimental e Análise estatística	87
3.0	RESULTADOS E DISCUSSÃO	88
3.1	Relação entre variáveis independentes, categóricas e eficiência do protocolo.....	88

3.2	Altura das Brotações no estabelecimento dos acessos	94
3.3	Modelagem preditiva do sucesso da introdução <i>in vitro</i> via regressão logística	100
4.0	CONCLUSÕES	108
5.0	REFERÊNCIAS	108
	CAPÍTULO 3 - Crio-canaletas aplicadas à criopreservação de ápices caulinares de mandioca: desempenho em ambientes de recuperação	114
	RESUMO	115
	ABSTRACT	116
1.0	INTRODUÇÃO	117
2.0	MATERIAL E MÉTODOS	119
2.1	Material Vegetal.....	120
2.2	Padronização do material de partida.....	120
2.3	Retirada dos ápices.....	120
2.4	Controles Experimentais.....	120
2.5	Osmoproteção.....	121
2.6	Descongelamento e recuperação.....	121
2.7	Aclimatização.....	123
2.8	Delineamento experimental.....	123
3.0	RESULTADOS E DISCUSSÃO	124
3.1	Sobrevivência e taxas de recuperação das brotações controles.....	124
3.2	Altura das brotações controles.....	126
3.3	Resposta à criopreservação.....	128
3.3.1	Eficiência pós-congelamento: sobrevivência e recuperação.....	128
3.3.2	Desenvolvimento das brotações regeneradas.....	134
3.4	Comparação entre droplet vitrification e crio-canaletas na criopreservação	137
3.5	Correlações entre tratamentos	138
3.6	Aclimatização.....	140
4.0	CONCLUSÕES	143
5.0	REFERÊNCIAS	143
	CONSIDERAÇÕES FINAIS	150
	APÊNDICE A	152

1. INTRODUÇÃO GERAL

A mandioca está entre as culturas mais cultivadas na agricultura mundial, sendo a segunda espécie tuberosa mais utilizada na alimentação humana, atrás apenas da batata inglesa. Segundo a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura, em 2023 o Brasil produziu 18,51 milhões de toneladas de raízes de mandioca, ocupando a quinta posição entre os maiores produtores mundiais (FAO, 2025). Seu papel é fundamental tanto para a segurança alimentar quanto para a geração de renda em regiões tropicais (PANIS; NAGEL; VAN DEN HOUWE, 2020; MOELIONO; SOETOPRAWIRO, 2023). Com teor de amido variando entre 20% e 40%, a mandioca constitui uma fonte energética valiosa, com ampla aplicação na alimentação humana, nutrição animal e diversos setores industriais, incluindo biocombustíveis, papel, têxteis, madeira, adesivos, álcool, cosméticos e produtos farmacêuticos (BALAT; BALAT, 2009; RONGSIRIKUL et al., 2010).

No Brasil, a mandioca desempenha papel estratégico, especialmente nas regiões mais carentes do Nordeste, sendo importante fonte de energia alimentar e de geração de emprego e renda (SILVA; MURRIETA, 2014). A espécie apresenta ampla diversidade genética, atribuída à polinização cruzada e à elevada heterozigosidade. A deiscência explosiva dos frutos favorece a emergência espontânea de novos genótipos. Essa variabilidade é conservada em bancos de germoplasma distribuídos por todo o país, com cerca de 600 acessos de espécie silvestre (FUKUDA; COSTA; SILVA, 2005) e destaque para a Embrapa Mandioca e Fruticultura, que tem catalogado 2.344 acessos de *Manihot esculenta* em campo e destas 602 *in vitro* (EMBRAPA, 2025). No âmbito deste projeto, mais de 500 desses acessos *in vitro* foram efetivamente estabelecidos na execução do protocolo proposto, reforçando a representatividade e a segurança da conservação genética em condições controladas.

O melhoramento genético da mandioca tem se concentrado na avaliação de variedades locais, coleta e intercâmbio de germoplasma, recombinação e seleção de híbridos, além do uso de espécies silvestres para ampliação da base genética. Os avanços da biotecnologia vêm contribuindo significativamente para a eficiência desses programas, permitindo a seleção de genótipos mais produtivos e resistentes a pragas e doenças.

Segundo Krishna *et al.* (2023), os métodos convencionais de melhoramento de culturas podem levar de 12 a 15 anos para desenvolver uma nova variedade., abrangendo etapas como a avaliação e manipulação do germoplasma, seleção de parentais, definição da estratégia de melhoramento, estabilização genética, experimentação, multiplicação, proteção da cultivar, produção comercial e controle de qualidade.

No contexto da cultura de tecidos, diversas técnicas têm sido aplicadas à mandioca, como a recuperação e propagação por meio de calos, ápices caulinares, gemas axilares, protoplastos, embriogênese somática, incluindo obtenção de haploides, cultura de embriões, indução de mutações e transformação genética (SOUZA *et al.*, 2006a). Essas técnicas têm sido fundamentais no lançamento de novas variedades, permitindo a rápida disponibilização de materiais melhorados aos agricultores (SOUZA *et al.*, 2006b).

A propagação *in vitro* da mandioca constitui alternativa eficiente para superar a baixa taxa de multiplicação obtida nos métodos convencionais, limitada a apenas 1:8 a 1:12 por ano (OTOO, 1996; SOUZA *et al.*, 2002). Em cultivo *in vitro*, as taxas variam conforme o protocolo empregado. Oliveira, Gomes e Vilarinhos (2000) registraram uma média de 2,9 por subcultivo de 30 dias, resultando em média 231,2 plântulas acumuladas após cinco subcultivos. Resultados semelhantes foram relatados por Sief-Eldein (2024), que observou incremento de 2 para 4,6 brotos por explante entre a primeira e a quinta subcultura, também em ciclos mensais. Apesar dos avanços, a cultura de tecidos ainda apresenta limitações, sobretudo pela baixa reprodutibilidade entre genótipos, demandando ajustes específicos para cada variedade (MONTHONY *et al.*, 2021).

Entre as estratégias promissoras para a otimização da micropropagação de mandioca, está a adição de água de coco (AC) ao meio de cultura, combinada com citocininas e auxinas sintéticas, o que favorece a organogênese e melhora a eficiência do cultivo *in vitro* (HARTATI *et al.*, 2017). Rica em nutrientes e reguladores de crescimento, a AC também atua na recuperação de explantes danificados e na reativação do metabolismo celular (ARDITTI *et al.*, 1990; DAUD *et al.*, 2011; PRABOWO *et al.*, 2018).

Outro fator crucial é a temperatura, que influencia diretamente o metabolismo vegetal. A definição de uma faixa térmica ideal para diferentes genótipos é essencial, uma vez que temperaturas elevadas, dentro de limites

toleráveis, promovem respostas positivas em plantas tropicais como a mandioca, aumentando a área foliar e a taxa de recuperação (PILON, SANTAMARÍA, 2002; TADESSE, LOMMEN, STRUIK, 2001). Esse efeito é intensificado pela interação com o meio de cultura, os fitoreguladores e os compostos da AC, que aceleram os processos fisiológicos.

Além da otimização da micropropagação, os protocolos de cultivo *in vitro* possibilitam a conservação do germoplasma em condições controladas, atuando como complemento aos bancos de campo e permitindo o resgate de plantas preservadas. Para tanto, o controle preciso de fatores bióticos e abióticos é fundamental, assegurando a viabilidade dos tecidos e a manutenção da diversidade genética.

Além do cultivo *in vitro*, a criopreservação surge como uma alternativa, permitindo o armazenamento em nitrogênio líquido a -196°C , conservando a viabilidade e estabilidade genética (ESCOBAR et al., 2014). Os ápices caulinares são preferidos para a criopreservação devido ao seu tamanho e capacidade de recuperação (YAMAMOTO et al., 2011).

A técnica de droplets com vitrificação (DV) se destaca na criopreservação, evitando a formação de cristais de gelo e permitindo a transição para o estado sólido (SAKAI, ENGELMANN, 2007; ESCOBAR et al., 2014). Após o congelamento, os explantes são recultivados em meio de cultura apropriado para induzir a formação de brotos e raízes (THAMMASIRI, SOAMKUL, 2007; ESCOBAR et al., 2014). Reativar plantas criopreservadas é um desafio, que envolve superação de danos físicos aos explantes causados pelo congelamento e pela toxidez dos agentes crioprotetores. A AC, rica em nutrientes e reguladores de crescimento, emerge como estratégia para superar danos e reativar o metabolismo celular (ARDITTI et al., 1990; DAUD et al., 2011; PRABOWO et al., 2018). No entanto, fatores como tipo e concentração do meio de cultura, substâncias reguladoras de crescimento, temperatura e iluminação influenciam a recuperação (ESCOBAR et al., 2014).

Diante disso, o presente estudo foi estruturado em três capítulos, abordando o processo de micropropagação da mandioca, a validação dos protocolos estabelecidos e a conservação *in vitro* por meio da técnica de criopreservação.

O primeiro capítulo, intitulado: “Potencial morfogênico de genótipos de mandioca suplementados com água de coco sob diferentes regimes de temperatura”, teve como objetivo avaliar o potencial morfogênico de genótipos de mandioca cultivados em meio MS suplementado com diferentes concentrações de AC, sob distintos regimes de temperatura, visando identificar condições que favoreçam a resposta morfogênica e que possam ser aplicadas em protocolos eficientes e de baixo custo para micropropagação da espécie.

No segundo capítulo, " Validação de protocolo com suplementação de água de coco e temperatura otimizada para o estabelecimento *in vitro* de ápices caulinares de mandioca", objetivou-se testar a aplicabilidade do protocolo de introdução *in vitro* do primeiro capítulo para o estabelecimento de ápices de mandioca, visando a expansão do Banco *in vitro* da Embrapa Mandioca e Fruticultura. O estudo avaliou a influência do número de ápices por acesso (2, 3 e 4) e de variáveis independentes na eficiência do processo, utilizando 520 acessos do Banco Ativo de Germoplasma (BAG) de campo. A investigação focou na viabilidade quantitativa e qualitativa, buscando superar desafios de aplicabilidade do protocolo e otimizar a conservação de germoplasma e a micropropagação. A validação desta metodologia em uma vasta gama de acessos é crucial para sua disseminação e publicação.

No terceiro capítulo, intitulado: “Crio-canaletas aplicadas na criopreservação de ápices caulinares de mandioca: desempenho em ambientes de recuperação”, o objetivo foi avaliar a eficácia da metodologia CCV (Crio-canaletas e vitrificação) na criopreservação de mandioca, comparando sistematicamente: (i) a influência dos meios K0.5 e K0.5+AC 10% nas taxas de recuperação; (ii) o efeito diferencial das temperaturas de 28°C e 33°C no desenvolvimento morfogênico pós-criopreservação, verificando a eficiência da CCV para comparações futuras com protocolo DV convencional.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. A cultura da mandioca

A mandioca pertence à família Euphorbiaceae, subfamília Crotonoideae, tribo Manihotae e gênero *Manihot*. O gênero tem duas seções, a Arborae, contendo espécies de árvores, e a Fruticosae, compreendendo arbustos de crescimento

lento adaptados a pastagens de savana ou condições desérticas (JENNINGS; IGLESIAS, 2001). Atualmente classificada como uma eudicotiledônea, a mandioca pertence à família Euphorbiaceae, que engloba aproximadamente 290 gêneros e 7.500 espécies distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais do planeta (OPABODE *et al.*, 2011; SIMPSON, 2019; MOELIONO; SOETOPRAWIRO, 2023). Dentre as espécies do gênero *Manihot*, a mandioca (*Manihot esculenta*) destaca-se como a única comestível (CARDOSO; GAMEIRO, 2006).

Acredita-se que a mandioca (*Manihot esculenta*) tenha sido domesticada antes de 4.000 a.C., sendo seu centro de origem localizado na América do Sul. No entanto, a origem geográfica exata da cultura tem sido objeto de debate ao longo dos anos, especialmente após o surgimento de novas evidências. A definição da origem geográfica está diretamente relacionada à distribuição natural e aos habitats das espécies selvagens do gênero *Manihot* (NASSAR; ORTIZ, 2009).

Apesar da existência de resultados controversos, atualmente considera-se que a fronteira sul da bacia amazônica seja o centro de origem mais amplamente aceito para *M. esculenta*. A elevada diversidade de espécies selvagens de *Manihot* encontradas no Brasil reforça a hipótese de que essa região constitui o principal centro primário de diversidade genética da mandioca (NASSAR, 2000; OLSEN, 2001; LÉOTARD *et al.*, 2009). No país, já foram registradas 116 espécies para este gênero, das quais 101 são endêmicas, consolidando o Brasil como o maior centro de diversidade de *Manihot*, com a maioria dessas espécies concentradas nos biomas Cerrado e Caatinga (NASSAR, 2000; FLORA, 2023; MARTINS *et al.*, 2025).

Dentes estas, a *Manihot esculenta* Crantz é a única espécie que possui valor comercial e, portanto, apresenta maior relevância agrônômica. A mandioca (*M. esculenta*) originária da América do Sul, é o segundo alimento mais energético para um bilhão de pessoas, principalmente nos países em desenvolvimento (OLSEN, 2004). Cerca de 70% da planta de mandioca é utilizada para consumo humano, o restante é empregado para a alimentação animal e produtos industriais, como amido, glicose e álcool como cita El-Sharkawy (2004).

Tradicionalmente, a mandioca é propagada por meio de estacas caulinares, o que a torna suscetível à infecção por doenças, especialmente viroses, que tendem a se acumular ao longo de ciclos sucessivos de propagação vegetativa. Segundo Calvert e Thresh (2002), cerca de 16 vírus diferentes já foram identificados e isolados em plantas de mandioca, estando amplamente distribuídos

em regiões produtoras ao redor do mundo. Para a eliminação desses vírus e de outros patógenos, a técnica de cultura de meristemas é considerada uma abordagem eficiente, permitindo a produção de material de plantio isento de contaminações (CALVERT; THRESH, 2002; ACEDO; LABANA, 2008; de OLIVEIRA et al., 2020).

Aproximadamente 100 países produzem mandioca, com o Brasil representando 5,7% da produção global, atrás da Nigéria, República Democrática do Congo, Tailândia e Gana (FAO, 2025). A mandioca é cultivada em todos os estados brasileiros porque é de fácil adaptação e está entre os oito primeiros produtos agrícolas do país em termos de área cultivada e sexto em valor de produção (EMBRAPA, 2023). No Brasil, a produção alcançou mais de 17 milhões de toneladas em 2022, sendo a região norte a maior produtora (IBGE, 2022).

A mandioca é uma cultura amplamente cultivada em diversas regiões do mundo, com destaque para sua importância na agricultura familiar. Além de representar uma significativa fonte de calorias na alimentação humana, destaca-se por sua resistência à seca e por adaptar-se bem a diferentes tipos de solo e condições climáticas (SÁ, 2018).

Acima de tudo a mandioca, na maioria das vezes vista como alimento de subsistência, é na verdade estratégica para o futuro sustentável. Ao mesmo tempo em que combate a fome em regiões carentes, movimenta economias locais e internacionais. Com isso, integrar a mandioca às políticas públicas é alinhar agricultura familiar, a segurança alimentar e o combate à pobreza diretamente com a Agenda 2030 da ONU (UNITED NATIONS, 2015; 2023).

Trata-se de uma planta com raízes tuberosas ricas em carboidratos, que podem ser utilizadas tanto para o consumo humano quanto para a alimentação animal, seja *in natura* ou processada pela indústria. A fécula ou amido extraído das raízes é amplamente empregado na produção de alimentos como bolos, tortas, polvilho, tapioca, pães e farinha de mesa. Além do uso culinário, o amido também é aplicado em diversos setores industriais, incluindo a fabricação de papel, fósforos, embalagens, creme dental, produtos têxteis e de tinturaria (NJOKU et al., 2015).

Estima-se que aproximadamente 40% das raízes sejam destinadas à produção de farinha, 20% à fabricação de amido, e o restante ao consumo direto (mandioca de mesa) e alimentação animal (EMBRAPA, 2023). As folhas da mandioca também são comestíveis e apresentam alto valor nutricional, sendo ricas

em proteínas, vitaminas (B1, B2, C, carotenoides) e minerais como cálcio (Ca), magnésio (Mg) e potássio (K). Além disso, estão disponíveis durante todo o ano para consumo (PARMAR; STURM; HENSEL, 2017).

2.2. Cultivo *in vitro* da mandioca

A cultura de tecidos e as intervenções biotecnológicas associadas, auxiliam na criação e no desenvolvimento de protocolos que possibilitam a melhoria de diversos aspectos na cultura de plantas, nas áreas de: introdução de meristemas, multiplicação, resgate e cultura de embriões; propagação clonal via embriogênese somática; conservação de germoplasma e transformação genética (NGUYEN, *et al.*, 2015).

A cultura *in vitro* da mandioca (*M. esculenta* Crantz) surgiu como uma importante ferramenta biotecnológica a partir da década de 1970, visando superar as limitações da propagação convencional, principalmente no que diz respeito aos problemas fitossanitários associados à multiplicação vegetativa. As primeiras iniciativas utilizaram segmentos nodais como explantes para a micropropagação clonal, com o intuito de produzir mudas geneticamente uniformes e isentas de patógenos (ROCA *et al.*, 1991). Contudo, devido ao tamanho relativamente grande desses explantes, não se obtinha a completa limpeza clonal. Com o avanço das pesquisas, técnicas como a termoterapia e o uso de ápices caulinares reduzidos passaram a ser empregadas, proporcionando maior eficiência na obtenção de plantas saudáveis, embora sem garantir eliminação total de vírus. A partir de então, técnicas mais avançadas como a cultura de meristemas associadas à termoterapia demonstraram maior eficácia no aumento da taxa de recuperação de meristemas e melhores condições de limpeza clonal. Por exemplo, em cultivares de mandioca BFM260 do Burkina Faso, a termoterapia elevou a taxa de recuperação de meristemas para 60,9 %, bem superior ao controle, além de promover maior número de nós e brotos (OUÉDRAOGO *et al.*, 2025).

O Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), localizado na Colômbia, teve papel crucial na padronização dos protocolos de cultivo *in vitro* para mandioca, desenvolvendo estudos sobre meios de cultura, uso de reguladores de crescimento e condições ambientais ideais para o desenvolvimento de brotos e raízes (ROCA; ARIAS; CHAVÉZ, 1991). Essas contribuições foram fundamentais para a adoção da técnica em diversos países tropicais, servindo como base para os protocolos e

técnicas desenvolvidas pela Embrapa, fortalecendo programas de melhoramento genético e conservação de recursos genéticos.

Posteriormente, estratégias de conservação *in vitro* de médio e longo prazo, como o cultivo em crescimento lento e a criopreservação, foram desenvolvidas para garantir a preservação da diversidade genética em bancos de germoplasma, com a manutenção da estabilidade genética e fisiológica (ENGELMANN, 2011; MACIA *et al.*, 2025). Tais metodologias tornaram-se indispensáveis diante da crescente ameaça à biodiversidade e à erosão genética.

Avanços recentes incluem o uso de aditivos naturais, como a AC, no meio de cultura, contribuindo para o aumento da taxa de recuperação e desenvolvimento morfogênico de *Lycaste sp.*, devido à presença de hormônios naturais, açúcares e aminoácidos (MACHADO; ZAMARIAN, 2020). Além disso, estudos demonstram que a associação entre temperatura e composição do meio pode otimizar a recuperação de tecidos após criopreservação, ampliando a eficiência da técnica (ENGELMANN, 2011).

A Embrapa foca no melhoramento genético da mandioca para enriquecimento nutricional, combatendo deficiências com variedades biofortificadas em pró-vitamina A (ex: BRS Jari, BRS Gema de Ovo). Atua também na otimização da produção e qualidade de amido para a indústria de fecularia, desenvolvendo cultivares de alta produtividade e teor de amido (ex: BRS Poti Branca, BRS 417). Paralelamente, investe em métodos fitossanitários, como cultivo de meristemas e câmaras térmicas, para obter material livre de vírus.

Assim, o cultivo *in vitro* da mandioca consolidou-se como uma técnica estratégica para a propagação, saneamento, conservação e intercâmbio internacional de germoplasma.

2.2.1. Escolha da planta matriz e tipos de explantes

No cultivo *in vitro*, a seleção adequada do explante, especialmente os meristemas vegetais, é fundamental para o êxito do processo. Os meristemas, devido à sua elevada capacidade regenerativa e propriedades antivirais, quando extraído apenas tecido sem vascularização, são essenciais tanto para a recuperação de tecidos danificados quanto para a regeneração de órgãos. Contudo, a manipulação inadequada durante o isolamento meristemático, como procedimentos prolongados ou lesões mecânicas, pode comprometer sua

viabilidade e, conseqüentemente, reduzir sua capacidade de regeneração (IKEUCHI et al., 2016; IKEUCHI et al., 2020; YAHYAUI et al., 2021).

A capacidade antiviral dos meristemas é amplamente explorada na obtenção de germoplasma livre de vírus, sendo uma estratégia eficaz para diversas culturas agrícolas (ALAM et al., 2004; SAN PEDRO et al., 2017). Plantas regeneradas a partir de meristemas saudáveis tendem a apresentar crescimento vigoroso, maior resistência a doenças e melhor desempenho produtivo e qualitativo (YAHYAUI et al., 2021).

Durante o cultivo de meristemas, diversos fatores devem ser considerados além da espécie vegetal, como a composição hormonal do meio de cultura, o uso de reguladores osmóticos e a consistência física do meio, aspectos que influenciam diretamente as taxas de regeneração (IKEUCHI et al., 2016; IKEUCHI et al., 2020; YAHYAUI et al., 2021).

O desempenho a longo prazo dos explantes pode ser influenciado por fatores como a estação do ano, o estágio de desenvolvimento e a localização do tecido na planta (ISAH, 2020; MARTINI; VLACHOU; PAPAFOU, 2022). De maneira geral, explantes juvenis mostram maior vigor e capacidade de resposta às técnicas de micropropagação quando comparados a tecidos maduros (HESAMI et al., 2023). A posição física e a idade do explante afetam diretamente o perfil hormonal endógeno, influenciando a competência do tecido para indução de respostas regenerativas. Além disso, características como tamanho, tipo e fase de desenvolvimento do tecido são determinantes para o sucesso do cultivo *in vitro* (ANTONOPOULOU et al., 2008; WANG; VALKONEN, 2008).

A origem do explante também se destaca como um dos principais fatores nas estratégias de rejuvenescimento, empregadas para mitigar a perda de vigor cultural ao longo do tempo. Explantes mais jovens respondem mais eficientemente a essas práticas, resultando em alterações fenotípicas observáveis, como variações na filotaxia, formato e tamanho das folhas, além de melhorias na taxa de multiplicação (GOLLE et al., 2012; HESAMI et al., 2023).

Por fim, o desenvolvimento *in vitro* de meristemas de mandioca é fortemente influenciado pelo genótipo das variedades utilizadas. A ampla variabilidade genética da espécie impacta diretamente a resposta morfogênica em condições de cultivo *in vitro*, tornando o potencial regenerativo dependente não apenas da composição do meio e dos reguladores de crescimento, mas também

das características genóticas específicas (COSTA et al., 2019; ADJEBENG-DANQUAH et al., 2020; NUNES et al., 2021).

2.2.2. Importância da utilização dos meristemas no cultivo *in vitro*

A utilização de meristemas no cultivo *in vitro* desempenha papel fundamental na introdução e regeneração de plantas, promovendo a limpeza clonal e a eliminação de patógenos, uma vez que esses tecidos não são vascularizados, característica que reduz a presença de vírus, bactérias e fungos (GARCÍA-GONZÁLES et al., 2010). A eficiência dessa técnica baseia-se na hipótese de que os patógenos se distribuem de forma desigual, apresentando concentrações progressivamente menores à medida que se aproxima da região meristemática (ABDELNOUR et al., 2006; WANG; VALKONEN, 2009). Contudo, fatores como o tamanho do explante e o genótipo da planta influenciam diretamente as taxas de sobrevivência e o sucesso da limpeza clonal em mandioca (BANERJEE et al., 2010; CARVALHO et al., 2017).

Mwangangi et al. (2014) identificaram uma relação inversamente proporcional entre o tamanho dos ápices caulinares e a eficácia na eliminação de vírus em mandioca, observando que ápices de menor tamanho resultam em maior número de plantas livres de infecção. A cultura *in vitro* de meristemas ou ápices caulinares exige precisão na dissecação da região meristemática, sendo recomendável a manutenção de um ou dois primórdios foliares associados ao meristema para garantir a regeneração bem-sucedida (PARMESSUR et al., 2002). Embora a excisão de meristemas muito pequenos aumente a eficiência na erradicação de patógenos, a capacidade regenerativa está diretamente relacionada ao tamanho da ponta do broto. A erradicação de vírus é mais eficiente quando se utilizam meristemas entre 0,2 e 0,3 mm, apesar das dificuldades técnicas envolvidas na manipulação de tecidos tão pequenos (WANG; VALKONEN, 2008; WANG; VALKONEN, 2009; CRUZ-CRUZ; GONZÁLEZ-ARNAO; ENGELMANN, 2013).

Estudos como o de Alam et al. (2013), demonstram que meristemas com tamanho entre 0,3 e 0,5 mm são eficazes na eliminação de vírus em batata-doce, enquanto meristemas inferiores a 0,3 mm apresentaram baixa taxa de regeneração. A combinação da cultura de meristemas com técnicas complementares, como a

termoterapia, tem se mostrado promissora na obtenção de plantas livres de vírus e na produção de estoques fitossanitários (ENGELMANN, 2011).

Portanto, a introdução de meristemas no cultivo *in vitro* representa uma abordagem eficiente não apenas para regeneração e limpeza clonal, mas também para facilitar os procedimentos de quarentena e o intercâmbio internacional de germoplasma. Essa técnica garante o envio seguro de material vegetal em estado sanitário adequado, viabilizando o transporte de grandes quantidades de material miniaturizado (ENGELMANN, 2011).

2.2.3. Morfogênese via organogênese e papel dos reguladores

A cultura de tecidos vegetais, incluindo a micropropagação, permite a produção de múltiplas cópias geneticamente idênticas a partir de pequenos pedaços de tecido vegetal, conhecidos como explantes. Essa técnica possibilita a propagação de mudas uniformes, independentes da estação do ano e livres de doenças transmitidas por sementes, representando uma vantagem significativa. Além disso, contribui para a conservação de espécies vegetais (FAN; MANIVANNAN; WEI, 2022; MEHBUB et al., 2022).

O cultivo *in vitro* tem se consolidado como uma ferramenta essencial para a propagação e melhoramento de plantas, incluindo a mandioca, uma vez que possibilita a multiplicação rápida de plantas geneticamente melhoradas. Nesse contexto, o cultivo de ápices caulinares de mandioca *in vitro* destaca-se como uma técnica promissora para a obtenção de material propagativo de alta qualidade.

Tanto em condições naturais quanto no cultivo *in vitro*, as células e tecidos vegetais são influenciados por metabólitos reguladores, os fitoreguladores, entre os quais as citocininas desempenham papel fundamental no desenvolvimento das plantas. As citocininas regulam a sinalização nutricional, morfologia, proliferação celular, crescimento das partes aérea e radicular, além de controlar a dominância apical (MAZID; KHAN; MOHAMMAD, 2011; WANG; ZHANG; WU, 2016; KIEBER; SCHALLER, 2018). Elas atuam em conjunto com as auxinas, estimulando a divisão celular e a diferenciação dos tecidos vegetais (KIEBER; SCHALLER, 2018).

Estudos clássicos de Skoog e Miller (1957) demonstraram que a organogênese resulta da interação entre diferentes fitoreguladores, principalmente citocininas e auxinas, em conjunto com giberelinas e outros metabólitos (SAAD; ELSHAHED, 2012; NUNES et al., 2015). A presença exógena de citocininas no

meio de cultura pode promover a regulação positiva da biossíntese e do transporte de auxinas, elevando seus níveis endógenos e influenciando diretamente o desenvolvimento do meristema apical da parte aérea (CHENG et al., 2012; ĆOSIĆ et al., 2015; TAMAKI et al., 2009).

Além disso, a sacarose atua como uma molécula-chave na potencialização da ação dos fitoreguladores, estimulando processos metabólicos que favorecem o desenvolvimento das plantas em cultura (SKYLAR et al., 2011). As giberelinas, por sua vez, exercem papel importante no cultivo *in vitro* de ápices caulinares, regulando o alongamento do caule e o desenvolvimento dos internódios. A aplicação adequada de giberelinas, como o ácido giberélico (AG₃), pode promover o desenvolvimento de plantas vigorosas, com caules alongados e internódios bem espaçados (SAAD; ELSHAHED, 2012).

O sucesso do cultivo *in vitro* está diretamente associado ao controle da morfogênese, incluindo a indução e regeneração de brotos e raízes no processo de organogênese (SOUZA et al., 2010). Diversos estudos investigam os fatores que influenciam e regulam esses processos (LAKSHMANAN et al., 1997; SOUZA et al., 2010; HNATUSZKO-KONKA et al., 2021). Nesse sentido, compreender os mecanismos de ação dos fitoreguladores e suas interações com outros metabólitos é essencial para o desenvolvimento de técnicas de cultivo de tecidos vegetais mais eficientes, permitindo a manipulação controlada do crescimento e desenvolvimento das plantas. Essas informações são fundamentais para aplicações práticas na produção de mudas, melhoramento genético e conservação de espécies vegetais.

2.2.4. Aditivos orgânicos no meio de cultura: água de coco

O uso de compostos orgânicos de baixo custo, como a AC, uma solução estéril e levemente ácida extraída do fruto do coqueiro (*Cocos nucifera* L.) tem se mostrado uma alternativa eficaz para substituir aditivos comerciais no cultivo *in vitro*, reduzindo significativamente os custos da micropropagação em escala comercial (DAUD et al., 2011).

A AC destaca-se por ser uma fonte natural e econômica de reguladores de crescimento vegetal (PGRs), contendo auxinas, giberelinas, citocininas, entre outros metabólitos bioativos (PRABOWO et al., 2018). A combinação desses aditivos orgânicos com reguladores sintéticos, como citocininas, auxinas e giberelinas, tem sido amplamente empregada para aprimorar características

morfológicas e fisiológicas das plantas cultivadas (ROY; BANERJEE, 2002). Além de fornecer nutrientes essenciais para o desenvolvimento da parte aérea e das raízes, esses aditivos promovem, quando aplicados com esta finalidade, a formação de calos e a embriogênese somática (ARDITTI et al., 1990; DAUD et al., 2011).

A incorporação da AC ao meio de cultura melhora a composição nutricional do meio de introdução de ápices caulinares da mandioca, devido à sua eficiência em fornecer nutrientes orgânicos e fito-hormônios prontamente assimiláveis pelos explantes (PRAKASH; HOQUE; BRINKS, 2004; AKTER; NASIRUDDIN; KHALDUN, 2007). Sua composição química inclui proteínas, compostos nitrogenados, ácidos orgânicos, carboidratos como frutose e glicose, aminoácidos, sais minerais, vitaminas (C e do complexo B: B1, B2, B3 e B6), além de fitormônios, principalmente citocininas dos tipos Z (trans-zeatina O-glicosídeo, di-hidrozeatina O-glicosídeo, trans-zeatina ribosídeo-5-monofosfato), iP (N6-isopenteniladenina), cinetina, ribosídeo de cinetina, ortotopolina, e ácidos graxos. Tal riqueza em compostos explica a eficácia da AC como aditivo orgânico nos meios de cultura (PRAKASH; HOQUE; BRINKS, 2004; AKTER; NASIRUDDIN; KHALDUN, 2007; YONG et al., 2009; PRADES et al., 2012; SOUZA et al., 2013; SOUZA; BERKOV; SANTOS, 2014).

A presença de citocininas na AC estimula a divisão celular, promovendo o rápido crescimento e desenvolvimento dos tecidos vegetais, além de favorecer a germinação de sementes (ARDITTI, 2009; PRADES et al., 2012; YONG et al., 2009). Esta propriedade motivou sua introdução como componente do meio nutritivo para a cultura de calos em *Datura stramonium* (VAN OVERBEEK; CONKLIN; BLAKESLEE, 1941).

A AC é utilizada em culturas de tecidos vegetais, em concentrações que variam entre 3% e 15%, sendo considerada eficaz para a maioria das espécies vegetais cultivadas *in vitro* (CALDAS; HARIDASAN; FERREIRA, 1998). A sua adição modifica significativamente a composição e a quantidade de nutrientes no meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), influenciando diretamente a taxa de crescimento, a diferenciação celular e a totipotência das células vegetais. Diversos estudos comprovam que a AC melhora a regeneração em várias espécies (MADDOCK et al., 1983; MATHIAS; SIMPSON, 1986; AL-KHAYRI et al., 1992; BOASE; WRIGHT; MCLEAY, 1993; NASIB; ALI; KHAN, 2008; YONG et al., 2009;

SANANDA *et al.*, 2012; HASMAYAPUTRA; ASNAWATI; ARIFIN, 2024), incluindo a mandioca. A citocinina e o nitrogênio presentes na AC estimulam a síntese proteica e a divisão celular, promovendo o aumento do número de folhas, elemento essencial para a morfogênese (SOUZA *et al.*, 2013).

Quando combinada com auxinas sintéticas, a adição da AC ao meio de cultura acelera a formação radicular, elevando as taxas de sucesso no enraizamento das plantas micropropagadas de Black orchid hybrid (*Coelogyne pandurata* Lindley) (HARTATI *et al.*, 2017). Além disso, a AC é amplamente empregada na indução do crescimento em culturas de calos e na morfogênese, geralmente em concentrações entre 10% e 15% em diversas culturas principalmente orquídeas (SINGH, 2020). Essa eficiência está associada à sua composição rica em aminoácidos, ácidos graxos, minerais e compostos como a difenilureia, que atua como citocinina (SANTOSO *et al.*, 1996; GNASEKARAN *et al.*, 2010; NAMBIAR; TEE; MAZIAH, 2012; GANSAU *et al.*, 2016).

2.2.5. Influência da temperatura no cultivo *in vitro*

Além da composição do meio de cultura, as condições ambientais às quais as plantas são submetidas também exercem influência significativa sobre o desenvolvimento *in vitro*. Fatores como temperatura e radiação luminosa são particularmente determinantes, especialmente quando associados à espécie vegetal em cultivo.

As condições ambientais de incubação são um dos fatores mais essenciais no cultivo *in vitro*, pois o desenvolvimento vegetal depende fortemente da interação entre temperatura e luz, modulada pelas características fisiológicas de cada espécie (PIERIK, 1997; GEORGE; HALL; DE KLERK, 2007). Ademais, o potencial genético faz com que diferentes espécies, e até genótipos dentro da mesma espécie, apresentem respostas distintas aos fatores abióticos (YAMASHITA *et al.*, 2009). Quando esses fatores atuam em conjunto, seus efeitos sobre o desenvolvimento vegetal podem ser potencializados (GALON *et al.*, 2010).

A interação entre temperatura, umidade e luminosidade é fundamental para a fotossíntese e o desempenho fisiológico das plantas. A radiação luminosa exerce influência direta no desenvolvimento vegetal e indireta no regime térmico, impactando a produção de biomassa e os processos de evapotranspiração (MORAIS, 2009).

A temperatura do ambiente é um regulador central do desenvolvimento vegetal. Tanto temperaturas excessivamente altas quanto baixas podem ser prejudiciais. Cada espécie vegetal apresenta uma faixa mínima e máxima de tolerância térmica, além de uma faixa ótima de temperatura para o crescimento ideal, que varia conforme a espécie, estágio de desenvolvimento e atividade fisiológica (GABRIEL et al., 2014; PEREIRA; SIQUEIRA, 2018). Assim, a taxa de crescimento das gemas depende principalmente do equilíbrio entre reguladores de crescimento vegetal (PGRs), temperatura, luz e umidade.

A temperatura, além de influenciar a eficiência fotossintética, pode atuar como fator limitante ou estimulador dos processos fisiológicos, dependendo da espécie vegetal e de sua adaptação climática (tropical ou temperada) (BARRUETO CID, 2015; LAMBOLEZ et al., 2022). Em estudo com batata, Tadesse et al. (2001) observaram aumento logarítmico da área foliar ao longo do tempo em plântulas propagadas *in vitro* sob temperaturas elevadas, evidenciando a influência do ambiente térmico em todas as fases do processo produtivo. No caso da mandioca, espécie tipicamente tropical, há uma resposta positiva ao aumento da temperatura no cultivo *in vitro*.

A interação entre fatores abióticos, como temperatura, luminosidade e umidade, afeta diretamente o crescimento das plantas cultivadas *in vitro*, uma vez que influenciam processos como fotossíntese, transpiração e acúmulo de biomassa (BAGLEY et al., 2015; GREER, 2015; LIMA NETO et al., 2015). É importante ressaltar que cada espécie vegetal possui exigências térmicas específicas, e diferentes tecidos dentro da mesma planta podem apresentar faixas ótimas distintas. Compreender essa interação é essencial para garantir o funcionamento fisiológico adequado durante o cultivo (FREITAS; MARTINS; ABREU, 2017).

A temperatura ideal para o metabolismo vegetal varia de acordo com a espécie. Entretanto, desvios significativos dessa faixa ideal podem levar à redução da produtividade (PILON; SANTAMARÍA, 2002). Respostas fisiológicas mais eficientes em temperaturas ótimas estão associadas à disponibilidade de carboidratos e fitoreguladores (SALISBURY; ROSS, 1991; LARCHER, 2006). Em estudo de Tadesse, Lommem e Struik (2001), plântulas de batata cultivadas em temperaturas mais elevadas durante a fase de multiplicação apresentaram aumento da área foliar. Tal resposta foi atribuída à interação entre a constituição do meio de cultura, a presença de fitoreguladores e compostos orgânicos, como os

fornecidos pela AC, e o ambiente térmico favorável, que juntos aceleram o metabolismo vegetal, aumentando a eficiência na captação de luz e o rendimento fotossintético.

Embora existam estudos sobre os efeitos do fotoperíodo e da temperatura em condições naturais, ainda há uma carência de pesquisas que abordem esses aspectos no contexto do cultivo *in vitro*, especialmente para a cultura da mandioca (VAZ; FIGUEIREDO-RIBEIRO; KERBAUY, 2004).

Dessa forma, a temperatura deve ser considerada um fator chave no cultivo *in vitro*, devendo ser manejada em conjunto com outros elementos abióticos, a fim de se alcançar o pleno potencial de crescimento da mandioca, especialmente durante a fase de introdução.

2.3. Criopreservação

A criopreservação é uma ferramenta essencial para a conservação *ex situ* de espécies vegetais, sendo fundamental para a preservação da diversidade genética e a segurança alimentar a longo prazo. Essa técnica consiste no armazenamento de material biológico viável em temperaturas ultrabaixas, geralmente em nitrogênio líquido, o que evita alterações celulares e moleculares indesejadas (BENELLI, 2021; ROQUE-BORDA et al., 2021). Espécies como batata, mandioca, batata-doce, entre outras, têm sido objeto de estudos de criopreservação. Destaca-se, por exemplo, a coleção de mandioca do CIAT, que mantém cerca de 2.100 acessos conservados em nitrogênio líquido (BUSTAM et al., 2013; RUTA; LAMBARDI; OZUDOGRU, 2020).

Diversas abordagens têm sido utilizadas na criopreservação vegetal, incluindo desidratação, congelamento programado, vitrificação, vitrificação em gotas (*droplet vitrification*) e o uso de crio-placas. No entanto, essas metodologias enfrentam desafios, como a toxicidade de crioprotetores, especialmente o etilenoglicol (EG) e o dimetilsulfóxido (DMSO), e a variabilidade na tolerância das espécies vegetais aos estresses associados (REED, 2017; BENELLI, 2021; ROQUE-BORDA et al., 2021).

No caso da mandioca, protocolos baseados no uso de ápices caulinares têm se mostrado eficazes e seguros. Esse procedimento envolve a remoção da água livre do explante por meio da aplicação de soluções crioprotetoras, seguida do congelamento dos brotos terminais em nitrogênio líquido (CRUZ-CRUZ et al.,

2013). A recuperação das plantas criopreservadas, geralmente por organogênese direta, inclui o descongelamento, lavagem e cultivo dos tecidos em meios apropriados ao desenvolvimento (LI et al., 1998; MENEGAZZO et al., 2019).

Um dos principais desafios do processo é garantir a recuperação celular após o estresse térmico, reativando adequadamente o metabolismo. O uso de compostos naturais como a AC tem se mostrado uma estratégia promissora nesse contexto, pois fornece nutrientes, reguladores de crescimento e substâncias protetoras às células vegetais (ARDITTI et al., 1990; DAUD et al., 2011; PRABOWO et al., 2018).

A AC é rica em açúcares, aminoácidos, vitaminas e fitoreguladores, atuando como crioprotetor natural. Ela contribui para a redução dos danos provocados por cristais de gelo e estresse oxidativo (BARROS; TONIOLLI, 2011), e tem demonstrado eficácia na proteção de culturas como *Dioscorea alata* e *D. cayenensis* (MURGAS; FRANCISCATTO; SANTOS, 2003; UCHENDU; KELLER, 2016).

Na recuperação de plantas de mandioca, a escolha e a concentração de citocininas são fatores críticos. A cinetina, na concentração de 0,5 mg L⁻¹, tem apresentado bons resultados, mas doses mais elevadas podem causar hiperhidricidade, prejudicando a morfogênese (ESCOBAR; DEBOUCK; ROCA, 2000; MARCO-MEDINA et al., 2010; VOLK; SHEPHERD; BONNART, 2018). Estratégias como a transferência dos brotos para meios suplementados com maiores concentrações de sacarose e carvão ativado ajudam a mitigar esse efeito (ESCOBAR et al., 2014).

O uso da AC também tem sido explorado com sucesso em estudos de recuperação pós-congelação em células animais e espermáticas de peixes, como a piracanjuba, além de meristemas apicais de *Vaccinium corymbosum* (blueberry), orquídeas e *Datura stramonium* (MOLNÁR; VIRÁG; ÖRDÖG, 2011; SINGH, 2020; FIGIEL-KROCZYŃSKA; KRUPA-MAŁKIEWICZ; OCHMIAN, 2022).

Outro aspecto essencial é o ajuste das condições de descongelamento e do meio de recultivo. A retirada de auxinas do meio de recuperação é recomendada para evitar a formação de calos indesejados (BENSON; HARDING, 2012; CHANG; REED, 1999). A temperatura de descongelamento também é um fator determinante, e estudos indicam faixas ideais entre 35°C e 40°C, variando

conforme a espécie (DUMET et al., 2013; TAIZ; ZEIGER, 2016; WANG et al., 2021; RUTA; LAMBARDI; OZUDOGRU, 2020).

O protocolo proposto por YAMAMOTO et al. (2011) destaca-se na criopreservação de mandioca, utilizando vitrificação em gotas (droplet e vitrificação - DV) sobre placas de alumínio com a solução PVS2, considerada altamente eficaz na preservação de ápices caulinares em diversas espécies (SAKAI; ENGELMANN, 2007; THAMMASIRI; SOAMKUL, 2007; ESCOBAR et al., 2014).

Em conclusão, a criopreservação de ápices caulinares da mandioca representa uma estratégia promissora para a conservação *ex situ* do germoplasma vegetal. A incorporação de AC aos meios de recuperação destaca-se por seu potencial em melhorar a sobrevivência e o desenvolvimento das plantas após o descongelamento, fornecendo proteção fisiológica e suporte metabólico essenciais.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELNOUR-ESQUIVEL, A. et al. Cultivo de meristemas, termo y quimioterapia en chayote (*Sechium edule* Jacq. Sw.) para la erradicación del virus del mosaico del chayote (ChMV). In: **Manejo integrado de plagas y agroecología**. Turrialba, Costa Rica: CATIE, 2006. v. 77.

ACEDO, V. Z.; LABANA, C. U. Rapid propagation of released Philippine cassava varieties through tissue culture. **J. Root Crops**, v. 34, n. 2, p. 108-114, 2008.

ADJEBENG-DANQUAH, J. et al. Genetic diversity and population structure analysis of Ghanaian and exotic cassava accessions using simple sequence repeat (SSR) markers. **Heliyon**, v. 6, n. 1, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e03154>

AKTER, S; NASIRUDDIN, K. M.; KHALDUN, A. B. M. Organogenesis of *Dendrobium* orchid using traditional media and organic extracts. **Journal of Agriculture & Rural Development**, [S. l.], v. 5, n. 1, p. 30–35, 2008. DOI: <https://doi.org/10.3329/jard.v5i1.1454>

ALAM, I. et al. Elimination and detection of viruses in meristem-derived plantlets of sweetpotato as a low-cost option toward commercialization. **3 Biotech**, v. 3, p. 153–164, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13205-012-0080-6>

ALAM, M. F. et al. Production of virus free seeds using meristem culture in tomato plant under tropical conditions. **Journal of Plant Biotechnology**, v. 6, n. 4, p. 221-227, 2004.

AL-KHAYRI, J. M. et al. Spinach Tissue Culture Improved with Coconut Water. **HortScience**, v. 27, n. 4, 357-358, 1992. DOI: <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.27.4.357>

ANTONOPOULOU, C. et al. The effect of explant type and nutrient medium on the in vitro proliferation of olive (*Olea europaea* L. 'Chondrolia Chalkidikis'). In: CONGRESSO... **Acta Horticulturae**, n. 949, p. 185-189, 2012. DOI: <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2012.949.25>

ARDITTI, J. et al. The contribution of orchid mycorrhizal fungi to seed germination: a speculative review. **Lindleyana**, v. 5, n. 4, p. 249-255, 1990.

ARDITTI, J. **Micropropagation of Orchids**. Ed. rev. Hoboken: John Wiley & Sons, 2009. 1560 p.

BAGLEY, J. et al. The influence of photosynthetic acclimation to rising CO₂ and warmer temperatures on leaf and canopy photosynthesis models. **Global Biogeochemical Cycles**, v. 29, n. 2, p. 194-206, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1002/2014GB004848>

BALAT, M.; BALAT, H. Recent trends in global production and utilization of bioethanol fuel. **Applied Energy**, v. 86, n. 11, p. 2273-2282, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2009.03.015>

BANERJEE, S. et al. Regeneration of phytoplasma-free *Artemisia roxburghiana* Besser var. *purpurascens* (Jacq.) Hook. plants using apical meristem culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 103, n. 2, p. 189-196, 2010. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s11240-010-9766-9>

BARROS, T. B.; TONIOLLI, R. Uso potencial da água de coco na tecnologia de sêmen. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 35, n. 4, p. 400-407, 2011.

BARRUETO CID, L. P. (Ed.). **Cultivo in vitro de plantas**. 4. ed. Brasília, DF: Embrapa, 2015. 325 p. Disponível em: <http://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/handle/doc/1077494>. Acesso em: 19 abr. 2025.

BENELLI, C. Plant cryopreservation: a look at the present and the future. **Plants**, v. 10, n. 12, p. 2744, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/plants10122744>

BENSON, E. E.; HARDING, K. Cryopreservation of shoot tips and meristems: An overview of contemporary methodologies. In: LOYOLA-VARGAS, V.; OCHOA-ALEJO, N. (ed.). **Plant Cell Culture Protocols**. Totowa: Humana Press, 2012. p. 191-226. (Methods in Molecular Biology, v. 877). DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-61779-818-4_16

BOASE, M.; WRIGHT, S.; MCLEAY, P. Coconut milk enhancement of axillary shoot growth in vitro of kiwifruit. **New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science**, v. 21, n. 2, p. 171-176, 1993. DOI: <https://doi.org/10.1080/01140671.1993.9513764>

BUSTAM, S. et al. Selection of optimal stage for protocorm-like bodies and production of artificial seeds for direct regeneration on different media and short

term storage of *Dendrobium* Shavin White. **Plant Growth Regulation**, v. 69, n. 3, p. 215-224, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10725-012-9763-6>

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

CALVERT, L. A.; THRESH, J. M. The viruses and virus diseases of cassava. In: HILLOCKS, R. J.; THRESH, J. M.; BELLOTTI, A. C. (ed.). **Cassava: Biology, production, and utilization**. Oxon: CAB International, 2002. p. 237-260.

CARDOSO, C. E. L.; GAMEIRO, A. H. Caracterização da cadeia industrial. In: SOUZA, L. da S.; FARIAS, A. R. N.; MATTOS, P. L. P. de; FUKUDA, W. M. G. (Ed.). **Aspectos socioeconômicos e agrônômicos da mandioca**. Cruz das Almas, BA: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2006. p. 19-40.

CARVALHO, M. J. S. et al. Cleaning cassava genotypes infected with cassava frogskin disease via in vitro shoot tip culture. **Genetics and Molecular Research**, [S. l.], v. 16, n. 2, p. 1-8, 2017. DOI: <https://doi.org/10.4238/gmr16029556>

CHANG, Y.; REED, B. M. Extended cold acclimation and recovery medium alteration improve regrowth of *Rubus* shoot tips following cryopreservation. **Cryo-Letters**, Londres, v. 20, n. 6, p. 371-376, 1999.

CHENG, Z. J. et al. Pattern of auxin and cytokinin responses for shoot meristem induction results from the regulation of cytokinin biosynthesis by auxin response factor3. **Plant Physiology**, v. 161, n. 1, p. 240-251, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.112.203166>

ĆOSIĆ, T. et al. In vitro shoot organogenesis and comparative analysis of endogenous phytohormones in kohlrabi (*Brassica oleracea* var. gongylodes): effects of genotype, explant type and applied cytokinins. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 121, n. 3, p. 741-760, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11240-015-0742-2>

COSTA, M. C. et al. In vitro regeneration of shoot segments of *Manihot esculenta* varieties cultivated in northern Brazil. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, v. 15, n. 1, p. 22-26, 2019. DOI: <https://doi.org/10.46526/pccm.2019.v15i1.138>

CRUZ-CRUZ, C. A.; GONZÁLEZ-ARNAO, M. T.; ENGELMANN, F. Biotechnology and conservation of plant biodiversity. **Resources**, v. 2, n. 2, p. 73-95, 2013. DOI: <https://doi.org/10.3390/resources2020073>

DAUD, N. at al. Effects of different organic additives on in vitro shoot regeneration of *Celosia* sp. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 14, n. 9, p. 546-551, May 2011. DOI: <https://doi.org/10.3923/pjbs.2011.546.551>

DUMET, D. et al. Cryopreservation for the 'in perpetuity' conservation of yam and cassava genetic resources. **CryoLetters**, v. 34, n. 2, p. 107-118, 2013.

ENGELMANN, F. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, [s.l.], v. 47, n. 1, p. 5–16, 2011. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s11627-010-9327-2>

EL-SHARKAWY, M. A. Cassava biology and physiology. **Plant Molecular Biology**. v. 56, p. 481–501, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11103-005-2270-7>

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Mandioca**. Disponível em: <https://www.embrapa.br/mandioca-e-fruticultura/cultivos/mandioca>>. Acesso em: 21 out. 2023.

EMBRAPA. **Banco Ativo de Germoplasma de Mandioca da Embrapa Mandioca e Fruticultura (BAG Mandioca CNPMF)**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN), 2025. Disponível em: <https://av.cenargen.embrapa.br/avconsulta/Passaporte/detalhesBanco.do?idb=60>. Acesso em: 5 jun. 2025.

ESCOBAR, R. H.; DEBOUCK, D. G.; ROCA, W. M. Development of cassava cryopreservation. In: ENGELMANN, F.; TAKAGI, H. (ed.). **Cryopreservation of tropical plant germplasm – Current research progress and application**. Tsukuba, Japão: JIRCAS, 2000. p. 222-226.

ESCOBAR, R. H. et al. Using a droplet-vitrification method to partially overcome the recalcitrance of cassava to cryostorage. **International Society for Horticultural Science (ISHS)**, Leuven, Bélgica. 2014. p. 227-232. DOI: <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2014.1039.29>

FAN, C.; MANIVANNAN, A.; WEI, H. Light quality-mediated influence of morphogenesis in micropropagated horticultural crops: A comprehensive overview. **BioMed Research International**, v. 2022, p. 4615079, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1155/2022/4615079>

FAO – ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA A ALIMENTAÇÃO E A AGRICULTURA. **Base de dados FAOSTAT**. Roma: FAO, 2025. Disponível em: <http://faostat.fao.org/site/291/default.aspx>. Acesso em: 28 mar. 2025.

FIGIEL-KROCZYŃSKA, M.; KRUPA-MAŁKIEWICZ, M.; OCHMIAN, I. Effect of Actisil (Hydroplus™), organic supplements, and pH of the medium on the micropropagation of *Vaccinium corymbosum*. **Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus**, v. 21, n. 5, p. 25-37, 2022. DOI: <https://doi.org/10.24326/asphc.2022.5.3>

FLORA DO BRASIL 2023. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB17591>>. Acesso em: 29 out. 2023.

FREITAS, C. H. D.; MARTINS, F. B.; ABREU, M. C. Cardinal temperatures for the leaf development of *Corymbia citriodora* and *Eucalyptus urophylla* seedlings.

Pesquisa Agropecuária Brasileira, v. 52, n. 5, 2017. DOI:
<https://doi.org/10.1590/S0100-204X2017000500001>

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

GABRIEL, L. F. et al. Mudança climática e seus efeitos na cultura da mandioca. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 18, n. 1, p. 90-98, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1415-43662014000100012>

GALON, L. et al. Influência dos fatores abióticos na produtividade da cultura do milho. **Revista Tropica-Ciências Agrárias e Biológicas**, v. 4, n. 3, p. 18, 2010. DOI: <https://doi.org/10.0000/rtcab.v4i3.307>

GANSAU, J. A. et al. Effects of organic additives and plant growth regulators on protocorm development of *Dendrobium lowii*. **Transactions on Science and Technology**, v. 3, n. 3, p. 462-468, 2016.

GARCÍA-GONZÁLEZ, R. et al. Plant tissue culture: Current status, opportunities and challenges. **Ciencia e Investigación Agraria**, Santiago, v. 37, n. 3, p. 5-30, 2010. DOI: <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-16202010000300001>

GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; DE KLERK, G. **Plant propagation by tissue culture**: volume 1. the background. Dordrecht: Springer, 2007. 502 p. DOI: <https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5005-3>

GNASEKARAN, P. et al. A study on the use of organic additives on the protocorm-like bodies (PLBs) growth of *Phalaenopsis violacea* orchid. **Journal of Phytology**, v. 2, n. 1, p. 29-33, 2010.

GOLLE, D. P. et al. Estabelecimento e desenvolvimento in vitro de *Eugenia involucrata* DC.: influência do tipo de explante e do meio nutritivo. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 22, n. 1, p. 207-214, 2012. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/cflo/a/43D3rkZLRYrzvdLbnDTksqz/?format=pdf&lang=pt>. Acesso: 06 de nov. 2024.

GREER, D. H. Photon flux density and temperature-dependent responses of photosynthesis and photosystem II performance of apple leaves grown in field conditions. **Functional Plant Biology**, v. 42, n. 8, p. 782-791, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1071/fp15068>

HARTATI, S. et al. Effects of organic additives and naphthalene acetid acid (NAA) application on the in vitro growth of Black orchid hybrid (*Coelogyne pandurata* Lindley). **Bulgarian Journal of Agricultural Science**, v. 23, n. 6, p. 951-957, 2017.

HASMAYAPUTRA, H.; ASNAWATI; ARIFIN, N. Effect of coconut water and BAP concentration on the induction of Cavendish banana shoots in vitro. **Brazilian**

Journal of Development, Curitiba, v. 10, n. 12, p. 1-12, 2024. DOI: <https://doi.org/10.34117/bjdv10n12-044>

HESAMI, M. et al. Effect of explant source on phenotypic changes of in vitro grown *Cannabis* plantlets over multiple subcultures. **Biology**, v. 12, n. 3, p. 443, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/biology12030443>

HNATUSZKO-KONKA, K. et al. Cytokinin signaling and de novo shoot organogenesis. **Genes**, Basel, v. 12, n. 2, 265, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/genes12020265>

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção de Mandioca**. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/mandioca/br>. Acesso: 01 de nov. 2023.

IKEUCHI, M. et al. Plant regeneration: cellular origins and molecular mechanisms. **Development**, Cambridge, v. 143, n. 9, p. 1442-1451, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1242/dev.134668>

IKEUCHI, M.; RYMEN, B.; SUGIMOTO, K. How do plants transduce wound signals to induce tissue repair and organ regeneration? **Current Opinion in Plant Biology**, v. 57, p. 72–77, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2020.06.007>

ISAH, T. Nodal segment explant type and preconditioning influence in vitro shoot morphogenesis in *Ginkgo biloba* L. **Plant Physiology Reports**, v. 25, n. 1, p. 74-86, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s40502-019-00475-7>

JARDIM BOTÂNICO DO RIO DE JANEIRO. **Manihot in flora e funga do brasil**. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2020. Disponível em: <https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB17600>. Acesso em: 7 abr. 2023.

JENNINGS, D. L.; IGLESIAS, C. Breeding for crop improvement. In: **Cassava: Biology, production and utilization**. Wallingford UK: CABI, 2001. p. 149-166. DOI: <https://doi.org/10.1079/9780851995243.0149>

KHATUN, M.; ROY, P.; RAZZAK, M. A. Additive effect of coconut water with various hormones on in vitro regeneration of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). **Journal of Animal and Plant Sciences**, v. 28, n. 2, p. 589-596, 2018.

KIEBER, J. J.; SCHALLER, G. E. Cytokinin signaling in plant development. **Development**, Cambridge, v. 145, n. 4, dev149344, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1242/dev.149344>

KRISHNA, T. P. A. et al. The era of plant breeding: conventional breeding to genomics-assisted breeding for crop improvement. **Current Genomics**, v. 24, n. 1, p. 24-35, 2023. DOI: <https://doi.org/10.2174/1389202924666230517115912>

LAKSHMANAN, P. et al. Auxin, cytokinin and ethylene differentially regulate specific developmental states associated with shoot bud morphogenesis in leaf tissues of mangosteen (*Garcinia mangostana* L.) cultured in vitro. **Plant and Cell**

Physiology, Oxford, v. 38, n. 1, p. 59-64, 1997. DOI:
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a029085>

LAMBOLEZ, A. et al. Warm temperature promotes shoot regeneration in *Arabidopsis thaliana*. **Plant and Cell Physiology**, v. 63, n. 5, p. 618-634, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1093/pcp/pcac017>

LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. São Carlos, SP: Rima, 2006. 531 p.

LÉOTARD, G. et al. Phylogeography and the origin of cassava: New insights from the northern rim of the Amazonian basin. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 53, n. 1, p. 329-334, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2009.05.003>

LI, H. Q. et al. Regeneration of cassava plants via shoot organogenesis. **Plant Cell Reports**, v. 17, p. 410-414, 1998. DOI: <https://doi.org/10.1007/s002990050416>

LIMA NETO, M. C. et al. *Jatropha curcas* and *Ricinus communis* display contrasting photosynthetic mechanisms in response to environmental conditions. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 72, n. 3, p. 260-269, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1590/0103-9016-2014-0325>

MACHADO, W.; ZAMARIAN, A. Polpa de banana, água de coco e carvão ativado no desenvolvimento in vitro de *Lycaste* sp. . **Ensaio e Ciência: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde**, v. 24, n. 2, p. 159–163, 2020. DOI: <https://doi.org/10.17921/1415-6938.2020v24n2p159-163>

MACIA, R. J. et al. Osmotic Regulators in the In Vitro Conservation of Cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Revista RG News**, v. 11, n. 1, p. 15-17, 2025.

MADDOCK, S. E. et al. Plant regeneration from cultured immature embryos and inflorescences of 25 cultivars of wheat (*Triticum aestivum*). *Journal of Experimental Botany*, [S. l.], v. 34, n. 7, p. 915-926, 1983. DOI: <https://doi.org/10.1093/jxb/34.7.915>

MARCO-MEDINA, A. et al. Cryopreservation of *Thymus moroderi* by Droplet Vitrification. **Cryoletters**, v. 31, n. 1, p. 14-23, 2010.

MARTINI, A. N.; VLACHOU, G.; PAPAFOITIOU, M. Effect of explant origin and medium plant growth regulators on in vitro shoot proliferation and rooting of *Salvia tomentosa*, a native sage of the Northeastern Mediterranean Basin. **Agronomy**, v. 12, n. 8, p. 1889, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/agronomy12081889>

MATHIAS, R. J.; SIMPSON, E. S. The interaction of genotype and culture medium on the tissue culture responses of wheat (*Triticum aestivum* L. em. thell) callus. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 7, p. 31–37, 1986. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00043918>

MAZID, M. A.; KHAN, T. A.; MOHAMMAD, F. Cytokinins, A classical multifaceted hormone in plant system. **Journal of Stress Physiology & Biochemistry**, v. 7, n. 4, p. 347-368, 2011.

MEHBUB, H. et al. Tissue culture in ornamentals: Cultivation factors, propagation techniques, and its application. **Plants**, v. 11, n. 23, p. 3208, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/plants11233208>

MENEGAZZO, R. F. et al. In vitro multiplication of cassava varieties. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, v. 22, n. 4, 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.25110/arqvet.v22i4.2019.7618>

MOELIONO, T. P.; SOETOPRAWIRO, K. Is Cassava the Next Magic Solution to World Hunger and Energy Crisis? The Indonesian Experience. In: DR. ANDRI, F. (Ed.). **Cassava - Recent Updates on Food, Feed and Industry**. Frediansyah, Andri ed. Rijeka: IntechOpen, 2023. p. 1-20. Doi: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.109834>

MOLNÁR, Z.; VIRÁG, E.; ÖRDÖG, V. Natural substances in tissue culture media of higher plants. **Acta Biologica Szegediensis**, v. 55, n. 1, p. 123-127, 2011.

MONTHONY, A. S. et al. Recalcitrance of *Cannabis sativa* to de novo regeneration; a multi-genotype replication study. **PloS one**, v. 16, n. 8, p. e0235525, 2021b. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0235525>

MORAIS, L. A. S. D. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. **Horticultura Brasileira**, v. 27, n. 2, p. S4050-4063, 2009.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>

MURGAS, L. D. S.; FRANCISCATTO, R. T.; SANTOS, A. G. O. Avaliação espermática pós-descongelamento em piraicanjuba (*Brycon orbignyanus*, Valenciennes, 1849). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, n. 6, p. 1810-1814, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1516-35982003000800002>

MWANGANGI, M. et al. Elimination of cassava brown streak virus from infected cassava. **Journal of Biology, Agriculture and Healthcare**, v. 4, n. 13, p. 34-40, 2014.

NAMBIAR, N.; TEE, C. S.; MAZIAH, M. Effects of organic additives and different carbohydrate sources on proliferation of protocormlike bodies in *Dendrobium Alya* Pink. **Plant Omics**, v. 5, n. 1, p. 10-18, 2012.

NASIB, A.; ALI, K.; KHAN, S. An optimized and improved method for the in vitro propagation of kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) using coconut water. **Pakistan Journal of Botany**, v. 40, n. 6, p. 2355-2360, 2008.

NASSAR, N. M. A. Cytogenetics and evolution of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Genetics and Molecular Biology**, v. 23, n. 4, p. 1003-1014, 2000. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1415-47572000000400046>

NASSAR, N. M. A.; ORTIZ, R. Cassava genetic resources: manipulation for crop improvement. In: JANICK, J. (ed.). **Plant Breeding Reviews**. John Wiley & Sons, 2009. v. 31, p. 247-275. DOI: <https://doi.org/10.1002/9780470593783.ch5>

NGUYEN, Q. T. et al. Tissue culture and associated biotechnological interventions for the improvement of coconut (*Cocos nucifera* L.): a review. **Planta**, Heidelberg, v. 242, n. 5, p. 1059-1076, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00425-015-2362-9>

NJOKU, D. N. et al. Parent-offspring regression analysis for total carotenoids and some agronomic traits in cassava. **Euphytica**, v. 206, n. 3, p. 657-666, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10681-015-1482-4>

NUNES, C. E. et al. Physico-chemical profiling of edible or sweet cassava (*Manihot esculenta* Crantz) starches from Brazilian germplasm. **Food Bioscience**, v. 43, p. 101305, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.101305>

NUNES, R. C. A.; VIANA, R. S.; MACHADO NETO, N. B. Atividade enzimática da superóxido dismutase em resposta aos fitorreguladores em *Gerbera jamensonii*. **Comunicata Scientiae**, v. 6, n. 1, p. 83-89, 2015. DOI: <https://doi.org/10.14295/cs.v6i1.443>

OLIVEIRA, R. P. D.; GOMES, T. D. S.; VILARINHOS, A. D. Avaliação de um sistema de micropropagação massal de variedades de mandioca. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, n. 12, p. 2329–2334, 2000. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2000001200002>

de OLIVEIRA, S. A. S. et al. First report of cassava torrado-like virus, cassava polero-like virus and cassava new alphaflexivirus associated with cassava frogskin disease in Brazil. **Journal of Plant Pathology**, v. 102, p. 247-247, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s42161-019-00384-6>

OLSEN, K. M.; SCHAAL, B. A. Microsatellite variation in cassava (*Manihot esculenta*, Euphorbiaceae) and its wild relatives: further evidence for a southern Amazonian origin of domestication. **American journal of botany**, v. 88, n. 1, p. 131-142, 2001.

OLSEN, K. M. SNPs, SSRs and inferences on cassava's origin. **Plant Molecular Biology**, v. 56, n. 4, p. 517-526, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11103-004-5043-9>

OPABODE, J. T. et al. Isolation of genomic clones encoding granule-bound starch synthase (GBSS I) in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Journal of Plant Sciences**, v. 6, n. 4, p. 174-181, 2011. DOI: <https://doi.org/10.3923/jps.2011.174.181>

OTOO, J. A. **Rapid multiplication of cassava**. IITA Research Guide, v. 51. 1996. Disponível em: http://www.iita.org/cms/details/trn_mat/irg51/irg51.htm. Acesso: 06 de nov. 2024.

OUÉDRAOGO, W. I. C. et al. Effect of thermotherapy on meristem culture response of two local cassava (*Manihot esculenta* Crantz) cultivars from Burkina Faso. **Discover Plants**, v. 2, n. 1, 2025. DOI: <https://doi.org/10.1007/s44372-025-00158-8>.

PANIS, B.; NAGEL, M.; VAN DEN HOUWE, E. Challenges and prospects for the conservation of crop genetic resources in field genebanks, in vitro collections and/or in liquid nitrogen. **Plants**, v. 9, n. 12, p. 1634, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/plants9121634>

PARMAR, A.; STURM, B.; HENSEL, O. Crops that feed the world: Production and improvement of cassava for food, feed, and industrial uses. **Food Security**, v. 9, p. 907-927, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12571-017-0717-8>

PARMESSUR, Y. et al. Sugarcane yellow leaf virus and sugarcane yellows phytoplasma: elimination by tissue culture. **Plant Pathology**, v. 51, n. 5, p. 561-566, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.2002.00747.x>

PEREIRA, W. E.; SIQUEIRA, D. L. **Planejamento e implantação de pomar**. 2 ed. Aprenda Fácil, 2018. 187 p.

PIERIK, R. L. M. **In vitro culture of higher plants**. Springer Science & Business Media, 1997. 348 p.

PILON, J.; SANTAMARÍA, L. Clonal variation in the thermal response of the submerged aquatic macrophyte *Potamogeton pectinatus*. **Journal of Ecology**, v. 90, n. 1, p. 141-152, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.0022-0477.2001.00645.x>

PRABOWO, H. et al. Effects of media combination with concentration of ab-mix nutrient on growth of banana shoots on in vitro. **Bulgarian Journal of Agricultural Science**, v. 24, n. 3, p. 404-410, 2018.

PRADES, A. et al. Coconut water uses, composition and properties: a review. **Fruits**, v. 67, n. 2, p. 87-107, 2012. DOI: <http://dx.doi.org/10.1051/fruits/2012002>

PRAKASH, S.; HOQUE, M. I.; BRINKS, T. Culture media and containers. In: **Low cost options for tissue culture technology in developing countries**. Viena: IAEA, 2004. p. 29-40. Disponível em: https://www-pub.iaea.org/MTCD/Publications/PDF/te_1384_web.pdf. Acesso: 06 de nov. 2024.

REED, B. M. Plant cryopreservation: a continuing requirement for food and ecosystem security. **In vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 53, n. 4, p. 285-288, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11627-017-9851-4>

ROCA, W. M. et al. Eliminação de vírus e propagação de clones em mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). In: ROCA, W. M.; MROGINSKI, L. A. (org.). **Cultura**

de tecidos na agricultura: fundamentos e aplicações. Cali, CO: CIAT, 1991. p. 403–420.

ROCA, W. M.; ARIAS, D. I.; CHAVÉZ, R. Métodos de conservação in vitro de germoplasma. In: ROCA, W. M.; MROGINSKI, L. A. (ed.). **Cultura de tecidos na agricultura:** fundamentos e aplicações. Cali, CO: CIAT, 1991. p. 697-713.

RONGSIRIKUL, O. et al. Reconstruction of starch biosynthesis pathway in cassava using comparative genomic approach. In: CHAN, J. H. et al. (ed.). **Computational systems-biology and bioinformatics.** Berlin; Heidelberg: Springer, 2010. v. 115, p. 118-129. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-642-16750-8_11

ROQUE-BORDA, C. A. et al. Cryopreservation of agronomic plant germplasm using vitrification-based methods: An overview of selected case studies. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 22, n. 11, p. 6157, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms22116157>

ROY, J.; BANERJEE, N. Rhizome and shoot development during in vitro propagation of *Geodorum densiflorum* (Lam.) Schltr. **Scientia Horticulturae**, v. 94, n. 1-2, p. 181-192, 2002. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0304-4238\(01\)00373-9](https://doi.org/10.1016/S0304-4238(01)00373-9)

RUTA, C.; LAMBARDI, M.; OZUDOGRU, E. A. Biobanking of vegetable genetic resources by in vitro conservation and cryopreservation. **Biodiversity and Conservation**, v. 29, n. 13, p. 3495-3532, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10531-020-02051-0>

SÁ, J. F. de et al. Culture media for the multiplication of wild *Manihot* species. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 42, n. 6, p. 598-607, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1590/1413-70542018426024718>

SAAD, A. I. M.; ELSHAHED, A. M. Plant tissue culture media. In: Leva, A.; RINALDI, L. (Ed.). **Recent advances in plant in vitro culture.** Rijeka: IntechOpen, 2012. p. 29-40. DOI: <http://dx.doi.org/10.5772/50569>

SAKAI, A.; ENGELMANN, F. Vitrification, encapsulation-vitrification and droplet-vitrification: a review. **Cryo Letters**, v. 28, n. 3, p. 151-172, 2007.

SALISBURY, F. B.; ROSS, C. W. **Plant Physiology.** 4 ed. Belmont, California: Wadsworth Publishing Company, 1991. 682 p.

SANANDA, M. et al. Effect of coconut water and ascorbic acid on shoot regeneration in banana variety Dwarf Cavendish. **The Asian Journal of Horticulture**, v. 7, n. 2, p. 416-419, 2012.

SANTOSO, U. et al. Nutrient composition of kopyor coconuts (*Cocos nucifera* L.). **Food Chemistry**, v. 57, n. 2, p. 299-304, 1996. DOI: [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(95\)00237-5](https://doi.org/10.1016/0308-8146(95)00237-5)

SIEF-ELDEIN, A. G. M. An efficient in vitro propagation protocol for cassava (*Manihot esculenta* Crantz): enhancing shoot multiplication through successive

subcultures. **Egyptian Journal of Desert Research**, v. 74, n. 2, p. 529-542, 2024
DOI: <https://doi.org/10.21608/ejdr.2025.346999.1195>

SILVA, H. A. da; MURRIETA, R. S. S. Mandioca, a rainha do Brasil? Ascensão e queda da *Manihot esculenta* no estado de São Paulo. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi. Ciências Humanas**, Belém, v. 9, n. 1, p. 37–60, 2014.
DOI: <https://doi.org/10.1590/S1981-81222014000100004>

SIMPSON, M. G. 8 - Diversity and classification of flowering plants: eudicots. In: SIMPSON, M. G. (Ed.). **Plant Systematics**. 3 ed.: Academic Press, 2019. p. 285-466.

SINGH, A. **The effect of natural organic extracts on the in vitro growth of plants**. 2020. Disponível em: <https://www.plantcelltechnology.com/blog/the-effect-of-natural-organic-extracts-on-the-in-vitro-growth-of-plants/>. Acesso em: 12/07/2023.

SKOOG, F.; MILLER, C. O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. **Symposia of the Society for Experimental Biology**, v. 11, p. 118-130, 1957.

SKYLAR, A. et al. Metabolic sugar signal promotes *Arabidopsis* meristematic proliferation via G2. **Developmental Biology**, v. 351, n. 1, p. 82–89, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2010.12.019>

SOUZA, A. da S.; JUNGHANS, T. G.; FUKUDA, W. M. G. Técnicas e aplicações da cultura de tecidos em mandioca. In: CEREDA, M. P. (coord.). **Agricultura: tuberosas amiláceas Latino Americanas**. 1. ed. São Paulo: Fundação Cargill, 2002. v. 2, p. 118-178. (Série Culturas de Tuberosas Amiláceas Latino Americanas).

SOUZA, A. da S. et al. Cultura de tecidos em mandioca: técnicas e aplicações. In: SOUZA, L. da S.; FARIAS, A. R. N.; MATTOS, P. L. P de; FUKUDA, W. M. G. (Eds.). **Aspectos socioeconômicos e agronômicos da mandioca**. Cruz das Almas - BA: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2006a. p. 364-432.

SOUZA, A. da S. et al. **Micropropagação da mandioca mediante ápices caulinares e segmentos nodais**. Cruz das Almas, BA: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2008. 12 p. (Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical. Circular Técnica, 88).

SOUZA, C. A. et al. Influência do ácido giberélico sobre a arquitetura de plantas de feijão no início de desenvolvimento. **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v. 32, n. 2, p. 325–332, 2010. DOI: <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v32i2.3721>

SOUZA, F. V. D. et al. Micropropagação. In: SOUZA, A. da S.; JUNGHANS, T. G. (Eds.). **Introdução à micropropagação de plantas**. Cruz das Almas - BA: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2006b. p. 38-52.

SOUZA, J. M.; BERKOV, S.; SANTOS, A. S. Improvement of friable callus production of *Boerhaavia paniculata* Rich and the investigation of its lipid profile by GC/MS. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 86, n. 3, p. 1015-1027, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1590/0001-3765201420130098>

SOUZA, R. A. V. E. et al. Effect of coconut water on growth of olive embryos cultured in vitro. **Ciência Rural**, v. 43, n. 2, p. 290-296, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0103-84782013000200016>

TADESSE, M. et al. Development of leaf area and leaf number of micropropagated potato plants. **NJAS - Wageningen Journal of Life Sciences**, v. 49, n. 1, p. 15-32, 2001. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1573-5214\(01\)80013-0](https://doi.org/10.1016/S1573-5214(01)80013-0)

TADESSE, M.; LOMMEN, W.J.M.; STRUIK, P.C. Development of micropropagated potato plants over three phases of growth as affected by temperature in different phases. **NJAS - Wageningen Journal of Life Sciences**, v. 49, n. 1, p. 53-66, 2001. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1573-5214\(01\)80015-4](https://doi.org/10.1016/S1573-5214(01)80015-4)

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2016.

TAMAKI, H. et al. Identification of novel meristem factors involved in shoot regeneration through the analysis of temperature-sensitive mutants of *Arabidopsis*. **The Plant Journal**, v. 57, n. 6, p. 1027–1039, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03750.x>

SAN PEDRO, T. et al. Somatic embryogenesis from seeds in a broad range of *Vitis vinifera* L. varieties: rescue of true-to-type virus-free plants. **BMC Plant Biology**, London, v. 17, n. 1, 226, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12870-017-1159-3>

THAMMASIRI, K.; SOAMKUL, L. Cryopreservation of *Vanda coerulea* Griff. ex Lindl. seeds by vitrification. **ScienceAsia**, Bangkok, v. 33, n. 2, p. 223-227, 2007. DOI: <https://doi.org/10.2306/scienceasia1513-1874.2007.33.223>

UCHENDU, E. E.; KELLER, E. R. J. Melatonin-loaded alginate beads improve cryopreservation of yam (*Dioscorea alata* and *D. cayenensis*). **Cryo Letters**, v. 37, n. 2, p. 77–87, 2016.

UNITED NATIONS. **Transforming our world: the 2030 agenda for sustainable development**. New York: United Nations, 2015. Disponível em: <https://sdgs.un.org/2030agenda>. Acesso em: 18 mai. 2025.

UNITED NATIONS. **Sustainable development goals – United Nations**. New York: United Nations, 2023. Disponível em: <https://sdgs.un.org/goals>. Acesso em: 18 mai. 2025.

VAN OVERBEEK, J.; CONKLIN, E.; BLAKESLEE, A. F. Factors in coconut milk essential for growth and development of very young *Datura* embryos. **Science**, v. 94, n. 2441, p. 350-351, 1941. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.94.2441.350>

VAZ, A. P.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R. C. L.; KERBAUY, G. B. Photoperiod and temperature effects on in vitro growth and flowering of *P. pusilla*, an epiphytic orchid. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 42, n. 5, p. 411-415, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2004.03.008>

VOLK, G. M.; SHEPHERD, A. N.; BONNART, R. Successful cryopreservation of *Vitis* shoot tips: novel pre-treatment combinations applied to nine species. **Cryo Letters**, v. 39, n. 5, p. 322-330, 2018.

WANG, G.; ZHANG, G.; WU, M. CLE peptide signaling and crosstalk with phytohormones and environmental stimuli. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, p. 1211, 2016. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01211>

WANG, M. R. et al. Advances in cryopreservation of in vitro-derived propagules: technologies and explant sources. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 144, n. 1, p. 7-20, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11240-020-01770-0>

WANG, Q.; VALKONEN, J. P. Cryotherapy of shoot tips: novel pathogen eradication method. **Trends in Plant Science**, v. 14, n. 3, p. 119-122, mar. 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2008.11.010>

WANG, Q. C.; VALKONEN, J. P. T. Efficient elimination of sweetpotato little leaf phytoplasma from sweetpotato by cryotherapy of shoot tips. **Plant Pathology**, v. 57, n. 2, p. 338-347, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2007.01710.x>

YAHYAUI, E. et al. Is it possible to produce certified hazelnut plant material in sicily? identification and recovery of nebrodi genetic resources, in vitro establishment, and innovative sanitation technique from Apple Mosaic Virus. **Frontiers in Plant Science**, v. 12, p. 778142, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.778142>

YAMAMOTO, S. et al. Development of a cryopreservation procedure using aluminium cryo-plates. **Cryo Letters**, v. 32, n. 3, p. 256–265, 2011.

YAMASHITA, O. M. et al. Fatores ambientais sobre a germinação de *Emilia sonchifolia*. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 27, n. 4, p. 673–681, out./dez. 2009. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-83582009000400005>

YONG, J. W. H. et al. The chemical composition and biological properties of coconut (*Cocos nucifera* L.) water. **Molecules**, Basel, v. 14, n. 12, p. 5144-5164, 2009. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules14125144>

CAPÍTULO 1

Potencial morfogênico de genótipos de mandioca suplementados com água de coco sob diferentes regimes de temperatura

¹Capítulo submetido a revista: In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant

Potencial morfogênico de genótipos de mandioca suplementados com água de coco sob diferentes regimes de temperatura

RESUMO

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é uma cultura essencial para a segurança alimentar nos trópicos, com ampla importância socioeconômica e aplicações industriais. A cultura de tecidos representa uma ferramenta estratégica para a propagação e conservação de genótipos superiores, embora sua eficiência seja limitada pela variabilidade genotípica e pela dependência de protocolos específicos. Este estudo teve como objetivo avaliar o potencial morfogênico de ápices caulinares de 10 genótipos de mandioca em meios de cultura MS suplementados com diferentes concentrações de água de coco (AC) e submetidos a diferentes regimes de temperatura. Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado, em arranjos fatoriais 10×5, sendo 10 genótipos, cinco concentrações de AC, 0%, 5%, 10%, 15% e 20%; e 5 regimes de temperatura de incubação, 27, 29, 31, 33 e 35 °C, totalizando 500 unidades experimentais em cada experimento. A análise estatística incluiu testes de normalidade, homogeneidade, qui-quadrado, Kruskal-Wallis, Dunn e análise de componentes principais. Os resultados indicaram que o meio suplementado com 10% de AC proporcionou os melhores índices de desenvolvimento dos ápices, com destaque para altura das brotações, número médio de microestaca e massa fresca da parte aérea. Em relação à temperatura, observou-se melhor desenvolvimento morfogênico entre 31 °C e 35 °C. A análise de componentes principais revelou uma clara distinção entre os genótipos de mandioca com base nas variáveis morfofisiológicas avaliadas *in vitro*. Conclui-se que a adição de 10% de AC ao meio de cultura, combinada com incubação a 33 °C, favorece significativamente a morfogênese *in vitro* de ápices caulinares de mandioca, sendo uma alternativa viável e econômica para protocolos de micropropagação da cultura. Esses resultados reforçam que a resposta ao cultivo *in vitro* está fortemente dependente do genótipo, sendo que a escolha de materiais mais responsivos pode otimizar protocolos de propagação e acelerar os ciclos de multiplicação clonal.

Palavras-chave: Ápice caulinar, cultivo *in vitro*, estabelecimento, *Manihot esculenta* Crantz, regeneração.

Morphogenic potential of cassava genotypes supplemented with coconut water under different temperature regimes

ABSTRACT

Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) is an essential crop for food security in tropical regions, with broad socioeconomic importance and industrial applications. Tissue culture represents a strategic tool for the propagation and conservation of elite genotypes, although its efficiency is limited by genotypic variability and the need for genotype-specific protocols. This study aimed to evaluate the morphogenic potential of shoot apices from 10 cassava genotypes cultured in MS medium supplemented with different concentrations of coconut water and subjected to varying temperature regimes. The experiments followed a completely randomized design in a 10×5 factorial arrangement: 10 genotypes, 5 coconut water concentrations (0%, 5%, 10%, 15%, and 20%), and 5 incubation temperatures (27, 29, 31, 33, and 35 °C), totaling 500 experimental units per experiment. Statistical analyses included tests for normality and homogeneity, chi-square test, Kruskal-Wallis, Dunn's post hoc test, and principal component analysis (PCA). Results showed that medium supplemented with 10% coconut water yielded the best apex development indices, particularly shoot height, average number of microcuttings, and shoot fresh mass. Regarding temperature, enhanced morphogenic responses were observed between 31 °C and 35 °C. PCA revealed a clear distinction among cassava genotypes based on *in vitro* morphophysiological traits. It is concluded that supplementing the culture medium with 10% coconut water, combined with incubation at 33 °C, significantly promotes *in vitro* morphogenesis of cassava shoot apices, presenting a viable and cost-effective alternative for micropropagation protocols. These findings reinforce that *in vitro* responses are highly genotype-dependent, and selecting more responsive genotypes may optimize propagation protocols and accelerate clonal multiplication cycles.

Keywords: Establishment, in vitro culture, *Manihot esculenta* Crantz, regeneration, shoot tip.

1. INTRODUÇÃO

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é uma das culturas alimentares mais relevantes nas regiões tropicais, desempenhando papel central na segurança alimentar e na economia de diversos países da América Latina, África e Ásia (MBANJO *et al.*, 2021). Nos países em desenvolvimento, ocupa a quarta posição entre as principais culturas alimentares, sendo superada apenas por arroz, trigo e milho. Suas raízes tuberosas são também uma das principais fontes de amido comercial, posicionando-se como a segunda maior fonte global, atrás apenas do milho (NARMILAN; PUVANITHA, 2020).

Além de sua importância como alimento, a mandioca possui múltiplas aplicações industriais, sendo utilizada na produção de amido, bioetanol, rações, medicamentos, cosméticos e biopolímeros (LI *et al.*, 2017). Aproximadamente 80% do peso seco das raízes é composto por amido, um biopolímero natural amplamente explorado na produção de bioetanol, bioplásticos, dextrina, glicose, frutose, ácido láctico e fermento (PARMAR *et al.*, 2017). Suas propriedades renováveis, biodegradáveis e de baixo custo tornam o amido de mandioca um insumo estratégico para a indústria (ADEWALE *et al.*, 2022).

No Brasil, a mandioca se destaca por sua ampla adaptabilidade edafoclimática e por fornecer alimento e renda a pequenos agricultores (FAO, 2021). Sua resiliência a condições adversas, como longos períodos de seca e solos de baixa fertilidade, torna-a uma cultura promissora frente às mudanças climáticas (EL-SHARKAWY, 2004; TOKUNAGA *et al.*, 2019). Diante disso, instituições como a FAO e o IITA têm estimulado o desenvolvimento de pesquisas voltadas ao melhoramento genético da mandioca, com foco em produtividade, tolerância a estresses e resistência a pragas e doenças que acometem a cultura (FAO, 2021).

Nesse contexto, a cultura de tecidos vegetais surge como uma ferramenta estratégica para a propagação clonal e apoio a programas de melhoramento e conservação de germoplasma (MAPAYI *et al.*, 2013). Contudo, apesar de seu potencial, a eficiência dessa técnica na cultura da mandioca, é frequentemente limitada por desafios relacionados à necessidade de protocolos específicos para cada cultivar (OLIVEIRA; GOMES; VILARINHOS, 2000). A forte dependência genótipo-específica dificulta a padronização e requer protocolos personalizados.

A morfogênese *in vitro*, um dos pilares da cultura de tecidos, é fortemente influenciada pela composição do meio de cultura e pela interação entre reguladores

vegetais, como citocininas, auxinas e giberelinas (SANTOS *et al.*, 2020). O equilíbrio entre esses compostos regula processos como divisão celular, diferenciação e organogênese. Além dos reguladores, outros componentes do meio de cultura, como nutrientes, aminoácidos e aditivos orgânicos, associados com as condições de incubação como luminosidade, temperatura, dentre outros, influenciam diretamente o desenvolvimento morfogênico (NEELAKANDAN; WANG, 2012; KIEBER; SCHALLER, 2018).

Dentre os aditivos orgânicos, a água de coco (AC) se destaca como um suplemento natural eficaz, por conter proteínas, aminoácidos, açúcares, ácidos orgânicos, sais minerais, vitaminas do complexo B e C, e fitormônios, especialmente citocininas (PRAKASH *et al.*, 2004; AKTER *et al.*, 2007; YONG *et al.*, 2009; PRADES *et al.*, 2012; SOUZA *et al.*, 2013). Sua eficácia na promoção da morfogênese já foi comprovada em diversas culturas, como maracujá (TREVISAN *et al.*, 2005), oliveira (PEIXE *et al.*, 2007; SOUZA *et al.*, 2013), kiwi (NASIB *et al.*, 2008), orquídeas (UTAMI; HARIYANTO, 2020) e citros (MURUGAN *et al.*, 2023), embora ainda existam poucos estudos sobre sua aplicação na cultura da mandioca.

Paralelamente, fatores físicos como a temperatura de incubação também exercem influência crítica no desenvolvimento morfogênico. A temperatura afeta a permeabilidade das membranas celulares, influenciando a absorção de nutrientes e a fluidez celular (GABRIEL *et al.*, 2014). Para a mandioca, temperaturas entre 25 °C e 27 °C são geralmente consideradas ideais para o crescimento morfológico, embora a espécie tolere variações entre 18 °C e 35 °C (JARVIS *et al.*, 2012).

Dessa forma, a combinação entre suplementação com AC e o controle preciso da temperatura de incubação pode representar uma estratégia viável e econômica para otimizar a regeneração *in vitro* da mandioca.

Este estudo teve como objetivo avaliar o potencial morfogênico de genótipos de mandioca cultivados em meio 4E suplementado com diferentes concentrações de AC, sob distintos regimes de temperatura, visando identificar condições que favoreçam a resposta morfogênica e que possam ser aplicadas em protocolos eficientes e de baixo custo para micropropagação da espécie.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos do Núcleo de Biologia Avançada da Embrapa Mandioca e Fruticultura, localizado

em Cruz das Almas, Bahia. Os explantes utilizados foram obtidos a partir de brotações de manivas provenientes do Banco Ativo de Germoplasma de Mandioca (BAG) da Embrapa Mandioca e Fruticultura.

2.1. Estabelecimento *in vitro* de ápices caulinares de mandioca

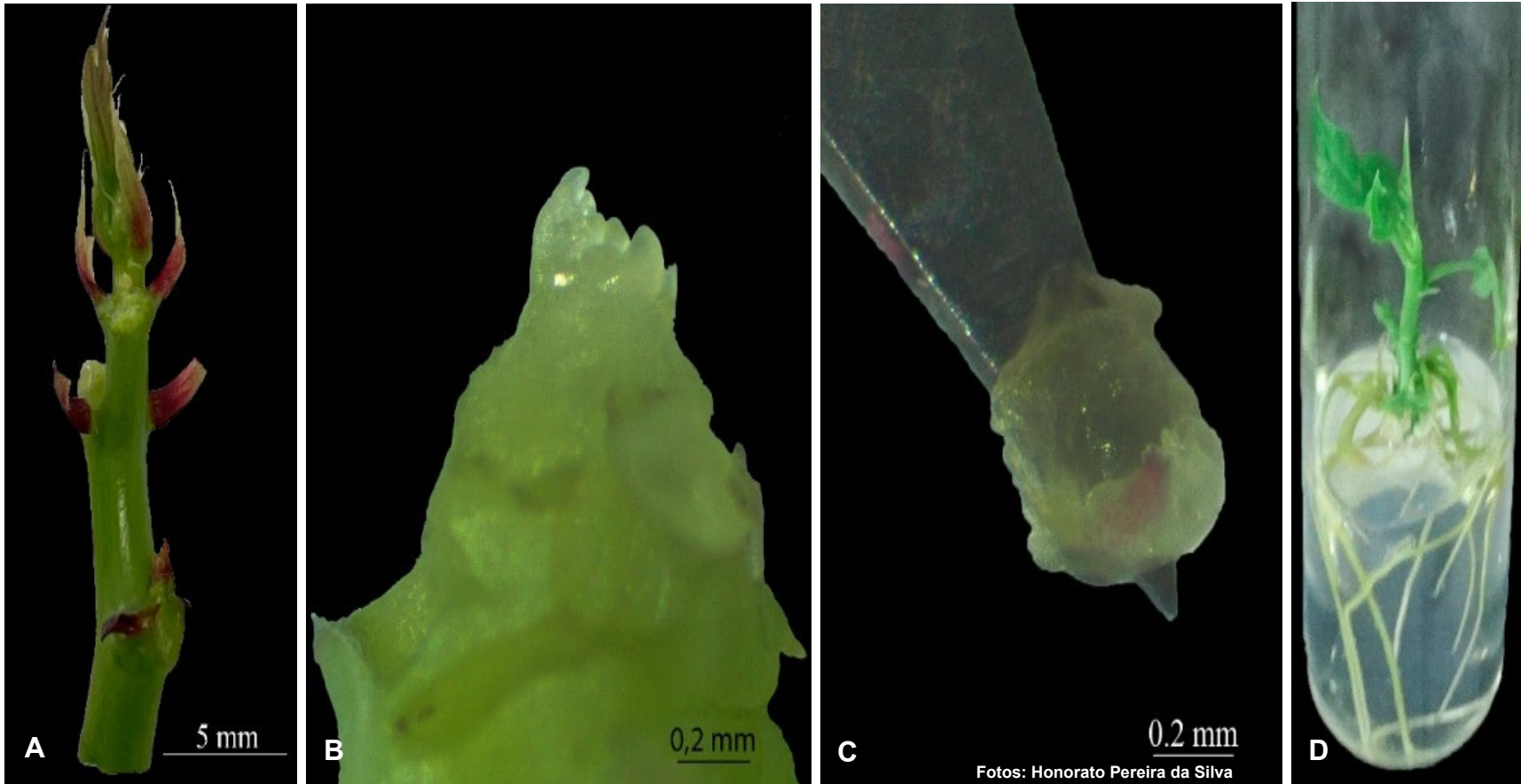
Foram utilizados ápices caulinares de 10 acessos de mandioca, dos quais sete eram cultivares (BRS 399, BRS Formosa, BRS Kiriris, BRS Novo Horizonte, BRS Prata, BRS Progresso e BRS Rendeira) e três híbridos (2012 34-15, 2014 06-02 e 2017 12-59), todos pertencentes ao BAG da Embrapa.

Para a obtenção dos explantes, manivas com 20 cm de comprimento foram plantadas em vasos contendo terra vegetal e mantidas em casa de vegetação. As brotações resultantes, com cerca de 2 cm, foram coletadas e transferidas para recipientes contendo água obtida por osmose reversa, e posteriormente encaminhadas ao Laboratório de Cultura de Tecidos.

Sob condições assépticas, em câmara de fluxo laminar, as brotações foram submetidas ao processo de desinfestação superficial. Inicialmente, foram imersas em álcool 50% por 3 minutos, seguido de tratamento com solução de hipoclorito de sódio contendo 0,25% de cloro ativo por mais 3 minutos. Após essa etapa, as brotações foram submetidas a três lavagens sucessivas com água de osmose reversa autoclavada, garantindo a remoção dos resíduos do agente desinfestante. Com o auxílio de um microscópio estereoscópico, os ápices caulinares desinfestados foram reduzidos a um tamanho entre 0,2 mm a 0,3 mm, mantendo-se um a dois primórdios foliares. Esses ápices foram cuidadosamente excisados e inoculados no meio de cultura 4E, (Figura 1).

Como meio de cultivo, utilizou-se o meio de cultura 4E, composto pelos sais minerais do MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com 1 mg L⁻¹ de tiamina-HCl, 100 mg L⁻¹ de inositol, ANA (0,02 mg L⁻¹), BAP (0,04 mg L⁻¹), AG₃ (0,05 mg L⁻¹) e 20 g L⁻¹ de sacarose (ROCA et al. 1991). Foi adicionado ao meio AC nas concentrações de 0%, 5%, 10%, 15% e 20%, (v/v) obtida de frutos verdes. Antes de ser incorporada ao meio, a água foi filtrada com papel de filtro simples para remover resíduos do mesocarpo e do endosperma sólido. O pH do meio foi ajustado para 5,8, seguido de solidificação com 2,4 g L⁻¹ de Phytigel® e autoclavagem por 20 minutos a 120 °C e 1,5 atm.

Figura 1. (A) Ápice caulinar de mandioca obtido a partir de brotações em manivas; (B) redução até os primórdios foliares; (C) excisão do ápice caulinar reduzido para 0,2-0,3 mm para inoculação no meio de cultura; (D) planta desenvolvida a partir do ápice caulinar após 20 dias de cultivo em meio 4E.



2.2. Delineamento experimental e recuperação *in vitro* de ápices caulinares de mandioca em meio de cultura suplementado com água de coco

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 10 (genótipo) x 5 (concentrações de AC), com 10 repetições, totalizando 500 parcelas experimentais. Cada unidade experimental consistiu em um ápice caulinar cultivado em tubo de ensaio. Após a inoculação no meio de cultura, os tubos foram incubados em câmaras BODs a 27 ± 1 °C, com fotoperíodo de 16 horas e densidade de fluxo de fótons de $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

As avaliações foram realizadas aos 45 dias, conforme o protocolo padrão do laboratório, em virtude do baixo desenvolvimento dos ápices, comprovado pela baixa massa fresca dos tratamentos. Foram consideradas as seguintes variáveis: formação de calo (FC), formação de raiz (FR), desenvolvimento do ápice (DA), contaminação (TC), altura das brotações (AP; cm), número de primórdios foliares (NFP; folhas em expansão, devido ao reduzido desenvolvimento dos ápices), número de miniestacas (NmE), massa fresca da parte aérea (MFPA; mg) e massa fresca de raiz e calo (MFRC; mg).

2.3. Delineamento experimental e influência da temperatura na recuperação *in vitro* de ápices caulinares de mandioca

O segundo experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 10 (mesmos genótipos) x 5 (temperaturas de incubação: 27, 29, 31, 33 e 35 °C), com 10 repetições, totalizando 500 parcelas experimentais. O meio de cultura utilizado foi o mesmo, contendo a concentração de AC previamente selecionada no experimento 1.

As avaliações foram realizadas aos 20 dias, devido ao maior desenvolvimento dos ápices em temperaturas mais elevadas, que potencializaram a organogênese e permitiram antecipar a avaliação. Foram consideradas as mesmas variáveis do experimento anterior, com o acréscimo da massa seca da parte aérea (MSPA) e da massa seca de raiz e calo (MSRC), uma vez que houve formação incipiente de raízes e maior formação de calo associado ao crescimento da parte aérea.

2.4. Metodologia estatística

A normalidade dos dados foi verificada pelo teste de Shapiro-Wilk, e a homogeneidade das variâncias entre os grupos pelo teste de Levene. As variáveis qualitativas (desenvolvimento do explante, formação de calo e formação de raiz e contaminação) foram comparadas pelo teste qui-quadrado. Para as variáveis quantitativas, aplicou-se o teste de Kruskal-Wallis (KRUSKAL; WALLIS, 1952), seguido do teste de Dunn (DUNN, 1964) com ajuste de Bonferroni para comparações múltiplas. Além disso, uma análise de componentes principais (PCA) foi realizada para identificar as variáveis, genótipos, doses e temperaturas que mais contribuíram para a variação total observada. Todas as análises foram conduzidas no software R (R Core Team, 2024).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Influência da água de coco na recuperação *in vitro* de ápices caulinares de mandioca

Considerando os resultados do teste do qui-quadrado, Tabela 1, verificou-se que os ápices caulinares apresentaram resposta promissora ao estabelecimento *in vitro*, com proliferação celular e intumescimento dos explantes, independentemente do genótipo e do meio de cultura. A porcentagem de explantes que formaram calos variou de apenas 1% a 10%, o que representa um fator positivo para o processo de morfogênese *in vitro*, indicando uma rota direta de desenvolvimento. Esse aspecto é desejável, pois reduz a probabilidade de ocorrência de variação somaclonal, possibilitando a manutenção da fidelidade genética dos genótipos propagados.

Observou-se que não houve formação de raízes, na testemunha e nos tratamentos com 15% e 20% de AC no meio de cultura. Apenas nas concentrações de 5% e 10% observaram-se a rizogênese, ainda que incipiente, independentemente do genótipo. Com relação ao desenvolvimento do ápice, todos os tratamentos responderam de forma positiva, variando de 77% a 98% de explantes responsivos. Para todas as variáveis mencionadas acima, o meio de cultura suplementado com 10% de AC, apresentou significância entre os tratamentos. A significância estatística dos testes de qui-quadrado, $p < 0,05$ para o desenvolvimento da parte aérea, reforça a influência positiva da concentração de

10% de AC sobre a morfogênese *in vitro* (Tabela 1). Resultados semelhantes foram observados para germinação e micropropagação em culturas de orquídea *Vanda falcata* por Liu *et al.* (2020) na concentração de 10% e em *Celosia sp.* por Daud *et al.* (2011) na dosagem de 70 mL L⁻¹.

Tabela 1. Teste de qui-quadrado de ápices caulinares de 10 acessos de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) estabelecidos *in vitro* em meio de cultura 4E, suplementado com diferentes concentrações de AC, após 45 dias de incubação a 27 °C.

Dose %	FC		FR		DA		TC	
	S	N	S	N	S	N	S	N
0	3 ¹	74	0	77	77,00	23	40	60
	3,83 ²	73,17	2,09	74,91	88,40	11,60	9,20	90,80
	-0,48 ^{3ns}	0,48 ^{ns}	-1,60 ^{ns}	1,61 ^{ns}	-3,98 ^{***}	3,98 ^{***}	11,91 ^{***}	-11,91 ^{***}
5	6 ¹	84	1	89	90	10	2	98
	4,48 ²	85,52	2,44	87,56	88,40	11,60	9,20	90,80
	0,83 ^{3ns}	-0,83 ^{ns}	-1,05 ^{ns}	1,05 ^{ns}	0,56 ^{ns}	-0,56 ^{ns}	-2,79 ^{**}	2,79 ^{**}
10	10 ¹	88	11	87	98	2	1	99
	4,88 ²	93,12	2,66	95,34	88,40	11,60	9,20	90,80
	2,70 ^{3**}	-2,70 ^{**}	5,88 ^{***}	-5,88 ^{***}	3,35 ^{***}	-3,35 ^{***}	-3,17 ^{***}	3,17 ^{***}
15	2 ¹	86	0	88	88	12	1	99
	4,38 ²	83,62	2,39	85,61	88,40	11,60	9,20	90,80
	-1,30 ^{3ns}	1,30 ^{ns}	-1,75 ^{ns}	1,75 ^{ns}	-0,14 ^{ns}	0,14 ^{ns}	-3,17 ^{**}	3,17 ^{**}
20	1 ¹	88	0	89	89	11	2	98
	4,43 ²	84,57	2,42	86,58	88,40	11,60	9,20	90,80
	-1,87 ^{3ns}	1,87 ^{ns}	-1,76 ^{ns}	1,76 ^{ns}	0,21 ^{ns}	-0,21 ^{ns}	-2,79 ^{**}	2,79 ^{**}
X²	10,55		34,83		21,96		142,07	
p-value	0,0300		0,0001		0,0002		0,0001	
GL⁴	4							

* ns, não significativo; *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001; ¹fo: frequência observada; ²fe: frequência esperada; ³rp: valor do resíduo padronizado ajustado e significância; ⁴GL: graus de liberdade; (S) sim; (N) não; (FC) formação de calo; (FR) formação de raiz; (DA) desenvolvimento do ápice e (TC) contaminação.

Na ausência de AC, 40% das amostras apresentaram contaminação bacteriana (Tabela 1), conforme evidenciado pelo valor positivo e elevado do resíduo. Essa contaminação foi reduzida quando o meio foi suplementado com AC, sugerindo um possível efeito bacteriostático desse aditivo. Tal efeito pode estar relacionado à presença de compostos bioativos, como quinonas, que integram a composição química da AC e possuem atividades antivirais, antifúngicas e antibacterianas (KEHELPANNALA *et al.*, 2018; KRISTENSEN *et al.*, 2020; LAGO *et al.*, 2024).

A concentração de 10% de AC proporcionou aumentos significativos para altura das brotações, número médio de miniestacas e massa fresca da parte aérea, quando comparada a testemunha (Tabela 2). Analisando o comportamento das variáveis nas concentrações entre 10% e 15% ou 20%, constata-se redução significativa nas variáveis altura das brotações, número de primórdios foliares, número de miniestacas e massa fresca de raiz e calo, sugerindo que 10% pode ser um ponto ótimo, e concentrações maiores podem ter efeito negativo. As maiores concentrações, 15% e 20%, mostram poucas ou nenhuma diferença significativa, indicando estabilização do efeito nessas concentrações. Assim, concentrações muito baixas ou muito altas (0%, 5%, 15%, 20%) comprometeram o desenvolvimento morfogênico, indicando que existe uma faixa ideal para promover a regeneração eficiente. Quanto as variáveis número de primórdios foliares e massa fresca da raiz e calo não se constatou diferença significativa para a maioria das comparações, indicando menor sensibilidade ao tratamento.

Tabela 2. Teste de comparações múltiplas de Dunn das diferenças entre as médias dos postos das variáveis de desenvolvimento de ápices caulinares dos 10 acessos de mandioca em diferentes concentrações de AC (0, 5, 10, 15 e 20%), com p -value ajustadas pelo método de Bonferroni, aos 45 dias de cultivo.

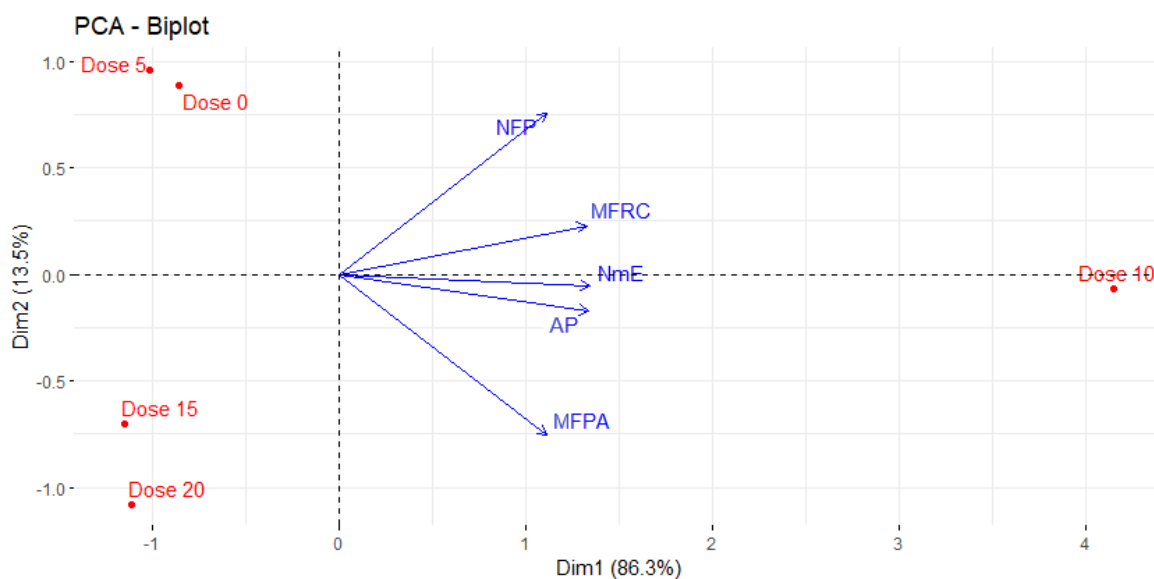
Dose AC (%)		AP	NFP	NmE	MFPA	MFRC
Diferenças entre as médias dos postos (DMP)						
0	5	-0,18 ^{ns}	0,16 ^{ns}	0,00 ^{ns}	-0,37 ^{ns}	0,40 ^{ns}
0	10	4,99 ^{**}	2,44 ^{ns}	4,94 ^{**}	5,43 ^{**}	3,15 ^{ns}
0	15	0,13 ^{ns}	-1,83 ^{ns}	0,00 ^{ns}	2,91 ^{ns}	-1,40 ^{ns}
0	20	1,28 ^{ns}	-2,68 ^{ns}	0,00 ^{ns}	3,69 [*]	-1,40 ^{ns}
5	10	5,40 ^{**}	2,38 ^{ns}	5,15 ^{**}	6,06 ^{**}	2,87 ^{ns}
5	15	0,32 ^{ns}	-2,07 ^{ns}	0,00 ^{ns}	3,41 [*]	-1,86 ^{ns}
5	20	1,52 ^{ns}	-2,95 ^{ns}	0,00 ^{ns}	4,22 ^{**}	-1,80 ^{ns}
10	15	-5,04 ^{**}	-4,47 ^{**}	-5,12 ^{**}	-2,54 ^{ns}	-4,75 ^{**}
10	20	-3,83 [*]	-5,38 ^{**}	-5,14 ^{**}	-1,73 ^{ns}	-4,77 ^{**}
15	20	1,20 ^{ns}	-0,87 ^{ns}	0,00 ^{ns}	0,79 ^{ns}	0,00 ^{ns}

ns = não significativo, * significativo a 5%, ** significativo a 1%. AP (Altura das brotações; cm), NFP número de primórdios foliares, NmE (número de médio de miniestacas), MFPA (massa fresca da parte aérea; mg) e MFRC (massa fresca da raiz e calo; mg).

O gráfico dos componentes principais mostra que a concentração de 10% de AC apresenta a melhor performance em termos de número de primórdios foliares (NFP), massa fresca de raiz e calo (MFRC), número de miniestacas (NmE),

altura de planta (AP) e massa fresca da parte aérea (MFPA). Já as concentrações extremas (principalmente 20%) estão associadas a desempenho inferior, indicando que concentrações muito altas podem ser prejudiciais ao desenvolvimento das plantas (Figura 2). O PC1 explicou 86,3% da variação, e PC2, 13,5%, totalizando 98,8% da variabilidade explicada. As variáveis número de primórdios foliares (NFP), massa fresca de raiz e calo (MFRC), número de miniestacas (NmE), altura de planta (AP) e massa fresca da parte aérea (MFPA), apresentaram forte correlação positiva com PC1.

Figura 2. Análise de Componentes Principais (PCA) representando a distribuição das variáveis associadas ao desempenho *in vitro*. Os pontos vermelhos indicam as diferentes concentrações de AC avaliadas, enquanto as setas azuis representam os vetores das variáveis analisadas: número de primórdios foliares (NFP), massa fresca de raiz e calo (MFRC), número de miniestacas (NmE), altura de planta (AP) e massa fresca da parte aérea (MFPA).



3.2. Influência da temperatura na recuperação *in vitro* de ápices caulinares de mandioca

Na Tabela 3, são apresentados os resultados da associação entre a temperatura de incubação e a frequência observada das variáveis qualitativas avaliadas em meio 4E modificado, suplementado com 10% de AC, sob diferentes condições térmicas. O teste do qui-quadrado foi utilizado para comparar as frequências observadas (f_o) e esperadas (f_e) de cada variável, considerando os resíduos padronizados ajustados (r_p), que indicam o grau de desvio entre os

valores observados e os esperados, bem como o valor de p, que representa a probabilidade de ocorrência desses desvios ao acaso.

A influência da temperatura sobre variáveis analisadas no cultivo *in vitro* foi avaliada nas condições de 27 °C a 35 °C (Tabela 3). Os resultados indicam que a formação de calo foi significativamente favorecida pelas temperaturas mais elevadas, com aumento significativo nas temperaturas 33 °C e 35 °C z ($p < 0,001$). Com relação à formação de raízes, a temperatura apresentou efeito estatístico não significativo ($p = 0,1032$), apesar de um leve aumento na frequência de ocorrência a 31 °C (6%). Isso indica que, dentro do intervalo testado, a temperatura não exerce influência determinante sobre a rizogênese.

Tabela 3. Teste de qui-quadrado dos ápices caulinares de 10 acessos de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) estabelecidos *in vitro* em meio de cultura 4E, suplementado com 10% de AC, após 20 dias de cultivo em diferentes temperaturas.

Temp.	FC		FR		DA		TC	
	S	N	S	N	S	N	S	N
27 °C	0 ¹	95	0	95	95	5	6	94
	28,46 ²	66,54	3,28	91,72	92,80	7,20	2,40	97,60
	-7,15 ^{3***}	7,15 ^{***}	-2,07 [*]	2,07 [*]	0,95 ^{ns}	-0,95 ^{ns}	2,63 ^{**}	-2,63 ^{**}
29 °C	0 ¹	90	3	87	90	10	4	96
	26,96 ²	63,04	3,10	86,90	92,80	7,20	2,40	97,60
	-6,91 ^{3***}	6,91 ^{***}	-0,07 ^{ns}	0,07 ^{ns}	-1,21 ^{ns}	1,21 ^{ns}	1,17 ^{ns}	-1,17 ^{ns}
31 °C	26 ¹	64	6	84	90	10	2	98
	26,96 ²	63,04	3,10	86,90	92,80	7,20	2,40	97,60
	-0,25 ^{3ns}	0,25 ^{ns}	1,86 ^{ns}	-1,86 ^{ns}	-1,21 ^{ns}	1,21 ^{ns}	-0,29 ^{ns}	0,29 ^{ns}
33 °C	53 ¹	41	5	89	94	6	0	100
	28,16 ²	65,84	3,24	90,76	92,80	7,20	2,40	97,60
	6,26 ^{3***}	-6,26 ^{***}	1,11 ^{ns}	-1,11 ^{ns}	0,52 ^{ns}	-0,52 ^{ns}	-1,75 ^{ns}	1,75 ^{ns}
35 °C	60 ¹	35	2	93	95	5	0	100
	28,46 ²	66,54	3,28	91,72	92,80	7,20	2,40	97,60
	7,92 ^{3***}	-7,92 ^{***}	-0,80 ^{ns}	0,80 ^{ns}	0,95 ^{ns}	-0,95 ^{ns}	-1,75 ^{ns}	1,75 ^{ns}
χ^2	160,36		7,699		4,011		11,612	
p-value	0,0001		0,1032		0,4045		0,0205	
GL ⁴					4			

* ns, não significativo; *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001; ¹fo: frequência observada; ²fe: frequência esperada; ³rp: valor do resíduo padronizado ajustado e significância; ⁴GL: graus de liberdade; (S) sim; (N) não; (FC) formação de calo; (FR) formação de raiz; (DA) desenvolvimento do ápice e (TC) contaminação.

Quanto à formação de parte aérea, os resultados foram homogêneos, com frequência de ocorrência variando entre 90 a 95 casos. A análise global ($\chi^2 = 4,011$; $p = 0,4045$) corrobora com a ausência de efeito significativo da temperatura sobre esta variável. No entanto, estudos prévios evidenciam que temperaturas elevadas

podem favorecer a regeneração *in vitro* em diferentes espécies vegetais. Lambolez *et al.* (2022) demonstraram que o aumento da temperatura de 17 °C para 27 °C promoveu a regeneração de parte aérea em *Arabidopsis thaliana*, associada à ativação de genes relacionados à organogênese.

Em relação à contaminação, observou-se que esta foi severamente reduzida com o aumento da temperatura. Em 27 °C e 29 °C, as frequências de contaminação foram de 6% e 4%, respectivamente, enquanto a partir de 33 °C não foram observados casos de contaminação. Essa diferença foi estatisticamente significativa ($\chi^2 = 11,612$; $p = 0,02048$), evidenciando que temperaturas mais elevadas atuam como fator inibitório da contaminação microbiana em culturas *in vitro*. Resultados semelhantes foram reportados por Sekerli (2024), que demonstraram a eficácia da termoterapia na redução drástica da contaminação microbiana em culturas de avelã (*Corylus avellana*), com aumento significativo na proporção de explantes assépticos.

A redução da contaminação bacteriana em temperaturas elevadas pode estar relacionada à inibição de bactérias termossensíveis, como *Pseudomonas* e *Flavobacterium*, que se desenvolvem melhor entre 10 °C e 20 °C. Além disso, a elevação da temperatura atua como termoterapia, auxiliando na eliminação de contaminantes virais, como demonstrado por Vivek e Modgil (2018), em macieira e por Yarmus *et al.* (2023), em alho, onde técnicas *in vitro* reduziram a carga bacteriana e eliminaram infecções virais e fúngicas. Lizárraga *et al.* (2022), também confirmaram a eficácia da termoterapia combinada com cultura de meristemas na erradicação de vírus em frutíferas.

A tabela 04 apresenta a diferença entre as médias dos postos (DMP) para diferentes temperaturas de cultivo em relação a sete variáveis morfofisiológicas. Comparações entre 27 °C e as demais temperaturas indicaram resultados com baixos valores para todas as variáveis avaliadas, sendo esta temperatura significativamente inferior a 31, 33 e 35 °C ($p < 0,01$). Notadamente, a faixa de 33 - 35 °C promoveu os melhores resultados para as variáveis analisadas, embora as diferenças entre essas duas temperaturas não tenham sido estatisticamente significativas ($p > 0,05$), sugerindo um possível plateau fisiológico no desenvolvimento morfogênico.

Ao comparar 29 °C com temperaturas mais elevadas (31, 33 e 35 °C), observou-se um padrão semelhante, com melhor desempenho das variáveis

morfofisiológicas a partir de 31 °C. As diferenças entre 31 °C e 33 °C foram, em sua maioria, significativas, especialmente para NmE, MFPA, MFRC, MSPA e MSRC ($p < 0,01$), sugerindo que a temperatura de 33 °C pode ser ideal para maximizar tanto o crescimento vegetativo quanto o acúmulo de biomassa fresca e seca. Entre 33 °C e 35 °C não indicou diferenças significativas, reforçando que ambas as temperaturas favorecem a morfogênese de maneira semelhante, mas com tendência levemente superior em 33 °C. Já a ausência de diferenças significativas entre 27 °C e 29 °C, em quase todas as variáveis, evidencia que temperaturas abaixo de 30 °C não são ideais para uma eficiente regeneração *in vitro* da mandioca.

Tabela 4. Teste de comparações múltiplas de Dunn das diferenças entre as médias dos postos das variáveis de desenvolvimento de ápices caulinares dos 10 acessos de mandioca nos diferentes regimes de temperatura (27°C, 29°C, 31°C, 33°C e 35°C), com p -value ajustadas pelo método de Bonferroni, aos 20 dias de cultivo.

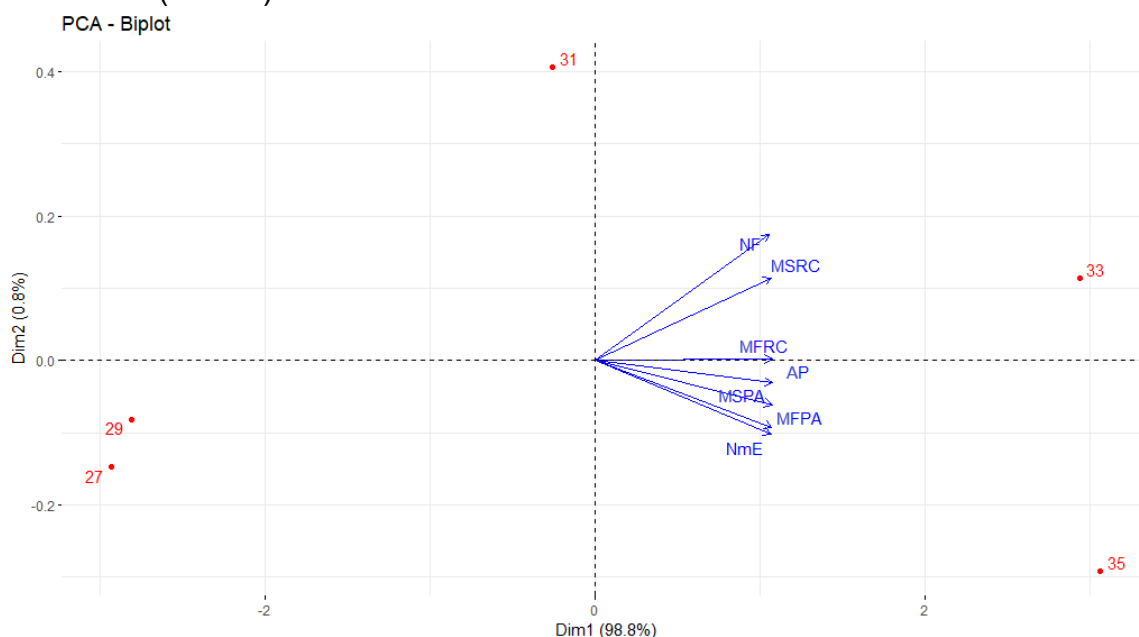
Temperatura de cultivo	AP	NFP	NmE	MFPA	MFRC	MSPA	MSRC
Diferença entre as médias dos postos (DMP)							
27 29	1,19 ^{ns}	0,91 ^{ns}	0,00 ^{ns}	1,38 ^{ns}	0,00 ^{ns}	1,01 ^{ns}	0,00 ^{ns}
27 31	8,21 ^{**}	8,35 ^{**}	4,05 ^{**}	8,17 ^{**}	4,67 ^{**}	7,84 ^{**}	4,80 ^{**}
27 33	11,50 ^{**}	12,00 ^{**}	8,26 ^{**}	12,80 ^{**}	9,35 ^{**}	12,60 ^{**}	9,47 ^{**}
27 35	12,50 ^{**}	11,90 ^{**}	9,36 ^{**}	13,30 ^{**}	9,21 ^{**}	13,10 ^{**}	8,96 ^{**}
29 31	6,93 ^{**}	7,34 ^{**}	3,99 ^{**}	6,70 ^{**}	4,61 ^{**}	6,74 ^{**}	4,74 ^{**}
29 33	10,20 ^{**}	11,00 ^{**}	8,15 ^{**}	11,30 ^{**}	9,22 ^{**}	11,40 ^{**}	9,35 ^{**}
29 35	11,10 ^{**}	10,80 ^{**}	9,23 ^{**}	11,80 ^{**}	9,09 ^{**}	11,90 ^{**}	8,84 ^{**}
31 33	3,20 ^{ns}	3,54 [*]	4,11 ^{**}	4,52 ^{**}	4,56 ^{**}	4,62 ^{**}	4,56 ^{**}
31 35	4,09 ^{**}	3,34 ^{ns}	5,18 ^{**}	4,99 ^{**}	4,41 ^{**}	5,09 ^{**}	4,04 ^{**}
33 35	0,89 ^{ns}	-0,21 ^{ns}	1,07 ^{ns}	0,46 ^{ns}	-0,16 ^{ns}	0,46 ^{ns}	-0,54 ^{ns}

ns = não significativo, * = significativo a 5%, ** = significativo a 1%. AP (Altura das brotações; cm), NFP número de primórdios foliares, NmE (número de miniestacas), MFPA (massa fresca da parte aérea; mg), MFRC (massa fresca de raiz e calo; mg), MSPA (massa seca da parte aérea; mg) e MSRC (massa seca de raiz e calo; mg).

Portanto, os resultados indicam que a otimização térmica da sala de crescimento entre 31 °C e 33 °C pode ser estratégica para aumentar a eficiência da micropropagação *in vitro* de genótipos de mandioca, favorecendo tanto o desenvolvimento aéreo quanto radicular. Os resultados alcançados por Otroschy *et al.* (2009) corroboram com os valores obtidos neste trabalho, haja vista que temperaturas mais elevadas, 25 °C, favoreceram a emissão de brotações, folhas e a altura de planta em *Solanum tuberosum*.

A Análise de Componentes Principais (PCA) permitiu visualizar a relação entre diferentes temperaturas e as variáveis morfofisiológicas avaliadas (Figura 3). O primeiro componente principal (PC1) explicou 98,8% da variância total dos dados, enquanto o segundo componente (PC2) contribuiu com apenas 0,8%, indicando que a maior parte da variação entre os tratamentos pode ser explicada por PC1. As variáveis morfofisiológicas altura de planta (AP), número de primórdios foliares (NFP), número de miniestacas (NmE), massa fresca da parte aérea (MFPA), massa fresca de raiz e calo (MFRC), massa seca da parte aérea (MSPA) e massa seca de raiz e calo (MSRC) apresentaram forte correlação positiva com PC1, conforme evidenciado pela direção e intensidade dos vetores.

Figura 3. Análise de Componentes Principais (PCA) representando a distribuição das variáveis associadas ao desempenho *in vitro*. Os pontos vermelhos indicam as diferentes temperaturas avaliadas, enquanto as setas azuis representam os vetores das variáveis analisadas: altura de planta (AP), número de primórdios foliares (NFP), número de miniestacas (NmE), massa fresca da parte aérea (MFPA), massa fresca de raiz e calo (MFRC), massa seca da parte aérea (MSPA) e massa seca de raiz e calo (MSRC).



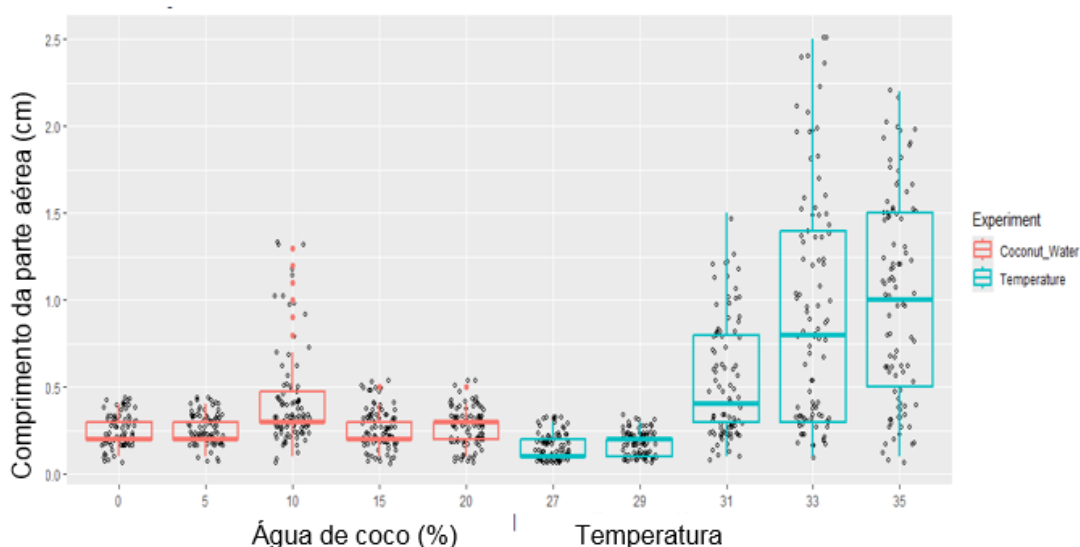
Observa-se que as temperaturas mais elevadas (33 °C e 35 °C) estão positivamente associadas à direção dos vetores das variáveis, sugerindo maior acúmulo de biomassa e melhor desenvolvimento das plantas sob essas condições. Em contraste, as temperaturas mais baixas (27 °C e 29 °C) localizaram-se no

quadrante oposto, indicando associação negativa com as variáveis analisadas, o que reflete um desempenho morfofisiológico inferior.

Analisado o efeito da AC no meio de cultura e a temperatura de incubação (Figura 4), observa-se que a suplementação com AC, isoladamente, não favoreceu aumentos significativos no crescimento da parte aérea, onde a variação entre os tratamentos foi pequena, com valores medianos inferiores a 0,5 cm, apenas com ligeira tendência ao aumento na concentração de 10%, mas ainda dentro de uma faixa estreita. Embora tenha efeito positivo em outros aspectos fisiológicos, como o peso fresco do calo.

Por outro lado, a temperatura de incubação foi o principal fator determinante no crescimento da parte aérea de mandioca *in vitro*. As temperaturas de 31°C, 33°C e 35°C resultaram em crescimentos muito superiores aos demais tratamentos, 27°C e 29°C, com medianas acima de 1 cm e presença de valores máximos superiores a 2,5 cm em alguns casos. Dentre estas a temperatura de 33°C parece ter promovido o maior crescimento mediano, seguida por 35°C.

Figura 4. Boxplot comparativos das distribuições dos valores de altura de brotações (cm) de 10 acessos de *M. esculenta* Crantz introduzidos *in vitro* em meio de cultura 4E+, suplementado com diferentes concentrações de AC no meio de cultura e diferentes temperaturas de incubação, aos 45 dias de cultivo.



Além disso, a amplitude de variação foi consideravelmente maior nessas temperaturas, indicando elevada atividade fisiológica sobre os tecidos cultivados.

A mediana da altura, bem como os quartis superiores, evidencia que temperaturas elevadas favorecem não apenas o crescimento dos genótipos isolados, mas uma resposta consistente de todo o grupo experimental.

Esses dados corroboram com a literatura que aponta a temperatura como variável crítica, influenciando diretamente na fluidez da membrana plasmática, metabolismo, divisão celular e a expansão dos tecidos. Uma temperatura considerada ótima irá promover a atividade metabólica e a expressão de genes envolvidos na divisão celular, levando a uma maior proliferação celular, visto que a temperatura influencia a síntese e ação de hormônios vegetais, que são essenciais para a diferenciação celular e conseqüentemente dos tecidos (DHANDA; MUNJAL, 2020; XALXO *et al.*, 2020; Al *et al.*, 2023).

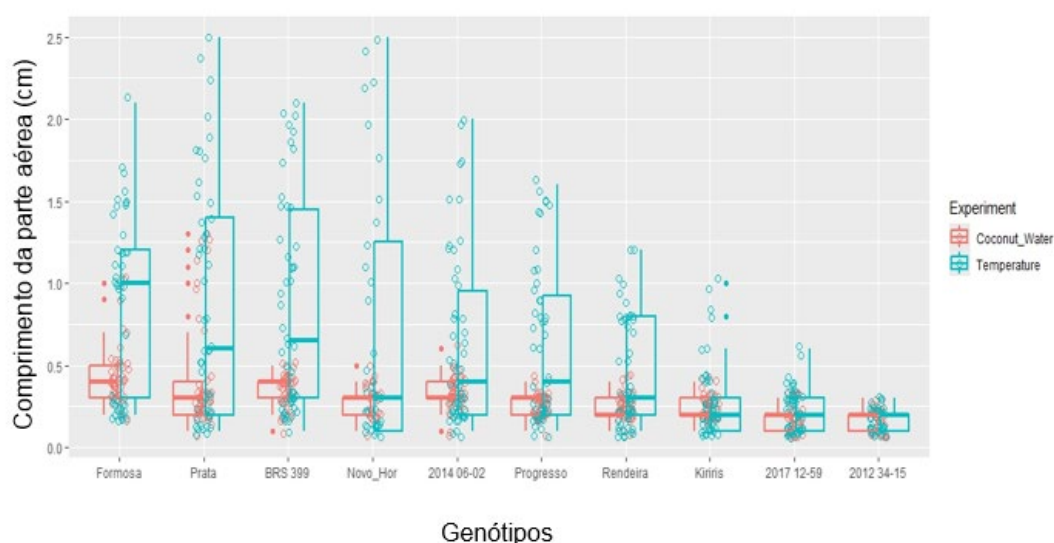
Em baixas temperaturas, ocorre repressão de fatores de transcrição que conseqüentemente reprime vários mecanismos que afetam a expressão do gene PIF4 (JUNG *et al.*, 2016; LEGRIS *et al.*, 2016; JUNG *et al.*, 2020). A alta temperatura alivia esta inibição e induz a transcrição do PIF4 e outros mecanismos reguladores do PIF4 abrindo o caminho para o crescimento de alongamento induzido termicamente. Até agora, essas descobertas descrevem respostas termo morfogênicas apenas em tecidos da parte aérea (Al *et al.*, 2023).

Esses dados reforçam a importância do controle térmico na sala de crescimento ou câmaras BODs para o sucesso da regeneração *in vitro*, com possibilidade de ganhos adicionais ao combinar temperaturas ideais com aditivos como a AC.

Os genótipos BRS Prata, BRS Novo Horizonte, BRS Formosa e o híbrido 2014 06-02 (Figura 5), destacam-se por apresentarem maior comprimento da parte aérea. Esses genótipos demonstraram boa resposta ao fator temperatura, possivelmente indicando maior adaptabilidade ou vigor sob variações térmicas. Embora as variedades BRS 399, BRS Progresso e BRS Rendeira, tenham respondido positivamente à temperatura, seu desempenho foi menos expressivo. Estes acessos podem ter crescimento satisfatório sob estímulo térmico, mas com menor estabilidade ou potencial que os genótipos do grupo anterior. Já a variedade BRS Kiriris, e os híbridos 2017 12-59 e 2012 34-15 mostraram menor desenvolvimento, indicando serem menos responsivos ou menos vigorosos nessas condições.

No tratamento com temperatura, observou-se variação significativa na resposta dos diferentes acessos de mandioca quanto ao crescimento da parte aérea. As variedades BRS Formosa, BRS Prata e BRS 399 destacaram-se por apresentarem os maiores comprimentos médios, indicando maior responsividade a esse componente do meio de cultivo.

Figura 5. Boxplot comparativos das distribuições dos valores de altura de brotações (cm) de 10 acessos de *M. esculenta* Crantz introduzidos *in vitro* em meio de cultura 4E+, suplementado com 10% de AC no meio de cultura e submetidos a diferentes temperaturas de incubação, aos 20 dias de cultivo.



Esses resultados sugerem que esses materiais possuem maior capacidade de absorção e aproveitamento dos compostos bioativos presentes na AC, como citocininas e açúcares. Por outro lado, os genótipos BRS Novo Horizonte, BRS Progresso, BRS Rendeira e o híbrido 2014 06-02, apresentaram crescimento intermediário, com medianas mais discretas e menor dispersão dos dados, refletindo uma resposta moderada à suplementação. Já o genótipo BRS Kiriris e os híbridos 2017 12-59 e 2012 34-15 demonstraram os menores valores de crescimento da parte aérea sob esse tratamento, com baixa variabilidade e medianas próximas ao zero, o que indica pouca ou nenhuma efetividade da AC para estimular o desenvolvimento inicial nesses materiais.

Dessa forma, os resultados obtidos indicam que o controle da temperatura constitui um fator relevante para a promoção do crescimento inicial da parte aérea

em determinados genótipos de mandioca cultivados *in vitro*. Em contrapartida, a suplementação do meio de cultura com AC apresentou desempenho inferior quanto ao estímulo vegetativo, com variações consideráveis entre os materiais genéticos avaliados. Tais evidências reforçam que a eficácia da temperatura de incubação, bem como da adição de AC ao meio de cultura, está intrinsecamente relacionada ao genótipo, tornando indispensável o ajuste específico das condições experimentais para a otimização de protocolos de cultivo *in vitro*.

Assim como relatado por Sasaki *et al.* (1994), no cultivo *in vitro* de carvalho (*Quercus acutissima* Carruth), a mandioca também expressa seu potencial genético de forma dependente das variedades utilizadas. Os dados deste experimento confirmam esse comportamento, evidenciando que tanto a influência da AC quanto da temperatura de incubação varia significativamente de acordo com o genótipo testado.

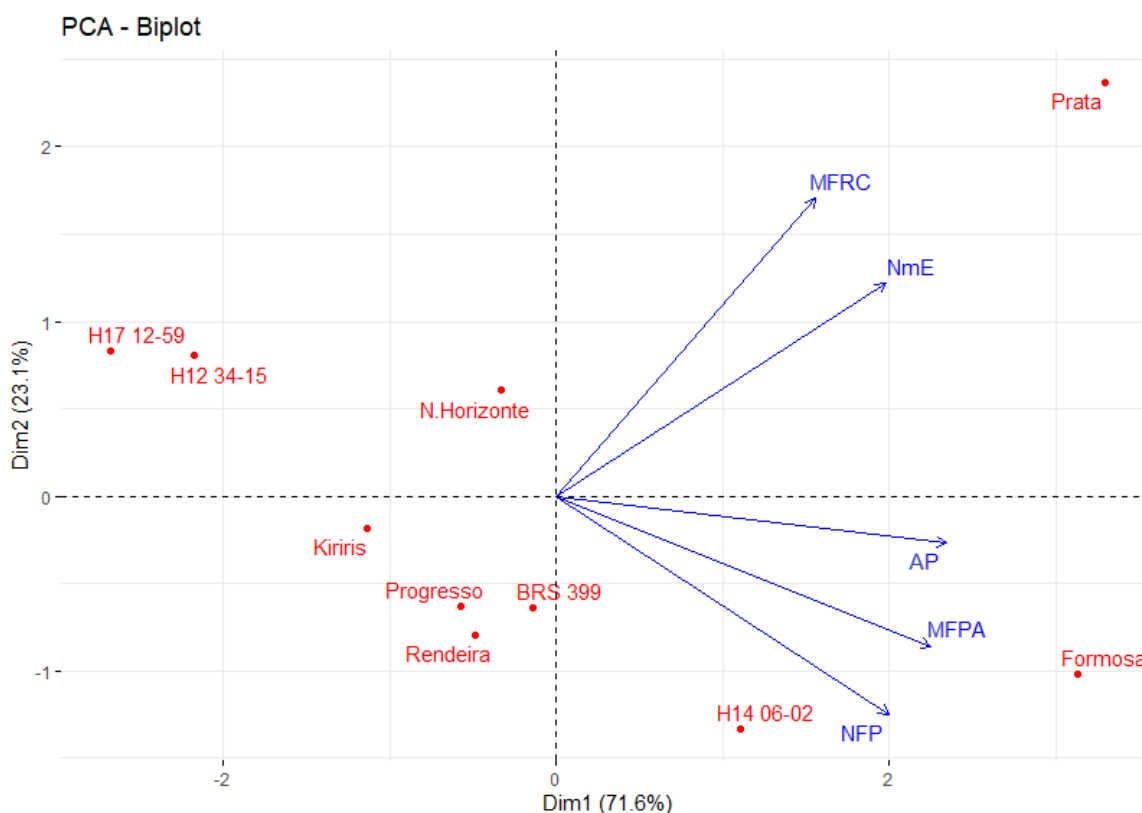
Entender os fatores que potencializam a morfogênese dos ápices caulinares durante o cultivo *in vitro* é de considerável importância para o sucesso de um protocolo robusto de morfogênese *in vitro*. Em experimentos de cultivo *in vitro*, a suplementação de AC ao meio de cultura mostrou efeitos positivos na formação de massa verde (altura de planta), para batatas (*Solanum tuberosum* L.) por Hafsani *et al.* (2018) e para oliveira (*Olea europaea*) por Souza *et al.* (2013). Os autores sugerem que este aumento na altura de planta e no número de folhas, se deve à alta concentração de citocininas e nitrogênio na composição da AC, compostos estes que estimulam e contribuem para a morfogênese. Portanto, estes dados evidenciam que culturas diferentes podem ter o seu potencial morfogênico potencializado de forma diferentes, não permitindo assim uma universalização dos protocolos de cultivo *in vitro*.

Diversos estudos demonstram que a suplementação do meio de cultura com AC favorece o desenvolvimento da parte aérea em diferentes espécies vegetais, como figo (*Ficus carica* L.) por Lui *et al.* (2022), espinafre (*Spinacia oleracea* L.) por Al-Khayri *et al.* (1992), batata (*Solanum tuberosum* L.) por Sembiring *et al.* (2021), e kiwi (*Actinidia deliciosa*) por Nasib *et al.* (2008).

3.3. Análise de componentes principais: Resposta dos diferentes genótipos com base em variáveis associadas ao desempenho *in vitro*

O biplot (Figura 6) representa os dois primeiros componentes principais, PC1 e PC2, que juntos explicam 94,7% da variância total dos dados, sendo 71,6% atribuída ao PC1 e 23,1% ao PC2. Estes resultados referem-se ao experimento conduzido com variação de meio de cultura, especificamente com ou sem suplementação de AC, visando avaliar o desempenho *in vitro* dos diferentes genótipos de mandioca.

Figura 6. Análise de Componentes Principais (PCA) representando a distribuição de genótipos de mandioca com base em variáveis associadas ao desempenho *in vitro*. Os pontos vermelhos indicam os diferentes genótipos avaliados, enquanto as setas azuis representam os vetores das variáveis analisadas: altura de planta (AP), número de primórdios foliares (NFP), número de miniestacas (NmE), massa fresca da parte aérea (MFPA) e massa fresca de raiz e calo (MFRC).



As variáveis avaliadas (AP, NFP, NmE, MFPA, MFRC) apresentaram forte correlação com o eixo PC1, conforme indicado pelo comprimento e direção dos vetores. Isso indica que essas variáveis foram determinantes para a diferenciação entre os genótipos. A variedade BRS Formosa e híbrido 2014 06-02 destacaram-se por apresentarem os maiores escores positivos no PC1, sugerindo uma associação positiva das características como altura de planta (AP), número de

primórdios foliares (NFP) e massa fresca da parte aérea (MFPA), indicando maior potencial morfogênico e resposta regenerativa.

Por outro lado, os híbridos 2017 12-59 e 2012 34-15 apresentaram escores negativos, estando associados a um menor desempenho nessas variáveis. A variedade BRS Prata mostrou comportamento atípico, ocupando uma posição isolada no quadrante superior direito, sugerindo uma resposta divergente em relação às demais genótipos analisados.

Portanto, a variedade BRS Formosa e o híbrido 2014 06-02 contribuíram significativamente para a variação explicada no PC1, enquanto o 2017 12-59 e o 2012 34-15 tiveram contribuições negativas. Esses resultados indicam que há variabilidade genética expressiva na capacidade de regeneração *in vitro* entre os genótipos de mandioca, sendo possível selecionar candidatos promissores para aplicações em protocolos de propagação e criopreservação. Esses achados corroboram com a aplicabilidade da PCA como ferramenta eficiente para seleção genotípica em programas de conservação e biotecnologia da mandioca.

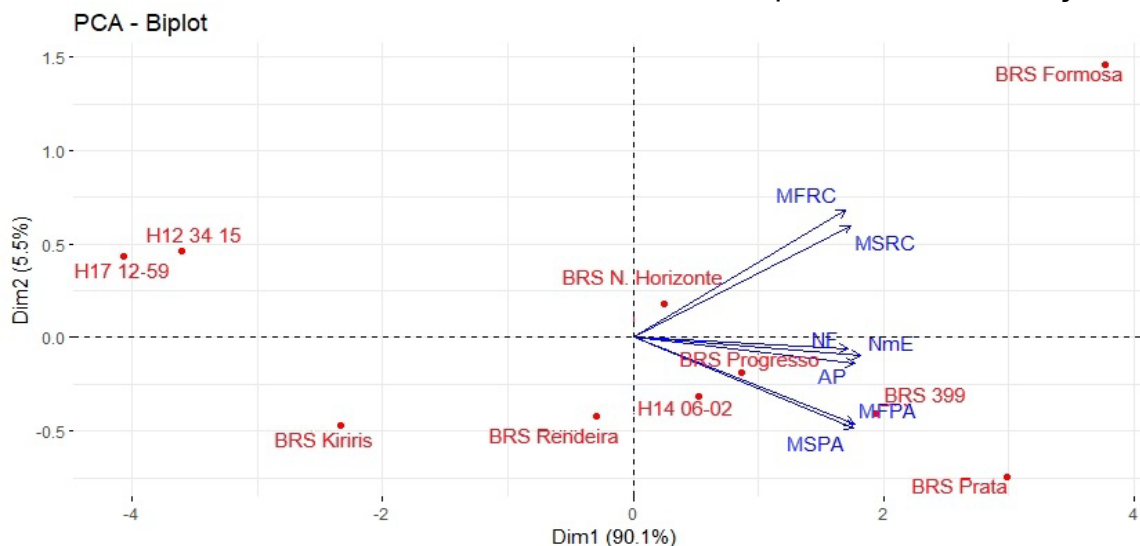
Na Figura 7, observa-se que a elevação da temperatura, associada ao meio de cultura suplementado com 10% de AC, promoveu modificações no desempenho dos genótipos, e permitiu a inclusão de duas novas variáveis (massas secas) decorrentes do aumento da biomassa vegetal. Ao se adicionar o fator temperatura ao tratamento com 10% de AC, houve um aumento expressivo na variância explicada pelo primeiro componente principal (PC1), passando de 71,6% para 90,1%, com redução simultânea da contribuição do PC2 (de 23,1% para 5,5%).

Este resultado reforça a importância da temperatura como variável-chave no desempenho morfogênico de culturas *in vitro*, dado que alterações térmicas modulam processos fisiológicos essenciais como divisão celular e expansão de tecidos, conforme evidenciado em *Arabidopsis thaliana* por Lambolez *et al.* (2022) e Jin e Zhu (2019).

Observa-se também um deslocamento geral dos genótipos para a direita do gráfico, com alterações de quadrante e rearranjos nas posições relativas. Genótipos como BRS Formosa e BRS Prata inverteram suas posições, refletindo diferentes graus de plasticidade morfogênica diante do novo ambiente térmico. Esse padrão está de acordo com estudos que mostram que temperaturas elevadas estimulam o alongamento e o desenvolvimento de órgãos aéreos em plantas, como

discutido por Jin e Zhu (2019), além de favorecerem a reorganização de variáveis morfológicas e metabólicas.

Figura 7. Biplot das contribuições das variáveis respostas e posicionamentos do aporte dos 10 genótipos de mandioca (*M. esculenta* Crantz), conforme a variação dos dados das CP1 e CP2 no estabelecimento *in vitro* dos ápices caulinares de mandioca, cultivado em ambientes com diferentes temperaturas de incubação.



Esse comportamento pode ser atribuído ao efeito modulador da temperatura sobre o metabolismo celular e a divisão meristemática, que intensifica a expressão de características morfogênicas específicas, promovendo maior desenvolvimento da parte aérea e acúmulo de biomassa em genótipos mais responsivos. Essa interação entre ambiente térmico e expressão morfogênica é amplamente documentada por Patel e Franklin (2009); por Catroverde e Dina (2021) e por Chen et al. (2022), evidenciando que pequenos ajustes na temperatura podem modificar significativamente padrões de crescimento e desenvolvimento em plantas.

Os genótipos BRS Formosa, BRS Prata e BRS 399 destacaram-se com escores positivos no PC1, indicando maior potencial morfogênico e melhor resposta aos fatores testados. Por outro lado, os genótipos Kiriris, 2017 12-59 e 2012 34-15 mantiveram-se com escores negativos, confirmando baixa performance regenerativa mesmo sob condições otimizadas de temperatura e meio.

Saber quais variáveis que mais explicam a variância entre os genótipos permitem destacar quais características são mais relevantes para a regeneração *in vitro*, conseqüentemente irá possibilitar o aperfeiçoamento do protocolo com base

nessas variáveis. Para este trabalho o número de folha (NF) e massa fresca da parte aérea (MFPA) destacaram-se com variáveis de maior influência, sendo bons indicadores para se avaliar a eficiência morfogênica e potenciais critérios de seleção para programas de micropropagação e conservação de germoplasma.

4. CONCLUSÕES

O presente estudo demonstrou que a adição de 10 % de água de coco ao meio (4E+) e a manipulação da temperatura são estratégias eficazes para otimizar o estabelecimento *in vitro* de ápices caulinares de mandioca. A concentração de 10% de AC destacou-se por promover significativamente o desenvolvimento da parte aérea, aumentar a massa fresca e reduzir a contaminação. No entanto, não houve estímulo consistente à rizogênese, indicando a necessidade de ajustes específicos para a indução radicular.

A elevação da temperatura para 33 °C e 35 °C aumentou a altura das brotações. A resposta morfogênica variou entre as variedades avaliadas, destacando-se a maior responsividade para BRS Prata, BRS Formosa e o híbrido 2014 06-02 aos tratamentos térmicos, e de BRS Formosa, BRS Prata e BRS 399 à suplementação com AC. Essa diversidade de resposta evidencia a importância de considerar o efeito do genótipo x ambiente no desenvolvimento de protocolos otimizados de cultivo e conservação *in vitro* da mandioca.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEWALE, P.; YANCHESHMEH, M. S.; LAM, E. Starch modification for non-food, industrial applications: Market intelligence and critical review. **Carbohydrate Polymers**, v. 291, p. 119590, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.119590>

Al, H. et al. Auxin-dependent regulation of cell division rates governs root thermomorphogenesis, **The EMBO Journal**. v. 42, n. 11, p 1-17, 2023. DOI: <https://doi.org/10.15252/emj.2022111926>

AKTER, S.; NASIRUDDIN, K. M.; KHALDUN, A. B. M. Organogenesis of *Dendrobium orchid* using traditional media and organic extracts. **Journal of Agriculture & Rural Development**, v. 5, n. 1, p. 30-35, 2007. DOI: <https://doi.org/10.3329/jard.v5i1.1454>

AL-KHAYRI, J. M. et al. Spinach tissue culture improved with coconut water. **HortScience**, v. 27, n. 4, 357-358, 1992. DOI: <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.27.4.357>

CASTROVERDE, C. D. M.; DINA, D. Temperature regulation of plant hormone signaling during stress and development. **Journal of Experimental Botany**, [S. l.], v. 72, n. 21, p. 7436–7458, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1093/jxb/erab257>

CHEN, Z.; GALLI, M.; GALLAVOTTI, A. Mechanisms of temperature-regulated growth and thermotolerance in crop species. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 65, p. 102134, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2021.102134>

DAUD, N. et al. Effects of different organic additives on in vitro shoot regeneration of *Celosia* sp. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, 14, n. 9, p. 546-551, 2011. DOI: <https://doi.org/10.3923/pjbs.2011.546.551>

DHANDA, S. S.; MUNJAL, R. Heat tolerance in relation to acquired thermotolerance for membrane lipids in bread wheat. **Field Crops Research**, v. 135, p. 30-37, 30 ago. 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2012.06.009>

DUNN, O. J. "Multiple comparisons using rank sums," **Technometrics**, v. 6, n. 3, pp. 241-252, 1964. DOI: <https://doi.org/10.1080/00401706.1964.10490181>

EL-SHARKAWY, M. A. Cassava biology and physiology. **Plant Molecular Biology**, v. 56, p. 481–501, 2004. <https://doi.org/10.1007/s11103-005-2270-7>

FAO. **The global cassava development strategy**. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2021. Disponível em: <https://www.fao.org>. Acesso em: 28 maio 2025.

GABRIEL, L. F. et al. Mudança climática e seus efeitos na cultura da mandioca. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 18, n. 1, p. 90-98, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1415-43662014000100012>

HAFSAN, H. et al. The utilization of coconut water waste as a growth media of the in-vitro potato cutting. **Scientiae Educatia: Jurnal Pendidikan Sains**, v. 7, n. 2, p. 108-116, 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.24235/sc.educatia.v7i2.2636>

JARVIS, A. et al. Is cassava the answer to African climate change adaption? **Tropical Plant Bioplogy**, n. 5, p. 9-29, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12042-012-9096-7>

JIN, H.; ZHU, Z. Dark, light, and temperature: key players in plant morphogenesis. **Plant Physiology**, v. 180, n. 4, p. 1793–1802, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.19.00331>

JUNG, J. H. et al. Phytochromes function as thermosensors in *Arabidopsis*. **Science (New York, N.Y.)**, v. 354, n. 6314, p. 886-889, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.aaf6005>

JUNG, J. H. et al. A prion-like domain in ELF3 functions as a thermosensor in *Arabidopsis*. **Nature**, v. 585, n. 7824, p. 256-260, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2644-7>

- KEHELPANNALA, C. et al. Naphthoquinone metabolites produced by *Monacrosporium ambrosium*, the Ectosymbiotic fungus of tea shot-hole borer, *Euwallacea fornicatus*, in stems of tea, *Camellia sinensis*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 44, n. 1, p. 95-101, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10886-017-0913-1>
- KIEBER, J. J.; SCHALLER, G. E. Cytokinin signaling in plant development. **Development**, v. 145, n. 4, p. 1-13, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1242/dev.149344>
- KRISTENSEN, S. B. et al. Simulation of electrochemical properties of naturally occurring quinones. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 13571, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-70522-z>
- KRUSKAL, W. H.; WALLIS, W. A. Use of ranks in one-criterion variance analysis. **Journal of the American Statistical Association**, v. 47, n. 260, p. 583–621, 1952. DOI: <https://doi.org/10.1080/01621459.1952.10483441>
- LAGO, A. et al. Atividade biológica das naftoquinonas e quinonas da espécie de bignoniaceae *Handroanthus serratifolius*. **Observatório de la Economía Latinoamericana**, v. 22, n. 1, p. 1529-1539, 2024. DOI: <https://doi.org/10.55905/oelv22n1-081>
- LAMBOLEZ, A. et al. Warm temperature promotes shoot regeneration in *Arabidopsis thaliana*. **Plant and Cell Physiology**, v. 63, n. 5, p. 618-634, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1093/pcp/pcac017>
- LEGRIS, M. et al. Phytochrome B integrates light and temperature signals in *Arabidopsis*. **Science (New York, N.Y.)**, v. 354, n. 6314, p. 897-900, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.aaf5656>
- LI, S. et al. The industrial applications of cassava: current status, opportunities and prospects. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 97, n. 8, p. 2282-2290. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1002/jsfa.8287>
- LIU, X. F. et al. Efficient propagation with in vitro seed germination of *Vanda falcata*. **Journal of Zhejiang University Science B**, v. 21, n. 12, p. 999-1004, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1631/jzus.B2000505>
- LIZÁRRAGA, A.; ASCASÍBAR, J.; GONZÁLEZ, M. L. Fast and effective thermotherapy treatment for in vitro virus eradication in apple and pear trees. **American Journal of Plant Sciences**, v. 8, n. 10, p. 2474–2482, 2017. DOI: <https://doi.org/10.4236/ajps.2017.810168>
- LUI, X. J. et al. The incorporation of coconut water and banana homogenate in the regeneration of fig (*Ficus carica* L.) cv. violette de solliès. **Malaysian Applied Biology**, v. 51, n. 5, p. 13-22, 2022. DOI: <https://doi.org/10.55230/mabjournal.v51i5.2327>

MAPAYI, E. F. et al. Optimization of in-vitro propagation of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) genotypes. **Journal of Agricultural Science**, v. 5, n. 3, p. 261-267, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.5539/jas.v5n3p261>

MBANJO, E. G. N. et al. Technological innovations for improving cassava production in Sub-Saharan Africa. **Frontiers in Genetics**, v. 11, p. 623736, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.623736>

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>

MURUGAN, T. et al. Molecular and histological validation of modified in ovulo nucellus culture based high-competency direct somatic embryogenesis and amplitude true-to-the-type plantlet recovery in *Kinnow mandarin*. **Frontiers in Plant Science**. v. 14, p. 1116151. DOI: [10.3389/fpls.2023.1116151](https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1116151)

NARMILAN, A.; PUVANITHA, N. The effect of different planting methods on growth and yield of selected of Cassava (*Manihot esculenta*) cultivars. **Agricultural Science Digest**. v. 40, n. 4, p.364-369. 2020. DOI: <http://dx.doi.org/10.18805/ag.D-272>

NASIB, A.; ALI, K.; KHAN, S. An optimized and improved method for the in vitro propagation of Kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) using coconut water. **Pakistan Journal of Botany**, v. 40, n. 6, p. 2355-2360, 2008.

NEELAKANDAN, A. K.; WANG, K. Recent progress in the understanding of tissue culture-induced genome level changes in plants and potential applications. **Plant Cell Rep**. v. 31, n. 4, 597-620, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00299-011-1202-z>

OLIVEIRA, R. P. D.; GOMES, T. D. S.; VILARINHOS, A. D. Avaliação de um sistema de micropropagação massal de variedades de mandioca. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, n. 12, p. 2329-2334, 2000. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2000001200002>

OTROSHY, M.; NAZARIAN, F.; STRUIK, P. C. Effects of temperature fluctuation during in vitro phase on in vitro microtuber production in different cultivars of potato (*Solanum tuberosum* L.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 98, n. 2, p. 213-218, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11240-009-9554-6>

PARMAR, A.; STURM, B.; HENSEL, O. Crops that feed the world: Production and improvement of cassava for food, feed, and industrial uses. **Food Security**, v. 9, n. 5, p. 907-927, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12571-017-0717-8>

PATEL, D.; FRANKLIN, K. A. Temperature-regulation of plant architecture. **Plant Signaling & Behavior**, v. 4, n. 7, p. 577–579, 2009. DOI: <https://doi.org/10.4161/psb.4.7.8849>

PEIXE, A. et al. Coconut water and BAP successfully replaced zeatin in olive (*Olea europaea* L.) micropropagation. **Scientia Horticulturae**, v.113, n. 1, p. 1-7. 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2007.01.011>

PRADES, A. et al. Coconut water uses, composition and properties: a review. **Fruits**, v. 67, n. 2, p. 87-107, 2012. DOI: <http://dx.doi.org/10.1051/fruits/2012002>

PRAKASH, S.; HOQUE, M. I.; BRINKS, T. Culture media and containers. In: AHLLOOWALIA, B. S. (ed.). **Low cost options for tissue culture technology in developing countries**. Viena: International Atomic Energy Agency, 2004. p. 29.

R Core Team. **R**: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2024. Disponível em: <https://www.R-project.org/>. Acesso: 06 de jun. 2024

ROCA, W. M. et al. Eliminación de virus y propagación de clones en la yuca (*Manihot esculenta* Crantz). In: ROCA, W. M.; MROGINSKI, L. A. (Ed.). **Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones**. Cali: CIAT, 1991. p. 403-420.

SANTOS, K. C. F. et al. In vitro multiplication of wild *Manihot* species with different naphthaleneacetic acid and benzylaminopurine concentrations. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 43, n. 1, p. e52866, 2021. DOI: <https://doi.org/10.4025/actascibiols.v43i1.52866>

SASAKI, Y.; SHOYAMA, Y.; SAITO, A. Studies on micropropagation of *Quercus acutissima* Carruth. **Journal of the Faculty of Agriculture, Kyushu University**, v. 38, n. 3/4, p. 287-294, 1994. DOI: <https://doi.org/10.5109/24060>

ŞEKERLİ, M. Season, thermotherapy and surface sterilization play important roles in microbial contamination of hazelnut in vitro cultures. **Plant Cell Tiss Organ Cult**, v. 157, n. 70, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11240-024-02799-1>

SEMBIRING, R.; HAYATI, M.; KESUMAWATI, E. Potato tuber (*Solanum tuberosum* L.) formation due to the application of different concentrations of coconut water in in-vitro. In: **Annual international conference (aic) on environmental and life sciences (ELS)**, 10., 2020, Banda Aceh. Anais [...]. Banda Aceh: IOP Publishing, 2021. v. 711. DOI: <https://doi.org/10.1088/1755-1315/711/1/012021>

SOUZA, R. A. V. et al. Effect of coconut water on growth of olive embryos cultured in vitro. **Ciência Rural**, v. 43, n. 2, p. 290-296, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0103-84782013000200016>

TOKUNAGA, H. et al. An efficient method of propagating cassava plants using aeroponic culture. **Journal of Crop Improvement**, v. 34, n. 1, p. 64-83, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1080/15427528.2019.1673271>

TREVISAN, F.; MENDES, B. M. J. Optimization of in vitro organogenesis in passion fruit (*Passiflora edulis* f. *Flavicarpa*). **Scientia Agricola**, v. 62, n. 4, p. 346-350, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0103-90162005000400007>

UTAMI, E. S. W.; HARIYANTO, S. Organic compounds: contents and their role in improving seed germination and protocorm development in orchids. **International Journal of Agronomy**, v. 2020, p. 2795108, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1155/2020/2795108>

VIVEK, M.; MODGIL, M. Elimination of viruses through thermotherapy and meristem culture in apple cultivar 'Oregon Spur-II'. **VirusDisease**, v. 29, n. 1, p. 75–82, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13337-018-0437-5>.

XALXO R. et al. Alteration in carbohydrate metabolism modulates thermotolerance of plant under heat stress. In: WANI, S. H.; KUMAR, V. (ed.). **Heat Stress Tolerance in Plants: Physiological, molecular and genetic perspectives**. 1. ed. Hoboken, NJ, EUA: John Wiley & Sons, 2020. cap. 5, p. 77-115. DOI: <https://doi.org/10.1002/9781119432401.ch5>

YARMUS, I. et al. Pathogen eradication in garlic in the phytobiome context: Should we aim for complete cleaning? **Plants**, v. 12, n. 24, p. 4125, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/plants12244125>.

YONG, J. W. H. et al. The chemical composition and biological properties of coconut (*Cocos nucifera* L.) water. **Molecules**, v. 14, n. 12, p. 5144-5164, 2009. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules14125144>

CAPÍTULO 2

Validação de protocolo com suplementação de água de coco e temperatura otimizada para o estabelecimento *in vitro* de ápices caulinares de mandioca

¹ Artigo a ser ajustado e submetido após definição da escolha do periódico científico

Validação de protocolo com suplementação de água de coco e temperatura otimizada para o estabelecimento *in vitro* de ápices caulinares de mandioca

RESUMO

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é uma das principais fontes de alimento e renda em regiões tropicais e subtropicais, sendo essencial para a segurança alimentar e o desenvolvimento socioeconômico de milhões de pessoas. Contudo, limitações como baixa produtividade, propagação de material infectado e perda de diversidade genética comprometem seu cultivo sustentável. A cultura de tecidos vegetais surge como ferramenta estratégica para a multiplicação e conservação de mandioca com alta qualidade fitossanitária. Neste contexto, este estudo objetivou validar um novo protocolo, baseada em um meio de cultura otimizado (4E com 10% de água de coco) e temperatura de 33 °C, para o estabelecimento *in vitro* de ápices caulinares de mandioca visando à multiplicação e conservação de genótipos com potencial de aplicação em programas de melhoramento genético. Foram utilizados 520 acessos, distribuídos em três quantidades: 2, 3 ou 4 ápices por acesso, totalizando 480 ápices por tratamento. O delineamento foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 520 (acesso) × 3 (quantidade de ápices), com tratamentos não balanceados e acessos não repetidos, configurando um ensaio de validação de protocolo com observações independentes. Para suporte estatístico, aplicaram-se testes não paramétricos de qui-quadrado e análise bootstrap, além de regressão logística binária, com $\alpha=0,05$. No estabelecimento *in vitro* dos ápices caulinares utilizou-se o meio 4E, suplementado com 10% (v/v) de água de coco, onde foram excisados 2, 3 ou 4 ápices por acesso conforme os tratamentos. Após 20 dias de incubação, avaliaram-se as taxas de sobrevivência dos ápices, de formação de calo e de formação de raiz, o número de miniestacas e a altura das brotações. As miniestacas <0,8 cm foram reinoculadas em meio 4E para seguir com a organogênese, enquanto aquelas $\geq 0,8$ cm foram transferidas para o meio MS0,01. Aos 45 dias da repicagem, avaliaram-se novamente as taxas de sobrevivência dos ápices, de formação de calo, o número de folhas, a altura da planta e o número de miniestacas produzido. Todas as etapas do experimento foram conduzidas em incubadoras BOD a 33 ± 1 °C, fotoperíodo de 16 h e densidade de fluxo de fótons de $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Na fase inicial, o meio 4E modificado apresentou alta eficiência, com taxa de sobrevivência >92% para todos os tratamentos. O uso de 2 ápices por acesso mostrou melhor desempenho quantitativo (221 acessos viáveis), sendo ideal para a inclusão de maior diversidade genética. Já os tratamentos com 3 e 4 ápices apresentaram maior eficiência qualitativa (taxas de sobrevivência de até 96,2%), maximizando o índice de pagamento. Na fase de multiplicação, observaram-se brotações vigorosas nos meios 4E e MS0,01; o MS0,01 favoreceu o enraizamento e o desenvolvimento final das miniestacas, enquanto o 4E manteve o potencial organogênico das brotações na reinoculação, garantindo a sobrevivência dos acessos com baixo desenvolvimento inicial. A metodologia proposta mostrou-se robusta, adaptável e com potencial para programas de micropropagação e conservação de germoplasma, possibilitando a introdução eficiente de acessos *in vitro* com baixo custo, devido a menor quantidade de material utilizado, e alta taxa de sucesso.

Palavras-chave: Conservação *in vitro*, cultivo de ápices meristemáticos, formação de calo, *Manihot esculenta* Crantz, metodologia.

Validation of a protocol with coconut water supplementation and temperature adjustment for the in vitro establishment of cassava shoot apices

ABSTRACT

Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) is one of the primary sources of food and income in tropical and subtropical regions, essential for food security and the socioeconomic development of millions of people. However, limitations such as low productivity, propagation of infected material, and loss of diversity compromise its sustainable cultivation. Plant tissue culture emerges as a strategic tool for the conservation and multiplication of cassava with high phytosanitary quality. In this context, this study aimed to validate a new methodology, based on a modified medium, for the in vitro establishment of cassava shoot apices targeting multiplication and conservation, with potential application in breeding programs. A total of 520 accessions from the Active Germplasm Bank of Embrapa Cassava and Tropical Fruits were used, distributed across three treatments: 240 accessions with 2 apices, 160 with 3 apices, and 120 with 4 apices, totaling 480 apices per treatment. Each accession was used only once, independently among treatments. The experiment followed a completely randomized design in a 520 (accessions) × 3 (apex numbers) factorial scheme, with unbalanced treatments and non-replicated accessions, configuring a methodology validation trial with independent observations. For statistical support, non-parametric tests, including chi-square and bootstrap analysis, in addition to binary logistic regression, were applied, with. For establishment, the 4E medium supplemented with 10% (v/v) coconut water was used, with 2, 3, or 4 apices excised per accession and inoculated according to the treatment. After 20 days of incubation, survival, callus formation, root formation, number of microcuttings, and shoot height were evaluated. Microcuttings < 0.8 cm were re-inoculated into fresh 4E medium to continue organogenesis, whereas those ≥ 0.8 cm were transferred to MS0.01. After 45 days of subculture, survival, callus formation, number of leaves, plant height, and number of microcuttings produced were re-evaluated. All experimental stages were conducted in BOD incubators at 33 ± 1 °C, with a 16-hour photoperiod and a photon flux density of 30 μmol m⁻² s⁻¹. In the initial phase, the modified 4E medium presented high efficiency, with survival rates > 92% for all treatments. The use of 2 apices per accession resulted in better quantitative performance (221 viable accessions), favoring the inclusion of greater genetic diversity. Treatments with 3 and 4 apices presented higher qualitative efficiency, with survival rates up to 96.2%, and are recommended to maximize establishment success. During the multiplication phase, vigorous shoots were observed in both 4E and MS0.01 media; MS0.01 favored rooting and final microcutting development, while 4E maintained the organogenic potential of shoots during re-inoculation, ensuring the survival of accessions with low initial development. The proposed methodology proved to be robust, adaptable, and with strong potential for micropropagation and germplasm conservation programs, enabling the efficient in vitro introduction of cassava accessions at low cost and with high success rates.

Keywords: Callus formation, in vitro conservation, *Manihot esculenta* Crantz, meristem tip culture, methodology.

1. INTRODUÇÃO

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é uma planta perene pertencente à família Euphorbiaceae, destacando-se por sua elevada produtividade calórica, eficiência biológica e ampla adaptação diversas condições de clima e solo. Consumida por mais de 800 milhões de pessoas, suas raízes e subprodutos constituem uma fonte acessível de carboidratos, especialmente para populações de baixa renda (HOOD et al., 2023). Além das raízes, toda a biomassa da mandioca pode ser aproveitada: as folhas são ricas em proteínas, vitaminas e minerais, enquanto os caules são utilizados como material de propagação (COLLAVINO et al., 2022).

Por ser propagada vegetativamente, a mandioca favorece a disseminação de pragas e doenças, especialmente viroses, que representam cerca de 68% das infecções relatadas por agricultores e comprometem a produtividade (AGRE et al., 2016). Além disso, a disponibilidade de material de plantio é limitada, o que restringe a expansão da cultura.

Nesse contexto, a biotecnologia, por meio da cultura de tecidos, surge como uma aliada estratégica, que além de proporcionar maior número de mudas, possibilita a limpeza clonal e, conseqüentemente, a erradicação de patógenos por meio da cultura de ápices caulinares (meristemas associados a 2-3 primórdios foliares). Essa técnica consiste na excisão de ápices caulinares extremamente pequenos, visando remover os tecidos infectados sem causar danos à região meristemática. A manutenção dos primórdios foliares garantem a sobrevivência e recuperação desses minúsculos explantes (WANG; VALKONEN, 2008, 2009; CRUZ-CRUZ; GONZÁLEZ-ARNAO; ENGELMANN, 2013; COSTA et al., 2019). Esses ápices caulinares, caracterizados pela ausência de vascularização, apresentam elevada eficácia na eliminação de vírus (IOIO et al., 2008; GHAEMIZADEH et al., 2014), sendo que a obtenção de plantas livres de vírus é essencial para o sucesso dos programas de melhoramento genético e para assegurar a troca segura de materiais vegetais em nível internacional (WANG; VALKONEN, 2009).

O protocolo de introdução *in vitro* da mandioca utiliza o meio 4E, desenvolvido por Roca et al. (1984, 1991) a partir do meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), que é composto por sais minerais, vitaminas, sacarose e reguladores de crescimento ANA, BAP e AG3. No entanto, apesar dos avanços

obtidos, a eficiência do estabelecimento ainda apresenta limitações. Para contornar esse problema, foi adotado um protocolo adaptado, que associa a suplementação com água de coco (AC) ao ajuste da temperatura, visando potencializar o desenvolvimento dos ápices caulinares e elevar a taxa de recuperação a níveis mais satisfatórios.

A adição de AC (10% v/v) ao meio de cultura, por ser rica em açúcares, minerais e fitorreguladores naturais, contribui para otimizar a organogênese e aumentar a sobrevivência dos explantes (DEPEINT et al., 2006; DAUD et al., 2011; AKHIRIANA; SAMANHUDI; YUNUS, 2019; AISHWARYA; SEENIVASAN; NAIK, 2022). Estudos demonstram que essa suplementação orgânica, em sinergia com os fitorreguladores sintéticos, favorece um desenvolvimento mais equilibrado e promove maior alongamento dos brotos (FEYISA, 2021), aspecto crucial para a micropropagação e a conservação de germoplasma (ROCA et al., 1991).

A temperatura exerce um papel determinante no cultivo *in vitro*, sendo 33 °C considerada ideal para o estabelecimento de ápices caulinares de *M. esculenta*. Nessa condição, observa-se maior potencial de crescimento inicial em meio 4E, especialmente quando suplementado com AC, conforme evidenciado por Silva Neto et al. (dados não publicados), ainda que esse valor difira das temperaturas-padrão descritas na literatura (SOUZA et al., 2008; KAUR; MUDGAL, 2021).

A conservação *in vitro* desempenha papel fundamental na preservação de germoplasma, protegendo-o contra intempéries e doenças (LEMOS et al., 2002). Sua eficiência depende de protocolos bem estabelecidos de introdução e micropropagação (WANG et al., 2004; SCHERWINSKI-PEREIRA; COSTA, 2010; MENEGAZZO et al., 2019), bem como das etapas de alongamento/enraizamento e aclimatização (MONTHONY et al., 2021a).

O objetivo deste estudo foi validar, em larga escala, uma metodologia de estabelecimento *in vitro* de ápices caulinares de mandioca, modificada pela adição de 10% de água de coco ao meio de cultivo e sob temperatura de 33 °C, bem como avaliar o efeito do número de ápices por acesso (2, 3 e 4) sobre a eficiência do processo, com ênfase na viabilidade quantitativa e qualitativa do número de ápices. Ao integrar validação em larga escala e definição de parâmetros críticos, o estudo visa otimizar a conservação de germoplasma e a micropropagação da cultura.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local do experimento

O experimento foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos do Núcleo de Biologia Avançada da Embrapa Mandioca e Fruticultura, em Cruz das Almas, Bahia.

Os explantes utilizados nos experimentos foram obtidos a partir de brotações de manivas de plantas pertencentes à coleção do Banco Ativo de Germoplasma (BAG) de mandioca, mantido no campo experimental da Embrapa Mandioca e Fruticultura.

2.2 Meio de cultivo

Como meio de cultivo foi utilizado o 4E, adaptado por Roca et al. (1991), sendo constituído pelos macronutrientes e micronutrientes do MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com 1 mg L⁻¹ de tiamina-HCl, 100 mg L⁻¹ de mio-inositol e os reguladores de crescimento ácido 1-naftalenoacético (ANA, 0,02 mg L⁻¹), 6-benzilaminopurina (BAP, 0,04 mg L⁻¹) e ácido giberélico (AG₃, 0,05 mg L⁻¹), além de 20 g L⁻¹ de sacarose. O meio foi acrescido de 10% (v/v) de AC obtida de frutos verdes, que foi filtrada em papel de filtro simples para remover copra e mesocarpo, antes da adição ao meio. O pH foi ajustado para 5,8, o meio solidificado com 2,4 g L⁻¹ de Phytigel® e posteriormente autoclavado por 20 minutos a 129 °C.

2.3 Estabelecimento *in vitro* de ápices caulinares

Ápices caulinares de 520 acessos de mandioca do BAG da Embrapa Mandioca e Fruticultura foram utilizados como fonte de explantes. Para tanto, manivas de aproximadamente 20 cm foram plantadas em vasos com substrato, permanecendo em casa de vegetação até o surgimento de brotações. As brotações obtidas, com cerca de 2 cm de comprimento, foram coletadas, colocadas em recipientes contendo água de osmose reversa e transportadas ao Laboratório de Cultura de Tecidos.

Posteriormente, em câmara de fluxo laminar, os ápices foram desinfestados, inicialmente em álcool 50% por 3 minutos e, em seguida, em hipoclorito de sódio a 0,25% de cloro ativo por 3 minutos, seguido de três lavagens com água de osmose reversa autoclavada. Com o auxílio de microscópio

estereoscópico, os ápices terminais desinfectados foram reduzidos a 0,2 mm-0,3 mm, mantendo-se um ou dois primórdios foliares. Dependendo do tratamento, foram excisados 2, 3 ou 4 ápices por acesso e inoculados no meio de cultivo 4E, suplementado com 10% (v/v) de AC.

2.4 Condições de cultivo e avaliações

Logo após a inoculação no meio de cultura 4E, os tubos de ensaio contendo os ápices foram acondicionados em câmaras BODs a 33 ± 1 °C, sob fotoperíodo de 16 horas e densidade de fluxo de fótons de $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Aos 20 dias, foram avaliadas as seguintes variáveis: desenvolvimento das brotações (sim/não), formação de raízes (sim/não), contaminação, formação de calo (sim/não), altura das brotações (cm), número de miniestacas e validação do protocolo de estabelecimento (acessos que apresentaram desenvolvimento e foram efetivamente estabelecidos) (etapa 1 – estabelecimento *in vitro*).

Após essa avaliação, miniestacas com menos de 0,8 cm foram reinoculadas em meio 4E, enquanto aquelas com 0,8 cm ou mais foram transferidas para meio de cultura de multiplicação MS 0,01 (SOUZA et al., 2008). Aos 45 dias da repicagem, foram realizadas novas avaliações (não destrutivas) das variáveis: contaminação, altura de planta (cm, em papel milimetrado autoclavado), número de miniestacas e confirmação da validação na multiplicação (plantas que apresentaram desenvolvimento) (etapa 2 – multiplicação).

2.5 Delineamento experimental e análise estatística

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 520 (acessos) \times 3 (quantidades de ápices: 2, 3 e 4), com distribuição independente: 2 ápices para 240 acessos (totalizando 480 ápices), 3 ápices para 160 acessos (480 ápices) e 4 ápices para 120 acessos (480 ápices). A unidade experimental consistiu em um ápice meristemático cultivado em tubo de ensaio.

Para a análise dos dados da introdução *in vitro* de ápices de mandioca, empregaram-se as seguintes abordagens estatísticas: teste qui-quadrado, utilizado para avaliar associações entre variáveis categóricas, incluindo formação de calo, sucesso na introdução e repicagem, formação radicular e seleção do meio de cultivo, e análise descritiva, quando a sobrevivência dos acessos foi quantificada

por meio de tabelas de contingência, apresentando frequências absolutas e relativas em cada fase experimental. Para a visualização de dados, boxplots foram construídos para comparar a distribuição da altura das brotações em relação à formação de calo e ao número de ápices introduzidos, incluindo análise estratificada por grupos de ápices.

Para modelagem estatística, empregou-se a regressão logística binária para avaliar preditores de eventos dicotômicos e análise de bootstrap (CHERNICK, 2007) para estimar intervalos de confiança da diferença entre medianas.

Todas as análises foram implementadas no ambiente R (R Core Team, 2024), com nível de significância estabelecido em $\alpha=0,05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Relação entre variáveis independentes, categóricas e eficiência do protocolo

O teste de qui-quadrado, das variáveis binárias analisadas após 20 dias de cultivo, não evidenciou associação significativa entre o número de ápices por acesso (NAP) e a taxa de validação inicial (sobrevivência, VL1) no estabelecimento *in vitro* de ápices caulinares de mandioca ($p = 0,233$; $\alpha = 0,05$), assim como na confirmação da validação no início da etapa de multiplicação (VL2). Esse resultado indica que a eficiência de estabelecimento e da multiplicação subsequente são independentes do número de ápices utilizados, demonstrando que a nova metodologia mantém elevada eficiência operacional mesmo com redução da quantidade de explantes, sem comprometer a taxa de sucesso (Tabela 1).

Tabela 1. Teste de qui-quadrado para formação de calos e de raiz, validação da metodologia e do meio de cultura na 1ª repicagem, em resposta ao número de ápices na validação de protocolo de introdução de acessos de mandioca em meio 4E suplementado com AC, após 20 dias de incubação a 33 ± 1 °C.

NAP	FC		FR		VL1		VL2		Meio	VMR	
	S	N	S	N	S	N	S	N		S	N
2	149 ¹	72	27	194	221	19	202	38	4E	150	20
	147,18 ²	73,82	44,38	176,62	225,23	14,77	211,38	28,62		159,55	10,45
	0,35 ^{3 ns}	-0,35 ^{ns}	-3,95 ^{***}	3,95 ^{***}	-1,55 ^{ns}	1,55 ^{ns}	-2,55 [*]	2,55 [*]		-3,77 ^{***}	3,77 ^{***}
3	95 ¹	59	64	90	154	6	145	15	MS0,01	308	10
	102,56 ²	51,44	30,93	123,07	150,15	9,85	140,92	19,08		298,45	19,55
	-1,56 ^{3 ns}	1,56 ^{ns}	8,04 ^{***}	-8,04 ^{***}	1,52 ^{ns}	-1,52 ^{ns}	1,20 ^{ns}	-1,20 ^{ns}		3,77 ^{***}	-3,77 ^{***}
4	81 ¹	32	7	106	113	7	111	9			
	75,26 ²	37,74	22,69	90,31	112,62	7,38	105,69	14,31			
	1,31 ^{3 ns}	-1,31 ^{ns}	-4,20 ^{***}	4,20 ^{***}	0,17 ^{ns}	-0,17 ^{ns}	1,70 ^{ns}	-1,70 ^{ns}			
χ^2	3,0487		66,3550		2,9137		6,7191			12,8120	
V de Cramer	0,0790		0,3687		0,0748		0,1137			0,1620	
p-value	0,2178		3,90E-15		0,2330		0,0347			0,0003	
GL⁴					2					1	

* ns, não significativo; *p < 0.05; ***p < 0.001; ¹fo: frequência observada; ²fe: frequência esperada; ³rp: valor do resíduo padronizado ajustado e significância; ⁴GL: grau de liberdade; $p \leq 0,05$ H₁ a ocorrência depende do número de ápices introduzido, $p > 0,05$ H₀ a ocorrência não depende do número de ápices. (S) sim; (N) não; (FC) formação de calo; (FR) formação de raiz; (VL1) validação do protocolo no estabelecimento, (VL2) validação do protocolo no início da multiplicação e (VMR) validação do meio de repicagem.

A análise dos resíduos padronizados ajustados (3rp) corroborou esse achado, uma vez que não foram observadas discrepâncias relevantes entre frequências observadas e esperadas. Tal evidência reforça que a metodologia, além de robusta, permite otimizar recursos - reduzindo custos, tempo de trabalho e material biológico - e ampliar o estabelecimento *in vitro* sem perda de desempenho, favorecendo maior rendimento nas fases subsequentes (multiplicação) do cultivo *in vitro*.

Em contraste com a calogênese, a formação de raízes (FR) apresentou dependência estatisticamente significativa em relação ao número de ápices por acesso (NAP) ($p = 3,90 \times 10^{-15}$), observando-se uma influência altamente positiva para a formação de raízes na quantidade de 3 ápices por acesso. No entanto, para as quantidades de 2 e 4 ápices, a contribuição foi positiva para a ausência de raízes, principalmente na quantidade de 4 ápices por acesso. Esse comportamento pode estar relacionado não apenas com a composição do meio de cultura - em especial a presença de AC e reguladores sintéticos - mas também com a interação entre a ampla diversidade genotípica dos 520 acessos e a capacidade morfogênica intrínseca dos tecidos, fatores reconhecidamente moduladores do balanço hormonal e da indução de estruturas radiculares (ROCA et al., 1984; OLIVEIRA; GOMES; VILARINHOS, 2000; MUKIESE et al., 2015; RASPOR et al., 2021).

Por outro lado, a formação de calo na base das brotações, fenômeno amplamente descrito na etapa de estabelecimento *in vitro* de mandioca (ROCA et al., 1984; SOUZA et al., 2008; OLIVEIRA; GOMES; VILARINHOS, 2000; CACAI et al., 2012; FAYE et al., 2015; MUKIESE et al., 2015; COROZO et al., 2020), não apresentou associação significativa com o NAP neste estudo ($p = 0,2178$), embora tenha ocorrido de forma predominante na maioria dos explantes. A literatura indica que a calogênese nessa fase é praticamente inevitável, variando em intensidade de acordo com genótipo, meio de cultura e condições físicas, e está diretamente relacionada à combinação de reguladores de crescimento e às características intrínsecas de cada cultivar (ROCA et al., 1984; OLIVEIRA; GOMES; VILARINHOS, 2000; CACAI et al., 2012; FAYE et al., 2015; MUKIESE et al., 2015; COROZO et al., 2020). Observou-se também, que a presença e o tamanho desses calos estiveram associados a um maior desenvolvimento da parte aérea dos ápices introduzidos, comportamento

também reportado por Oliveira, Gomes, Vilarinhos (2000) e Mukiese et al. (2015) para determinados genótipos. Esse tipo de calo, de tamanho variado, localizado e não organogênico, é considerado como resposta adaptativa inicial ao cultivo *in vitro*, não comprometendo a estabilidade genética e podendo até facilitar o enraizamento subsequente, quando controlado em protocolos relacionados com os ápices meristemáticos. Além do mais, na fase de estabelecimento da ampla quantidade de acessos, com esta metodologia, as brotações foram subcultivadas por apenas 20 dias, quando se procedeu a eliminação das folhas e do calo basal e em seguida inoculação das miniestacas nos meios de cultivo MS0,01 e 4E, sendo subcultivadas por 45 dias.

Por fim, após 45 dias de cultivo em meio fresco (fase de multiplicação) nova avaliação para validação pós-repicagem (VL2) - correspondente ao desenvolvimento das miniestacas na etapa de multiplicação - evidenciou diferenças significativas no desempenho dos explantes ($p = 0,00034$), demonstrando que ambos os meios contribuíram para o sucesso do estabelecimento e cultivo *in vitro* dos diversos acessos. O meio MS0,01, recomendado por Souza et al. (2008), apresentou ótimos resultados, confirmando sua adequação para a etapa de multiplicação *in vitro* e do meio 4E para continuação da organogênese. Esses achados corroboram as recomendações de Roca et al. (1984) e Souza et al. (2008), que indicam o uso do meio 4E para a reinoculação de brotações menos desenvolvidas (<0,8 cm), prosseguindo com a indução da organogênese, e ressaltam a superioridade do MS0,01 para a fase de multiplicação. Resultados semelhantes foram observados por Mapayi et al. (2013) e de Sá et al. (2018), os quais demonstraram que o meio MS otimiza a morfogênese de tecidos vegetais, promovendo desenvolvimento de parte aérea após a fase de estabelecimento. O coeficiente V de Cramer, variando entre 0,07 e 0,37, reforçou essa interpretação, apontando associações de intensidade fraca a moderada entre as variáveis analisadas, com destaque para a formação de raízes, que apresentou o efeito mais elevado (0,37).

Vale ressaltar que Roca et al. (1991) e Souza et al. (2008) fazem recomendações para que os ápices introduzidos e de tamanho muito pequeno retorne ao meio 4E (organogênico) para prosseguir com a indução morfogênica e obtenção de brotações perfeitas, o que foi comprovado neste experimento com

o baixo índice de morte neste meio na etapa pós estabelecimento (Tabela 3), com formação de planta completa.

De acordo com Feyisa (2021), os protocolos de estabelecimento e micropropagação devem ser suficientemente flexíveis para se adaptarem a diferentes genótipos e condições experimentais, garantindo tanto a multiplicação eficiente quanto a manutenção da fidelidade genética. Estudos recentes, como Raspor et al. (2021) e Ahmed (2022), também enfatizam que a seleção do meio adequado influencia diretamente o vigor e a capacidade regenerativa das brotações, sustentando a manutenção da atividade meristemática e favorecendo o avanço para as fases posteriores. Essa premissa fundamenta a escolha da metodologia adotada neste estudo como uma estratégia confiável para a conservação e o melhoramento genético da mandioca.

Na fase de estabelecimento dos ápices, a sobrevivência dos acessos foi superior a 92% em todas as condições testadas, apresentando superioridade qualitativa para o uso de 3 ápices. Nos tratamentos com 2 ápices, foram obtidos 221 acessos *in vitro* (92,1%), enquanto os tratamentos com 3 e 4 ápices apresentaram 154 (96,2%) e 113 (94,2%) acessos estabelecidos, respectivamente.

No início da multiplicação, os resultados mostraram comportamento diferenciado. O tratamento com 2 ápices manteve a maior quantidade absoluta de acessos viáveis, com 202 (84,2%), ou seja, 57 e 91 acessos a mais do que os tratamentos com 3 e 4 ápices, respectivamente. Entretanto, em termos percentuais, os tratamentos com 3 e 4 ápices apresentaram melhor desempenho, com taxas de sucesso final de 90,6% e 92,5%, contra 84,2% do tratamento com 2 ápices. A taxa de mortalidade também apresentou diferenças entre os grupos.

Dessa forma, o protocolo de introdução *in vitro* de ápices caulinares de mandioca em meio 4E, suplementado com AC e incubado a 33 °C demonstrou alta eficiência, conforme mostra os dados da Tabela 2.

Embora a utilização de 2 ápices permita estabelecer um maior número inicial de acessos (240), as estratégias com 3 e 4 ápices demonstraram maior eficiência no início da fase de multiplicação, com taxas de sobrevivência na etapa de multiplicação de 90,6% e 92,5%, respectivamente.

Tabela 2. Sobrevivência e mortalidade de explantes de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) estabelecidos *in vitro* em função do número de ápices por acesso (2, 3 e 4), com resultados expressos por ápice (n = 480 em cada tratamento) e por acesso (n ajustado) nas diferentes fases de cultivo (estabelecimento no meio 4E e primeira repicagem nos meios MS0,01 ou 4E).

N° de ápices Introduzidos / total	Introdução meio 4E (20 dias)		1ª Repicagem MS 0,01		1ª Repicagem 4E		Total de Vivos	Total de Mortos
	Sobrevivência	Mortos	Sobrevivência	Mortos	Sobrevivência	Mortos		
Ápices N (%)								
2 (n=480)	372 (77,5%)	108 (22,5%)	215 (57,8%)	30 (8,1%)	96 (25,8%)	31 (8,3%)	311 (64,8%)	169 (35,2%)
3 (n=480)	411 (85,6%)	69 (14,4%)	205 (49,9%)	20 (4,8%)	152 (37,0%)	34 (8,3%)	357 (74,4%)	123 (25,6%)
4 (n=480)	410 (85,4%)	70 (14,6%)	216 (52,7%)	4 (1,0%)	156 (38,0%)	34 (8,3%)	372 (77,5%)	108 (22,5%)
Acessos N (%)								
2 (n=240)	221 (92,1%)	19 (7,9%)	148 (67,0%)	8 (3,6%)	54 (24,4%)	11 (5,0%)	202 (84,2%)	38 (15,8%)
3 (n=160)	154 (96,2%)	6 (3,8%)	85 (55,2%)	2 (1,3%)	60 (39,0%)	7 (4,5%)	145 (90,6%)	15 (9,4%)
4 (n=120)	113 (94,2%)	7 (5,8%)	74 (65,5%)	0	37 (32,7%)	2 (1,8%)	111 (92,5%)	9 (7,5%)
Diferenças entre os grupos de ápices introduzido em quantidade de acessos N (%)								
2 x 3	67 (43,5%)	-	-	-	-	-	57 (39,3%)	-
2 x 4	108 (95,6%)	-	-	-	-	-	91 (82,0%)	-
3 vs 4	41 (36,3%)	-	-	-	-	-	34 (30,6%)	-

Notas: Valores apresentados como número absoluto seguido da porcentagem relativa ao total de ápices ou acessos por tratamento (n (%)). Cada tratamento correspondeu a 480 ápices, obtidos de 240 acessos × 2 ápices, 160 acessos × 3 ápices e 120 acessos × 4 ápices

A alta taxa de sobrevivência inicial, superior a 92% em todos os tratamentos, supera os resultados obtidos por Oliveira, Gomes, Vilarinhos (2000), evidenciando a superioridade da metodologia aprimorada no capítulo 1, que incorpora o uso de AC e temperatura de incubação otimizada. Conforme apontado por Mapayi et al. (2013), ajustes no ambiente de cultivo, como a temperatura e a suplementação nutricional, podem elevar significativamente as taxas de recuperação e viabilidade dos explantes.

A análise dos dados da Tabela 2 mostra que, embora o número de ápices por acesso não influencie significativamente a sobrevivência no estabelecimento, a utilização de 3 ou 4 ápices resulta em maior eficiência na etapa de multiplicação. O tratamento com 2 ápices, ainda que vantajoso em número de acessos introduzidos *in vitro*, apresentou taxa de sobrevivência inferior, na etapa de multiplicação (84,2%). Já as estratégias com 3 e 4 ápices parecem oferecer uma forma de redundância biológica, compensando eventuais perdas de ápices individuais durante o primeiro cultivo (multiplicação). Essa abordagem é especialmente relevante para acessos de maior valor genético ou com histórico de baixa resposta *in vitro* (recalcitrância).

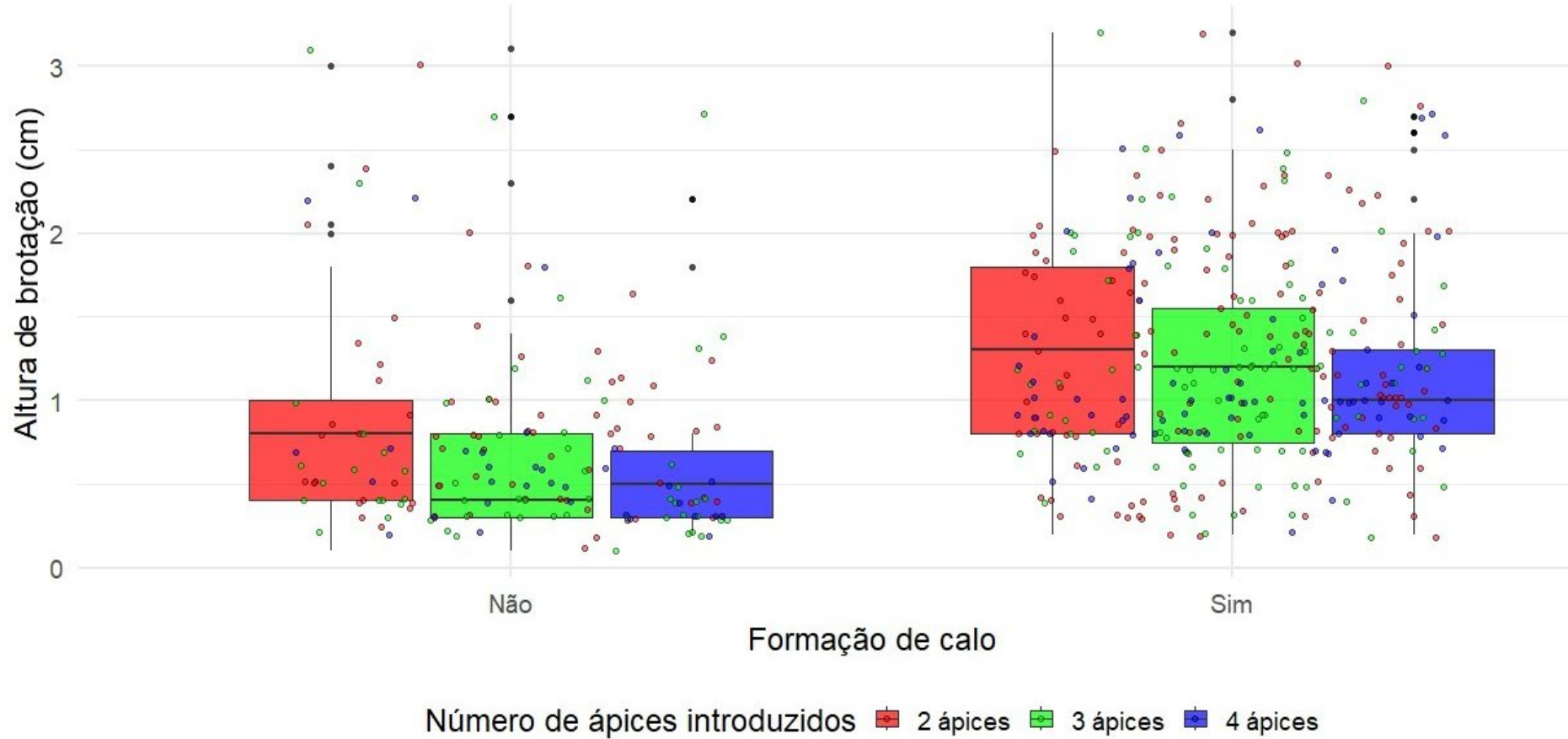
O uso de 3 ápices por acesso se destaca como a estratégia mais equilibrada, aliando boa taxa de sucesso à manutenção de custos operacionais moderados. Por outro lado, a estratégia com 2 ápices pode ser mais indicada quando a prioridade é o processamento rápido e em larga escala de acessos, especialmente em situações em que o tempo é um fator limitante.

Essa consistência, observada nos 520 acessos testados, confirma a efetividade do método e sua adaptabilidade a diferentes densidades de explantes. Esses resultados oferecem subsídios valiosos para a seleção estratégica mais adequado, seja para fins de conservação ou multiplicação de germoplasma de mandioca.

3.2. Altura das Brotações no estabelecimento dos acessos

A análise da altura das brotações (Figura 1) em função da formação de calo e do número de ápices introduzidos (NAP) revelou padrões distintos. Para os explantes que não apresentaram calo, a mediana da altura foi inferior a 1 cm, com maior dispersão dos dados, conforme evidenciado pelos amplos intervalos interquartis e pela presença de valores atípicos.

Figura 1. Altura das brotações (cm) na fase de introdução *in vitro*, comparando explantes com e sem formação de calo, estratificados por número de ápices (2, 3 ou 4), com disposição dos valores observados, medianas e intervalo interquartil (25-75%).



Já os explantes que apresentaram calo exibiram alturas medianas superiores, próximas ou acima de 1,5 cm, com menor variabilidade. Essa diferença de distribuição sugere que a presença da estrutura basal, mesmo que não diretamente envolvida na recuperação, esteve associada a um crescimento inicial mais vigoroso e uniforme das brotações. Em todos os grupos de número de ápices (2, 3 ou 4), essa tendência foi mantida, embora as diferenças entre os NAPs não tenham sido estatisticamente significativas.

As brotações originadas de ápices caulinares, com ou sem formação de calo, refletem respostas fisiológicas aos estímulos hormonais presentes no meio 4E suplementado com AC. De acordo com Bidabadi e Jain (2020), embora em algumas espécies a calogênese, no estabelecimento, seja necessária à regeneração, na multiplicação da mandioca ocorre preferencialmente por organogênese direta, sem obrigatoriedade da formação de calo.

Neste estudo, a presença de estruturas basais associou-se às brotações mais vigorosas, possivelmente estimuladas pela composição e suplementação hormonal do meio, principalmente pelo balanço entre auxinas e citocininas, como destacam Raspor et al. (2021) e Ibáñez et al. (2020).

A ausência de efeito estatisticamente significativo do número de ápices sobre a altura das brotações confirma a robustez do protocolo aperfeiçoado, sendo consistente com os resultados de Mukiese et al. (2015), que destacaram a eficiência da recuperação *in vitro* de diferentes genótipos de mandioca por meio da cultura de ápices meristemáticos.

Por outro lado, a maior variabilidade (dispersão) observada nos explantes sem formação de calo basal reforça a necessidade de otimizar tanto a formulação do meio quanto as condições ambientais, conforme sugerem Raspor et al. (2021).

Com base nos resultados obtidos, recomenda-se que os protocolos de introdução *in vitro* da mandioca priorizem meios com proporções equilibradas de auxinas e citocininas, visando à indução organogênica, aprimorado pela suplementação de AC. A formação de calo, nesse contexto, deve ser considerada apenas como um indicativo secundário, não essencial para a recuperação. Essa estratégia representa um avanço significativo para o aprimoramento da cultura de tecidos da espécie, conforme destacado por Bidabadi e Jain (2020), Ibáñez et al. (2020) e Raspor et al. (2021).

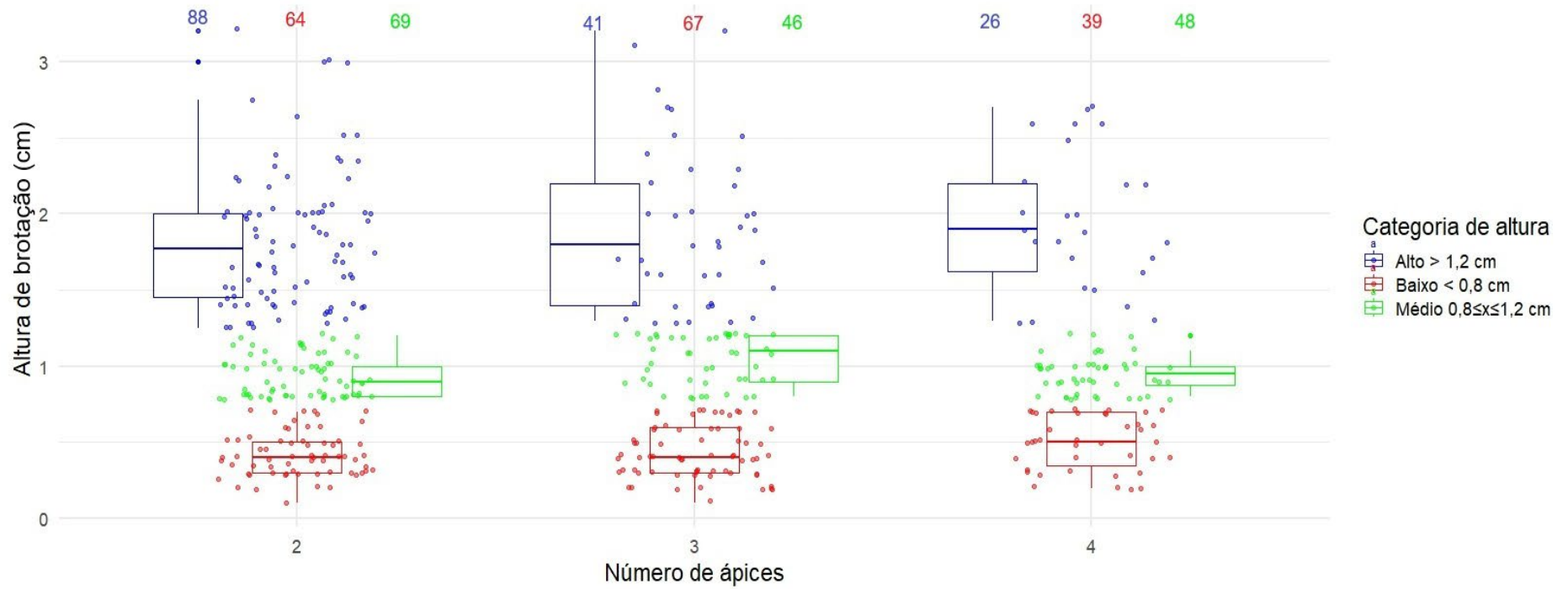
A Figura 2 apresenta a distribuição da altura das brotações foram categorizadas em baixa (< 0,8 cm), média (0,8–1,2 cm) e alta (> 1,2 cm), de acordo com o número de ápices introduzidos (2, 3 ou 4). Em todos os grupos de NAP, a maioria das brotações concentrou-se nas categorias baixa e média, enquanto uma menor proporção alcançou alturas superiores a 1,2 cm, com destaque para o grupo de 2 ápices.

Os boxplots indicam variabilidade nas alturas dentro de cada grupo de NAP, com medianas levemente superiores nos tratamentos com 3 e 4 ápices. Apesar dessa leve flutuação, a tendência predominante foi o acúmulo de brotações nas faixas baixa e média, independentemente do número de ápices.

A categorização da altura das brotações associada à validação dos acessos fornece uma abordagem prática para avaliar a eficiência do protocolo de introdução *in vitro*. A predominância de brotações nas categorias baixa e média em todos os grupos de NAP confirma que o número inicial de ápices não foi o principal fator determinante para o desempenho inicial, corroborando os achados de Mapayi et al. (2013).

A quantidade absoluta de acessos validados na categoria alta foi superior no grupo com 2 ápices (88 acessos) em comparação aos grupos com 3 (41 acessos) e 4 ápices (26 acessos). Este resultado sugere que, embora o uso de mais ápices aumente o número total de explantes, pode não favorecer proporcionalmente o desenvolvimento vigoroso das brotações na fase de estabelecimento.

Figura 2. Distribuição da altura das brotações (cm) na fase de estabelecimento *in vitro* de mandioca, estratificada por número de ápices introduzidos (2, 3 ou 4) e categorias de desenvolvimento: baixa (< 0,8 cm), média (0,8–1,2 cm) e alta (> 1,2 cm). Os números na parte superior indicam a quantidade de acessos validados em cada categoria de altura.



Uma explicação para esse desempenho superior nos acessos com 2 ápices pode estar relacionada ao menor tempo decorrido entre a coleta das manivas, a retirada dos ápices meristemáticos e sua inoculação no meio de cultura, reduzindo o estresse fisiológico dos tecidos. Como a cada acesso com 4 ápices corresponde, proporcionalmente, a 2 acessos com 2 ápices, o processamento de explantes em menor número por acesso favoreceu o manuseio mais rápido de um maior número de acessos, preservando a viabilidade e potencial morfogênico. No entanto, essa hipótese ainda requer investigação mais aprofundada para ser confirmada.

A baixa proporção de brotações classificadas como altas (> 1,2 cm) em todos os grupos reforça a necessidade de otimização do protocolo, especialmente no que se refere ao equilíbrio hormonal e às condições de cultivo. Estudos como os de Kabir et al. (2015) e Sessou et al. (2020) apontam que o ajuste fino das concentrações de citocininas e auxinas pode estimular o crescimento mais vigoroso já nas fases iniciais.

Além disso, a fase de estabelecimento *in vitro* prioriza a sobrevivência e o início da brotação, não necessariamente o alongamento imediato. De acordo com Roca et al. (1984) e Souza et al. (2008; 2009), brotações entre 0,8 e 1,2 cm já são adequadas para o avanço das etapas de multiplicação, menores que isso recomenda-se retornar ao meio organogênico 4E.

Além do meio de cultura, fatores extrínsecos como temperatura e luminosidade também influenciam o crescimento das brotações. Variações ambientais de temperaturas foram testadas (27, 29, 31, 33 e 35 °C), no capítulo 1, para a determinação desta metodologia, estabelecendo a temperatura de 33 °C como a mais vantajosa no estabelecimento dos ápices de 10 acessos de mandioca, trabalhos como o de Tadesse et al. (2001), com micropropagação de batata, demonstraram que diferenças de temperatura podem afetar significativamente o desenvolvimento vegetativo, o número de folhas e a área foliar, destacando a importância de um ambiente controlado, com ajuste fino, para garantir uniformidade no crescimento inicial.

Portanto, enquanto o número de ápices não influenciou significativamente a altura das brotações, a otimização do manuseio inicial, do meio de cultura e das condições ambientais pode ser mais determinante para ampliar a proporção de brotações vigorosas e uniformes na micropropagação de mandioca.

3.3. Modelagem preditiva do sucesso da introdução *in vitro* via regressão logística

Para avaliar a influência dos fatores morfofisiológicos sobre o sucesso da introdução *in vitro*, empregou-se o modelo logístico geral:

$$\text{logit}(p) = \ln\left(\frac{p}{1-p}\right) = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \dots + \beta_k X_k$$

Aqui:

- p = probabilidade do evento (sucesso);
- $\text{logit}(p)$ = logaritmo da razão de chances (odds);
- β_0 = intercepto (valor do logit quando todos os $X_i=0$);
- β_i = coeficientes logísticos associados às variáveis X_i .

em que p representa a probabilidade do evento de interesse (formação de calo, validação inicial, escolha do meio MS0,01), β_0 é o intercepto (log odds na ausência de efeitos) e β_i são os coeficientes logísticos de cada variável independente X_i , que corresponderam à altura da brotação, número de ápices, validação prévia do protocolo e número de miniestacas. Os valores das estimativas (β), erros padrão, z-scores, p-valores, odds ratios e IC95% encontram-se na Tabela 3.

Os modelos de regressão logística aplicados às variáveis morfofisiológicas revelaram padrões relevantes na metodologia de introdução *in vitro* da mandioca. A formação de calo apresentou associação significativa com a altura das brotações na fase de introdução. Especificamente, brotações mais altas apresentaram uma chance 5,2 vezes maior de serem oriundas de explantes que formaram calo na base (OR = 5,20; IC 95%: 3,45–8,14; $p < 0,001$) (Tabela 3). O modelo indica que a maior altura da brotação é um forte preditor da formação de calo, sugerindo que esses dois eventos morfofisiológicos estão intrinsecamente associados no estágio inicial de desenvolvimento, observado no Quadro A.1 (Apêndice A).

A introdução de dois ápices por acesso resultou em uma elevada taxa de sobrevivência (92,1%). A inclusão de três ápices aumentou a chance de sucesso em 2,21 vezes (OR = 2,2066; $p = 0,099$) e de quatro ápices em 1,39 vezes (OR = 1,3878; $p = 0,473$), embora sem significância estatística. Observou-se uma tendência de redução da mortalidade com o aumento no número de ápices: 5,0% para dois ápices, 4,5% para três e 1,8% para quatro no meio 4E na etapa de multiplicação (Tabela 2).

Tabela 3. Estimativas dos coeficientes logísticos (β), erros padrão, estatística z, p-valores, odds ratios e intervalos de confiança (IC95%) para os fatores avaliados (formação de calo, número de ápices e meio de repicagem) sobre parâmetros morfofisiológicos (altura da brotação, validação inicial e número de miniestacas) na introdução *in vitro* de ápices de mandioca. β_0 = intercepto (log odds na ausência de efeitos); β_i = coeficientes logísticos das variáveis independentes.

Termo	Estimativa β	Erro Padrão	z-score	p-value ^b	Odds ratio	IC 95 Inferior ^c	IC 95 Superior ^c
Predição da formação de calo (FC1^a) pela altura da planta (AP)							
Intercept	-0,8694	0,2110	-4,1203	3,78E-05	0,4192	0,2751	0,6299
AP1	1,6489	0,2188	7,5364	4,83E-14	5,2014	3,4467	8,1362
Influência da quantidade de ápices (NAP^a) no sucesso da introdução (VL1)^d							
Intercept	2,4537	0,2391	10,2634	1,03E-24	11,6316	7,4893	19,2199
NAP3	0,7915	0,4799	1,6492	9,91E-02	2,2066	0,9094	6,1735
NAP4	0,3278	0,4570	0,7172	4,73E-01	1,3878	0,5906	3,6416
Predição do meio de repicagem (MR^a) pela altura da planta após multiplicação							
Intercept	-0,6495	0,2020	-3,2151	1,30E-03	0,5223	3,50E-01	0,7729
AP2	0,2514	0,0356	7,0582	1,69E-12	1,2859	1,20E+00	1,3826
Predição do meio de repicagem (MR^a) pela validação do protocolo após multiplicação							
Intercept	-0,6931	0,3873	-1,7897	0,0735	0,5000	0,2244	1,0439
VL2	1,4027	0,3998	3,5081	0,0004	4,0662	1,8982	9,2615
Predição do meio de repicagem (MR^a) pelo número de miniestacas após multiplicação							
Intercept	-0,9546	0,2279	-4,1880	2,81E-05	0,3849	0,2445	0,5984
NmE2	0,5342	0,0711	7,5157	5,66E-14	1,7060	1,4909	1,9708

a Variáveis categóricas foram codificadas usando contrastes de tratamento. Categorias de referência: Formação de Calo (FC1): 0 (Não formou calo); Número de Ápices (NAP): NAP2 (2 ápices); Meio de Repicagem (MR): 4E. **b** Níveis de significância: **** p < 0.001, ** p < 0.01, * p < 0.05, ns não significativo (p ≥ 0.05). **c** Intervalos de Confiança (IC 95%) calculados com base em perfis de verossimilhança. **d** O modelo para a variável resposta VL1 foi construído dicotomizando a variável contínua original em sucesso (1: brotação ≥ X cm) e falha (0: brotação < X cm), onde X = 0,2 cm

Esses resultados indicam que o uso de múltiplos ápices pode favorecer a sobrevivência inicial, mesmo sem diferenças estatísticas relevantes.

O uso do meio MS0,01 na etapa de multiplicação foi significativamente influenciado por três variáveis principais: altura da brotação no repique, validação do protocolo após o repique e número de miniestacas formadas. Com a modelagem, pode-se inferir que: cada unidade adicional na altura da brotação aumentou em 1,29 vezes a chance de transferência da miniestacas das brotações para o meio MS0,01 (OR = 1,29; IC 95%: 1,20–1,38) (Tabela 3). E a validação bem-sucedida (sobrevivência) elevou essa probabilidade em 4,07 vezes (OR = 4,07; IC 95%: 1,90–9,26; $p < 0,001$), e cada miniestaca adicional aumentou a chance de uso do MS0,01 em 1,71 vezes (OR = 1,71).

A análise da sobrevivência mostrou que o meio MS0,01 foi utilizado para explantes com maior grau de adaptação e desenvolvimento, especialmente aqueles com altura superior a 0,8 cm, que apresentaram baixas taxas de mortalidade por ápices (1,0% a 8,1%). Em contrapartida, o meio 4E foi eficiente na recuperação de explantes menos desenvolvidos (< 0,8 cm), mantendo a mortalidade entre 1,8% e 5,0% para acesso, com uma taxa média de 8,3% para ápices individuais em todos os tratamentos. Esses resultados indicam uma ação complementar entre os meios testados: o 4E atuou como suporte para o resgate de materiais mais frágeis, enquanto o MS0,01 favoreceu o crescimento e a multiplicação de explantes já estabelecidos. Os interceptos negativos observados nos modelos logísticos indicam que na ausência do fator preditor (altura zero, validação zero) a probabilidade de ser transferido para o MS0,01 é baixa, o que corrobora a conclusão de que a seleção para este meio foi condicionada por melhor desempenho morfofisiológicas dos explantes, reafirmando o que Oseni, Pande e Nailwal (2018) descrevem sobre a importância do ambiente de cultivo e da fisiologia do explante na condução bem-sucedida de protocolos *in vitro*.

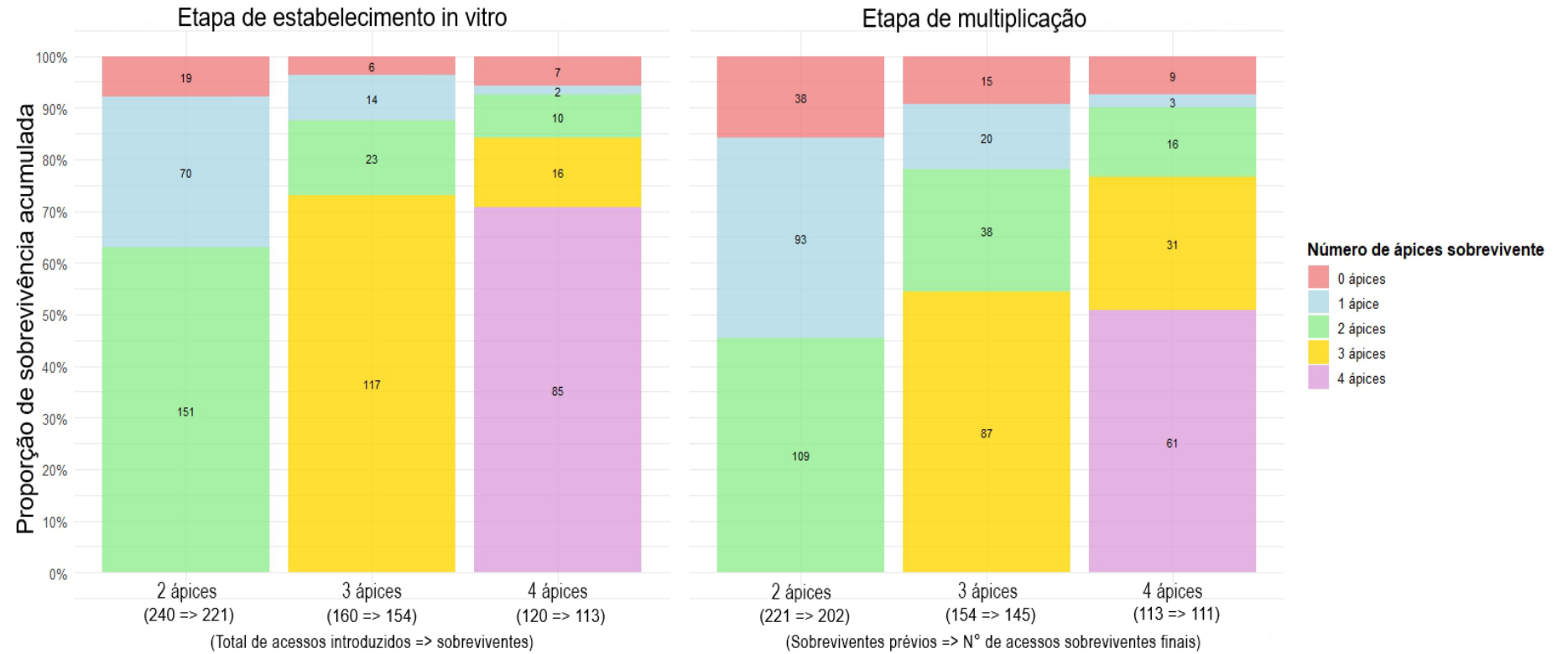
A capacidade de combinar diferentes meios de cultivo em etapas específicas da metodologia destaca a sua eficácia e adaptabilidade, atributos fundamentais para sua implementação em programas de conservação de germoplasma e micropropagação em larga escala, onde a variabilidade genética e fisiológica dos acessos exige flexibilidade na condução dos protocolos (OSENÍ et al., 2018; DEDIČOVÁ; LOPEZ-LAVALLE, 2024).

Em relação ao número de ápices introduzidos, observou-se uma tendência de maior sucesso com três ápices, embora sem significância estatística ($p > 0,05$). A introdução de dois ápices já garantiu alta taxa de sobrevivência (92,1%), enquanto o uso de três ápices pode oferecer uma redundância fisiológica vantajosa, compensando possíveis perdas por danos mecânicos, como também observado por Nyaboga et al. (2013). Por outro lado, a ausência de benefício adicional com quatro ápices reforça a elevada competência regenerativa e totipotência da mandioca, permitindo uma resposta eficiente mesmo com menor número de meristemas.

Essa elevada capacidade regenerativa pode estar relacionada à composição organogênica do meio 4E suplementado com AC e às condições ambientais controladas (33 °C), que favorecem a viabilidade e a divisão celular, como já descrito para outras espécies, incluindo *Nicotiana glauca* (Roberts et al., 1995). No entanto, a taxa ligeiramente superior de mortalidade em acessos com dois ápices sugere que danos físicos ou estresse fisiológico durante a manipulação podem comprometer a sobrevivência, especialmente em materiais sensíveis, fenômeno corroborado por estudos que destacou a vulnerabilidade dos meristemas a condições adversas executado por Zeng et al. (2024).

O gráfico de barras empilhadas (Figura 3) apresenta a proporção de sobrevivência acumulada dos acessos de mandioca em duas etapas do cultivo *in vitro*, estratificada pelo número de acessos sobreviventes para cada quantidade de ápices introduzido. Na primeira etapa, referente ao estabelecimento *in vitro*, o grupo com 3 ápices apresentou a maior taxa de sobrevivência proporcional (154/160), seguido pelos grupos com 4 ápices (113/120) e 2 ápices (221/240). Embora o grupo de 2 ápices tenha apresentado menor proporção, foi o que resultou no maior número absoluto de acessos sobreviventes. Após a primeira repicagem, verificou-se uma redução significativa no número total de acessos sobreviventes. O grupo com 3 ápices manteve a maior proporção de acessos com 100% de sobrevivência (54%), seguido pelos grupos com 4 (51%) e 2 ápices (45%). Além disso, o grupo de 4 ápices apresentou o menor número de acessos com apenas um ápice sobrevivente após o início da multiplicação.

Figura 3. Proporção de sobrevivência acumulada de acessos de mandioca cultivados *in vitro*, estratificada por número inicial de ápices (2, 3 ou 4). As barras à esquerda representam a sobrevivência 20 dias após a inoculação em meio 4E acrescido de AC; as barras à direita exibem plantas viáveis após 45 dias de cultivo, derivadas da repicagem dos ápices que se desenvolveram no meio 4E modificado. Cada barra empilhada demonstra: na base, acessos com todos os ápices viáveis; nas camadas superiores, perda progressiva de 1 ápice; e no topo, acessos sem sobreviventes. Valores absolutos de viabilidade de acessos são apresentados nas barras, com os totais por tratamento na base do gráfico.



A análise da proporção de sobrevivência dos acessos na introdução *in vitro* (Figura 3) revela nuances importantes quando comparada aos resultados da regressão logística (VL1 × NAP) (Tabela 3). Embora a regressão tenha indicado uma tendência de maior sucesso com 3 ápices (OR = 2,21), a ausência de significância estatística ($p > 0,05$) e o maior número absoluto de sobreviventes com 2 ápices sugerem que a eficiência do protocolo pode depender de um equilíbrio entre quantidade de ápices e viabilidade intrínseca do material vegetal.

Esses resultados evidenciam que a metodologia testada oferece flexibilidade operacional, permitindo sua adaptação conforme os objetivos específicos do programa de conservação ou multiplicação. Tal versatilidade é particularmente relevante para bancos de germoplasma, onde diferentes genótipos podem demandar abordagens distintas para maximizar sobrevivência e recuperação, conforme defendido por Mukiese et al. (2015) e Feyisa (2021).

Essa aparente divergência se explica porque a regressão logística avalia probabilidades individuais, enquanto o gráfico revela proporções acumuladas e números absolutos de sobrevivência. Apesar da maior probabilidade teórica de sucesso com três ápices (devido à redundância meristemática), o maior número inicial de acessos no tratamento com dois ápices resultou em maior quantidade de plantas viáveis. A elevada competência regenerativa observada pode estar relacionada ao uso de meios otimizados com balanceamento hormonal adequado, como o uso de 6-Benzilaminopurina (BAP) ($0,4 \text{ mg L}^{-1}$) e adição de ácido 1-naftalenoacético (ANA) ($0,2 \text{ mg L}^{-1}$), que favorece a formação de brotações, conforme demonstrado por Waro et al. (2020).

Na segunda etapa, multiplicação, a sobrevivência dos acessos mostrou-se correlacionada ao número de ápices viáveis na fase inicial, reforçando que o estabelecimento primário é crítico para o sucesso subsequente. Essa observação está alinhada com trabalhos como o de Danso et al. (1999), que demonstrou que a qualidade dos explantes na introdução determina a eficiência de protocolos de multiplicação. Além disso, a regressão logística (VL2 × MR) confirmou que a escolha do meio de multiplicação (MR) influenciou significativamente a sobrevivência, corroborando com achados de Waro et al. (2020), que observaram que a composição dos meios (ex.: MS0,01) promovem alongamento caulinar da mandioca.

A análise de bootstrap, com 10.000 replicatas, para a diferença na mediana da altura das brotações (AP1) entre os grupos com e sem formação de calo (FC1), na Tabela 4, revelou uma diferença estimada na mediana de 0.6 unidades, com um intervalo de confiança de 95% bias-corrected and accelerated (BCa) variando de 0.4 a 0.7. Este intervalo de confiança não incluiu o zero, indicando uma diferença significativa na mediana da altura entre os grupos. Adicionalmente, o Teste de Wilcoxon demonstrou uma diferença estatisticamente significativa na distribuição da altura das brotações entre os grupos com e sem formação de calo (Estatística $W = 12348$, $p < 0.0001$).

Tabela 4. Impacto da formação de calos na altura de brotações: estimativa por bootstrap da diferença mediana (IC 95% BCa) e validação com teste de Wilcoxon.

Análise	Estatística	Valor	Intervalo de Confiança (95%)	ρ -value	Significância
Diferença Mediana (Boot)	Diferença na Mediana (Calo sim/não)	0,6	[0,4 - 0,7] (BCa)	-	Significativo
Teste de Wilcoxon	Estatística W	12348	-	< 0,0001	Significativo

Os resultados da análise de bootstrap e do Teste de Wilcoxon concordam em demonstrar uma associação consistente entre a formação de calo e o aumento da altura das brotações de mandioca cultivadas *in vitro*. A estimativa da diferença significativa da mediana obtida pelo bootstrap de 0,6 cm, sendo este intervalo de confiança não inclusivo do zero, robustece a conclusão de que as brotações que desenvolvem calo tendem a ser significativamente mais altas em comparação com aquelas que não formam calo.

Este resultado robusto, alcançado por meio de reamostragem, está alinhado com as recomendações metodológicas de Chernick (2011), que ressalta a aplicabilidade do bootstrap para garantir inferência confiável em experimentos com dados não paramétricos ou amostras pequenas. O Teste de Wilcoxon, por sua vez, complementa essa evidência ao confirmar diferenças significativas nas distribuições de altura, reforçando a validade dos achados.

Do ponto de vista fisiológico, nossos resultados corroboram parcialmente com os obtidos por Mukiese et al. (2015), que, ao trabalharem com genótipos de mandioca congolese, relataram que explantes com melhor resposta

morfogenética apresentaram desenvolvimento mais vigoroso *in vitro*. No entanto, é importante ressaltar que, no presente estudo, as brotações não foram originadas diretamente de calos, mas sim de ápices caulinares intactos, sendo a formação de calo visto apenas como um evento associado ao crescimento mais vigoroso.

A diferença da mediana identificada (0,6 cm) representa um efeito consistente na mensuração, sugerindo que a capacidade de formação de calo pode ser utilizada como marcador morfológico preliminar para seleção de explantes com maior potencial de desenvolvimento, dentro de protocolos de micropropagação de mandioca.

As imagens da Figuras 4 e 5 ilustram o desenvolvimento das brotações de mandioca durante as duas principais etapas do protocolo de introdução e multiplicação *in vitro*. Na Figura 4, referente à fase de estabelecimento inicial, observa-se a variabilidade no crescimento das brotações, com a presença ou ausência de formação de calo na base dos explantes, evidenciando a resposta diferencial ao meio de indução organogênico suplementado com AC. Na Figura 5, correspondente à fase de multiplicação, é possível visualizar as brotações após o repique para o meio MS0,01, destacando-se o alongamento caulinar e o desenvolvimento mais uniforme das plantas. Essas imagens reforçam a efetividade da metodologia, demonstrando a capacidade de promover o crescimento e a recuperação dos explantes em ambas as etapas do processo.

Figura 4. Brotações *in vitro* de ápices de mandioca com e sem a formação de calo na etapa de estabelecimento, (A) plantas aos 20 dias de cultivo, (B) plantas livres de folhas e calos para etapa de multiplicada em meio MS 0,01 ou 4E a depender do tamanho.

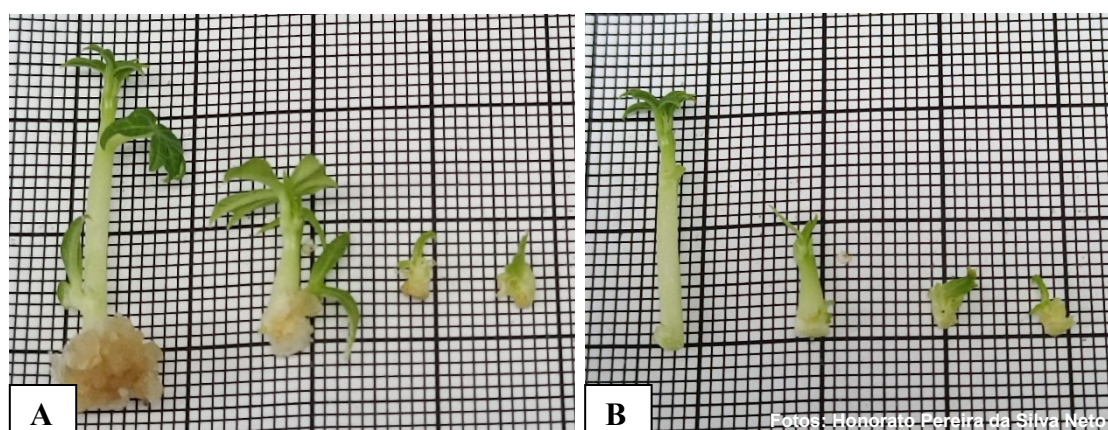
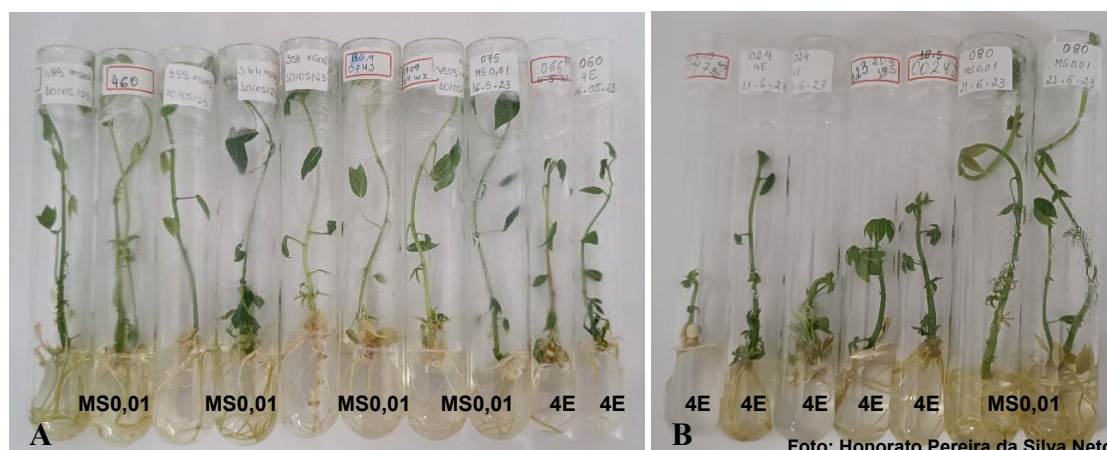


Figura 5. Plantas *in vitro* na etapa de multiplicação aos 45 dias, meio MS0,01 (tubos 15x150 mm) ou 4E (tubos 12x150 mm).



4. CONCLUSÕES

Os resultados evidenciam a alta eficiência morfogênica no estabelecimento *in vitro* de ápices caulinares de mandioca, com taxas de sobrevivência superiores a 92% nos tratamentos com 2, 3 ou 4 ápices por acesso.

O protocolo testado demonstrou flexibilidade operacional, possibilitando sua adoção de forma estratégica conforme a demanda: o uso de apenas dois ápices por genótipo mostrou-se mais vantajoso para o estabelecimento *in vitro* de grandes volumes de acessos, compensando a eficiência ligeiramente inferior com maior economia de tempo e material vegetal, enquanto a utilização de um maior número de ápices por acesso amplia ligeiramente a taxa de sobrevivência no estabelecimento *in vitro*.

O método oferece uma solução robusta e adaptável às demandas específicas de bancos de germoplasma e de programas de micropropagação de mandioca, contribuindo para a conservação e o uso sustentável deste recurso genético estratégico.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRE, A. P. et al. Folk taxonomy and traditional management of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) diversity in southern and central Benin. **International Journal of Innovation and Scientific Research**, v. 20, n. 2, p. 500-515, 2016.

AHMED, M. E. A. E. In vitro propagation for conservation and genetic fidelity of the near threatened *Dimocarpus longan*. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 20, n.1, p. 130, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1186/s43141-022-00406-4>

AISHWARYA, P. P.; SEENIVASAN, N.; NAIK, D. S. Coconut water as a root hormone: Biological and chemical composition and applications. **The Pharma Innovation Journal**, v. 11, n. 12, p. 1678-1681, 2022.

AKHIRIANA, E.; SAMANHUDI; YUNUS, A. Coconut water and IAA effect on the in vitro growth of *Tribulus terrestris* L. **Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis**, v. 67, n. 1, p. 9-18, 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.11118/actaun201967010009>.

BIDABADI, S. S.; JAIN, S. M. Cellular, molecular, and physiological aspects of in vitro plant regeneration. **Plants**, v. 9, n. 6, p. 702, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/plants9060702>

CACAI, G. H. T. et al. Effets de différentes combinaisons hormonales sur l'organogenèse in vitro de quelques cultivars locaux et variétés améliorées de *Manihot esculenta* Crantz (manioc-Euphorbiaceae) cultivées au Bénin. **International Journal of Biological and Chemical Sciences**, v. 6, n. 4, p. 957-966, 2012. DOI: <http://dx.doi.org/10.4314/ijbcs.v6i4.19>

CHERNICK, Michael R. **Bootstrap methods: a guide for practitioners and researchers**. 2. ed. Hoboken, N.J.: Wiley-Interscience, 2007. 400 p. (Wiley Series in Probability and Statistics). DOI: <https://doi.org/10.1002/9780470192573>

COLLAVINO, A. et al. Cassava common mosaic virus infection affects growth and yield components of cassava plants (*Manihot esculenta*) in Argentina. **Plant Pathology**, v. 71, n. 4, p. 980-989, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1111/ppa.13515>

COROZO, L. et al. Micropropagación de dos variedades ecuatorianas de yuca (*Manihot esculenta* Crantz). **Chilean Journal of Agricultural & Animal Sciences**, v. 36, n. 3, p. 224-232, 2020. DOI: <https://doi.org/10.29393/CHJAAS36-21MDLC80022>

COSTA, M. C. et al. In vitro regeneration of shoot segments of *Manihot esculenta* varieties cultivated in northern Brazil. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, v. 15, n. 1, p. 22-26, 2019. DOI: <https://doi.org/10.46526/pccm.2019.v15i1.138>

CRUZ-CRUZ, C. A.; GONZÁLEZ-ARNAO, M. T.; ENGELMANN, F. Biotechnology and conservation of plant biodiversity. **Resources**, v. 2, n. 2, p. 73-95, 2013. DOI: <https://doi.org/10.3390/resources2020073>

DANSO, K. E.; ACHEAMPONG, E.; AMOATEY, H. M. Selection and in-vitro propagation of five cassava (*Manihot esculenta* Crantz) cultivars. **Journal of the Ghana Science Association**, v. 1, n. 3, p. 31-41, 1999.

DAUD, N. et al. Effects of different organic additives on in vitro shoot regeneration of *Celosia* sp. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 14, n. 9, p. 546-551, May 2011. DOI: <https://doi.org/10.3923/pjbs.2011.546.551>

DEDIČOVÁ, B.; BECERRA LOPEZ-LAVALLE, L. A. Cassava for the future: embryogenic liquid cultures suitable for new biotech techniques. **BioTechniques**, v. 76, p. 453–461, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1080/07366205.2024.2393546>

DEPEINT, F. et al. Mitochondrial function and toxicity: role of B vitamins on the one-carbon transfer pathways. **Chemico-Biological Interactions**, v. 163, n. 1-2, p. 113-132, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2006.05.010>

FAYE, A. et al. Effects of different hormones on organogenesis in vitro of some varieties of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) grown in Senegal. **African Journal of Plant Science**, v. 9, n. 8, p. 305-312, ago. 2015. DOI: <https://doi.org/10.5897/AJPS2014>

FEYISA, A. S. Micropropagation of cassava (*Manihot esculenta* Crantz): review. **Extensive Reviews**, v. 1, n. 1, p. 49-57, 2021. DOI: <https://doi.org/10.21467/exr.1.1.4486>.

GHAEMIZADEH, F. et al. Combinação de cultura em cúpula de disco-caule e termoterapia para eliminar Allexivírus e vírus da anã amarela da cebola do alho (*Allium sativum* cv. Hamedan). **Arquivos de Fitopatologia e Fitofarmacêutica**, v. 47, n. 4, pág. 499-507, 2014.

HOOD, A. S. C. et al. A systematic map of cassava farming practices and their agricultural and environmental impacts using new ontologies: Agri-ontologies 1.0. **Ecological Solutions and Evidence**, v. 4, e12249, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1002/2688-8319.12249>

IBÁÑEZ, S. et al. Advances in plant regeneration: shake, rattle and roll. **Plants**, v. 9, n. 7, p. 897, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/plants9070897>

IOIO, R. D.; LINHARES, F. S.; SABATINI, S. Emerging role of cytokinin as a regulator of cellular differentiation. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 11, n. 1, p. 23-27, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2007.10.006>

KABIR, M. H. et al. In vitro propagation of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Nuclear Science and Applications**, v. 24, n. 1-2, p. 23–28, 2015.

KAUR, J.; MUDGAL, G. An efficient and quick protocol for in vitro multiplication of snake plant, *Sansevieria trifasciata* var. Laurentii [Prain]. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 147, n. 2, p. 405-411, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11240-021-02132-0>

KOENKER, R. et al. **Handbook of quantile regression**. Boca Raton, FL: CRC Press, Taylor & Francis Group, 2018.

KOENKER, R. **Quantile Regression**. Cambridge: Cambridge University Press, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1017/CBO9780511754098>

- LEMOS, E. E. P. de et al. Conservação in vitro de germoplasma de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, n. 10, p. 1359-1364, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2002001000002>
- MAPAYI, E. F. et al. Optimization of in-vitro propagation of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) genotypes. **Journal of Agricultural Science**, v. 5, n. 3, p. 261-267, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.5539/jas.v5n3p261>
- MENEGAZZO, R. F. et al. In vitro multiplication of cassava varieties. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, v. 22, n. 4, p. 101-107, 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.25110/arqvet.v22i4.2019.7618>
- MONTHONY, A. S. et al. The past, present and future of *Cannabis sativa* tissue culture. **Plants**, v. 10, n. 1, p. 185, 2021a. DOI: <https://doi.org/10.3390/plants10010185>
- MONTHONY, A. S. et al. Recalcitrance of *Cannabis sativa* to de novo regeneration; a multi-genotype replication study. **PloS one**, v. 16, n. 8, p. e0235525, 2021b. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0235525>
- MUKIESE, J. R. B. et al. In vitro meristem-tip culture and regeneration approaches in Congolese cassava accessions (*Manihot esculenta* Crantz cv. Boma and cv. Mpelo-Nlongi). **International Journal of Biological Research**, v. 3, n. 2, p. 72-75, 2015. DOI: <https://doi.org/10.14419/ijbr.v3i2.5197>
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- NYABOGA, E. et al. Unlocking the potential of tropical root crop biotechnology in east Africa by establishing a genetic transformation platform for local farmer-preferred cassava cultivars. **Frontiers in Plant Science**, v. 4, p. 526, 2013. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00526>
- OLIVEIRA, G. M. de et al. Rise in temperature increases growth and yield of *Manihot* sp. plants. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 9, e15611929891, 2022. DOI: <https://doi.org/10.33448/rsd-v11i9.29891>
- OLIVEIRA, R. P. D.; GOMES, T. D. S.; VILARINHOS, A. D. Avaliação de um sistema de micropropagação massal de variedades de mandioca. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, n. 12, p. 2329-2334, 2000. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2000001200002>
- OSENI, O. M.; PANDE, V.; NAILWAL, T. K. A review on plant tissue culture, a technique for propagation and conservation of endangered plant species. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 7, n. 7, p. 3778–3786, 2018. DOI: <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2018.707.438>

R Core Team. **R**: A Language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2024. Disponível em: <https://www.R-project.org/>. Acesso: 06 de jun. 2024

RASPOR, M. et al. Integrating the roles for cytokinin and auxin in de novo shoot organogenesis: From hormone uptake to signaling outputs. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 16, p. 8554, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms22168554>

ROBERTS, C. et al. Temperature and abscisic acid can be used to regulate survival, growth, and differentiation of cultured guard cell protoplasts of tree tobacco. **Plant Physiology**, v. 109, n. 4, p. 1411–1420, 1995. DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.109.4.1411>

ROCA, W. M. et al. Cassava tissue culture: a tool for the production of healthy plants and the conservation of germplasm. **Tropical Root Crops Newsletter**, v. 8, p. 3–11, 1984.

ROCA, W. M. et al. Eliminación de virus y propagación de clones en la yuca (*Manihot esculenta* Crantz). In: ROCA, W. M.; MROGINSKI, L. A. (Ed.). **Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones**. Cali: CIAT, 1991. p. 403-420.

de SÁ, J. F. et al. Culture media for the multiplication of wild *Manihot* species. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 42, n. 6, p. 598–607, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1590/1413-70542018426024718>

SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E.; COSTA, F. H. S. Conservação in vitro de recursos genéticos de plantas: estratégias, princípios e aplicações. In: BARRUETO CID, L.P. (Org.). **Cultivo in vitro de plantas**. Brasília: **Embrapa Informação Tecnológica**, 2010. p.177-234.

SESSOU, A. F. et al. In vitro propagation of three mosaic disease resistant cassava cultivars. **BMC Biotechnology**, v. 20, p. 1-13, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12896-020-00645-8>

SOUZA, A. S. et al. **Micropropagação da mandioca mediante ápices caulinares e segmentos nodais**. Cruz das Almas, BA: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2008. 12 p. (Circular Técnica, 88)

TADESSE, M. et al. Development of micropropagated potato plants over three phases of growth as affected by temperature in different phases. **NJAS - Wageningen Journal of Life Sciences**, v. 49, p. 5–32, 2001. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1573-5214\(01\)80015-4](https://doi.org/10.1016/S1573-5214(01)80015-4)

WANG, Q. C. et al. Cryotherapy of shoot tips: a technique for pathogen eradication to produce healthy planting materials and prepare healthy plant genetic resources cryopreservation. **Annals of Applied Biology**, v. 154, n. 3, p. 351-363, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2008.00308.x>

WANG, Q. C.; VALKONEN, J. P. T. Efficient elimination of sweetpotato little leaf phytoplasma from sweetpotato by cryotherapy of shoot tips. **Plant Pathology**, v. 57, n. 2, p. 338-347, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2007.01710.x>

WANG, Q. et al. Cryopreservation of grapevine (*Vitis* spp.) embryogenic cell suspensions by encapsulation-vitrification. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 77, p. 267-275, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1023/B:TICU.0000018393.58928.b1>

WANG, Q.; VALKONEN, J. P. T. Cryotherapy of shoot tips: novel pathogen eradication method. **Trends in Plant Science**, v. 14, n. 3, p. 119-122, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2008.11.010>

WARO, N. T.; ASTUTIK, A.; SUMIATI, A. Multiplikasi meristem ubikayu (*Manihot esculenta*) dalam media Murashige and Skoog (MS) modifikasi NAA (Naphthalene Acetic Acid) dan BA (Benzyl Adenine). **Buana Sains**, v. 20, n. 2, p. 121–130, 2020. DOI: <https://doi.org/10.33366/bs.v20i2.1757>

ZENG, J. et al. Tipping the balance: The dynamics of stem cell maintenance and stress responses in plant meristems. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 78, 102510, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2024.102510>

CAPÍTULO 3

Crio-canaletas aplicadas à criopreservação de ápices caulinares de mandioca: desempenho em ambientes de recuperação

¹ Artigo a ser ajustado e submetido após definição da escolha do periódico científico

Crio-canaletas aplicadas na criopreservação de ápices caulinares de mandioca: desempenho em ambientes de recuperação

RESUMO

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é uma cultura estratégica para a segurança alimentar, exigindo conservação *ex situ* do germoplasma para manter sua diversidade genética. Apesar do potencial da criopreservação para a conservação a longo prazo, persistem desafios técnicos, principalmente a sensibilidade dos tecidos meristemáticos aos crioprotetores e à recuperação pós-congelamento (viabilidade e brotação), bem como limitações de métodos baseados em desidratação ou congelamento programado, restringindo sua aplicabilidade universal em comparação ao *droplet vitrification* (DV). Este estudo teve como objetivo principal avaliar a eficácia de uma nova técnica, a vitrificação em crio-canaletas (CCV), para a criopreservação de ápices caulinares de mandioca, comparando diferentes meios e ambientes de recuperação. Foram utilizados 20 acessos do banco ativo de germoplasma da Embrapa Mandioca e Fruticultura. Os ápices foram submetidos a pré-tratamento (osmoproteção) em solução carga (LS), seguidos de exposição à solução de vitrificação de plantas nº 2 (PVS2) e, posteriormente, imersão em nitrogênio líquido, momento em que ocorreu a vitrificação. Crio-canaletas metálicas foram empregadas como suporte físico, protegendo os tecidos durante o congelamento. Durante o descongelamento, as crio-canaletas foram imersas brevemente na solução de lavagem apenas para liberar os ápices. Os ápices permaneceram na solução de lavagem por 15 minutos, repetindo-se o procedimento uma segunda vez, sendo então transferidos para meio de recuperação R3 por 2 dias e, posteriormente, para os meios K0.5 e K0.5+ (10% de água de coco) por 30 dias, sob duas temperaturas de incubação (28 °C e 33 °C). Avaliaram-se taxa de sobrevivência, porcentagem de recuperação, altura das brotações regeneradas, número de folhas e formação de calo (como indicador de viabilidade). O experimento seguiu delineamento inteiramente casualizado em arranjo fatorial 20 (acesso) × 2 (meio) × 2 (temperatura), com 15 repetições. As análises incluíram modelos lineares generalizados mistos (GLMM) e correlação de Spearman. Os resultados indicaram elevada sobrevivência (>90% aos 10 dias) e média de recuperação >60% aos 30 dias. A temperatura de 33 °C aumentou significativamente a recuperação e o alongamento das brotações, enquanto o meio K0.5+ favoreceu a organogênese. Os genótipos exibiram respostas diferenciadas aos tratamentos. Conclui-se que a metodologia de vitrificação em crio-canaletas (CCV) é um avanço na criopreservação vegetal, por oferecer suporte padronizado, reduzir perdas por flutuação ou adesão e proteger tecidos meristemáticos, avanço que deve ser comprovado por estudos comparativos com a metodologia de *droplet vitrification* (DV). As variedades BRS Corrente, BRS Caipira, BRS Novo Horizonte e BGM 0540 apresentaram altas taxas de recuperação, e os acessos criopreservados tiveram elevada taxa de aclimatização, possibilitando recuperação completa. O sistema mostrou-se seguro, eficiente e reprodutível, com potencial para rotina em bancos clonais de germoplasma e comparações futuras com DV.

Palavras-chave: *Manihot esculenta* Crantz, nitrogênio líquido, osmoprotetor, PVS2, vitrificação em gotas.

Application of cryo-gutters in cassava shoot tip cryopreservation: performance across recovery environments

ABSTRACT

Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) is a crop of strategic importance for food security, requiring *ex situ* germplasm conservation to maintain its genetic diversity. Despite the potential of cryopreservation for long-term conservation, technical challenges remain, particularly the high sensitivity of meristematic tissues to cryoprotectants and post-thaw recovery (viability and sprouting), as well as limitations of methods based on dehydration or programmed/slow freezing, restricting their universal applicability compared to *droplet vitrification* (DV). This study primarily aimed to assess the effectiveness of a new technique, cryo-gutter vitrification (CGV), for the cryopreservation of cassava shoot tips, comparing different media and regeneration environments. Twenty accessions from the active germplasm bank of Embrapa Cassava and Fruits were used. Shoot tips were subjected to pre-treatment (osmoprotection) in a loading solution (LS), followed by exposure to Plant Vitrification Solution No. 2 (PVS2) and subsequent immersion in liquid nitrogen, at which point vitrification occurred. Metallic strips shaped as gutters (cryo-gutters) were used as physical support, protecting the tissues during freezing. During thawing, cryo-gutters were briefly immersed in the washing solution only to release the shoot tips. The tips remained in the washing solution for 15 minutes, with the procedure repeated once, and were then transferred for recovery medium: first in R3 medium for 2 days, and subsequently in K0.5 and K0.5+ media (supplemented with 10% coconut water) for 30 days under two incubation temperatures (28 °C and 33 °C). Survival rate, percentage of recovery, shoot height, leaf number, and callus formation (as a viability indicator) were assessed. The experiment followed a completely randomized factorial design (20 accessions × 2 media × 2 temperatures) with 15 replicates. Analyses included generalized linear mixed models (GLMM) and Spearman's correlation. Results showed high survival (>90% at 10 days) and mean regeneration >60% at 30 days. Incubation at 33 °C significantly increased recovery and shoot elongation, while K0.5+ medium promoted greater organogenesis. Genotypes exhibited differential responses to treatments. We conclude that the cryo-gutter vitrification (CGV) methodology represents a technological advance in plant tissue cryopreservation by providing standardized physical support, minimizing losses due to flotation or adhesion, and protecting meristematic tissues during freezing, an advance that should be confirmed by comparative studies with the *droplet vitrification* (DV) methodology. Cultivars BRS Corrente, BRS Caipira, BRS Novo Horizonte, and accession BGM 0540 exhibited high recovery rates, and the cryopreserved accessions showed high acclimatization rates, enabling complete plant recovery. The system proved safe, efficient, and reproducible, with potential for routine use in clonal germplasm banks and for future comparisons with DV protocols.

Keywords: Droplet vitrification, *Manihot esculenta* Crantz, osmoprotection, PVS2, liquid nitrogen.

1. INTRODUCAO

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é uma planta perene, arbustiva e lenhosa, pertencente à família Euphorbiaceae. Um dos produtos que garantem a segurança alimentar em diversas partes do mundo e um alimento de baixo custo, tornou-se uma cultura altamente versátil, compondo a dieta de aproximadamente 800 milhões de pessoas (FAO, 2023). Destaca-se como uma das culturas economicamente importantes de crescimento mais rápido, devido às suas aplicações em diferentes setores industriais (HOHENFELD et al., 2022)

A Nigéria lidera a produção de mandioca, com cerca de 60,0 milhões de toneladas em 7,73 milhões de hectares, enquanto o Brasil ocupa o quinto lugar, com 18,2 milhões de toneladas em 1,21 milhão de hectares. Estima-se que a produção brasileira valha aproximadamente 2,3 bilhões de dólares, apoiando em torno de um milhão de empregos diretos e indiretos (SOUZA; SILVA, 2020; IBGE, 2022). No entanto, apesar dessa importância econômica, a utilização predominante de variedades obsoletas, de baixo rendimento e alta suscetibilidade a pragas e doenças, permanece como um desafio nos sistemas de produção, resultando em perdas significativas.

Entre as principais doenças que restringem o potencial produtivo da mandioca estão aquelas que afetam a parte aérea das plantas, incluindo: o complexo da antracnose (*Colletotrichum fructicola*, *C. tropicale*, *C. gloeosporioides*, *C. theobromicola* e *C. siamense*), a mancha-marrom das folhas (*Cladosporium henningsii*), a mancha-branca (*Passalora manihotis*) e a mancha-branca-alternativa (*Passalora vicosae*) (LIU et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2020), além da bacteriose causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* (COLARICCIO et al., 2020). Em 2024, a vassoura-de-bruxa da mandioca, doença fúngica provocada por *Rhizoctonia theobromae* (atualmente identificado em estudos internacionais como *Ceratobasidium theobromae*), foi incluída entre as enfermidades mais relevantes para a cultura no Brasil (EMBRAPA AMAPÁ, 2024). Essa reclassificação ganhou relevância após estudos recentes associarem o fungo do gênero *Ceratobasidium* à vassoura-de-bruxa no Sudeste Asiático, alertando para uma ameaça reemergente à cultura (LEIVA et al., 2023; GIL-ORDÓÑEZ et al., 2024).

As perdas ocasionadas por essas doenças variam conforme a espécie, a variedade cultivada e as condições ambientais, podendo atingir até 95% da

produção. Além disso, podem provocar a morte das plantas ou reduzir o teor de amido e a qualidade das raízes (LEGG; ALVAREZ, 2017).

A transmissão ocorre principalmente por estacas/manivas infectadas (doenças virais, bacterianas e fungicas), insetos-vetores como moscas-brancas e cochonilhas e também por ferramentas contaminadas. O manejo inclui o uso de cultivares resistentes, a rotação de culturas e o controle químico com fungicidas (MCCALLUM et al., 2017). Contudo, o controle químico de doenças foliares enfrenta dificuldades, como a disponibilidade limitada de ingredientes ativos registrados no Brasil (JULIÃO et al., 2020).

A base para o desenvolvimento de novas cultivares está nos bancos de germoplasma ou nos centros de origem e diversidade. Por isso, é necessário buscar estratégias eficazes de conservação dos recursos genéticos, uma vez que bancos mantidos em campo deixam o material suscetível a fatores ambientais e ao ataque de pragas e patógenos.

Entre as estratégias de preservação, destaca-se a criopreservação, que consiste no armazenamento de material biológico em nitrogênio líquido (-196 °C). Essa técnica tem sido amplamente utilizada para a preservação de recursos genéticos vegetais a longo prazo (YAMAMOTO et al., 2011; SOUZA et al., 2016; WANG et al., 2018; REN et al., 2019; GUERRA et al., 2020, 2021; OLIVEIRA et al., 2021; SILVA et al., 2021; GOWTHAMI et al., 2024), pois permite estender o intervalo entre subcultivos sem comprometer a sobrevivência e a integridade genética (BENELLI, 2021). Os protocolos criogênicos são multietapas, exigindo cuidado em cada fase para garantir o sucesso, além de procedimentos de cultivo *in vitro* para recuperar os explantes criopreservados.

Apesar do potencial, a aplicação da criopreservação em larga escala para a mandioca ainda é restrita, em parte pela complexidade operacional e pela variabilidade nas taxas de recuperação pós-criopreservação (ESCOBAR et al., 2014). Nesse contexto, ajustes no processo de vitrificação em Cryo-Canaleta (CCV), protocolo inovador que alia maior simplicidade técnica à otimização de parâmetros ambientais de recuperação, configura como uma alternativa promissora para o avanço da conservação de germoplasma da cultura.

A fase de recuperação pós-criopreservação é crítica, sendo influenciada tanto pela composição do meio de cultura quanto pelas condições térmicas (THAMMASIRI; SOAMKUL, 2007; ESCOBAR et al., 2014). Estudos apontam o

potencial da água de coco (AC) como suplemento na concentração de 10% ao meio K0.5 no estabelecimento de ápices caulinares de 0,2 mm, especialmente sob temperatura de 33 °C (dados não publicados), devido ao seu perfil único de citocininas naturais e compostos antioxidantes, que reduzem o estresse oxidativo (MURGAS; FRANCISCATTO; SANTOS, 2003; BARROS; TONIOLLI, 2011; MONDAL et al., 2012; PARTHIBHAN, 2015; UCHENDU; KELLER, 2016; KHATUN; ROY; RAZZAK, 2018). Evidências adicionais sugerem que a temperatura de recuperação pode modular a organogênese, com valores mais elevados favorecendo a atividade metabólica e estimulando a proliferação celular (LAMBOLEZ et al., 2022). No entanto, a interação entre esses fatores permanece pouco explorada, em especial em protocolos inovadores como a CCV.

A temperatura de descongelamento e recuperação das plantas também exerce influência decisiva sobre a recuperação de tecidos vegetais. Embora a faixa ideal varie entre espécies, recomenda-se mantê-la entre 35 °C - 40 °C, a fim de reduzir danos térmicos (DUMET et al., 2013; RUTA; LAMBARDI; OZUDOGRU, 2020). Assim, a otimização dessas condições torna-se essencial para evitar a hiperhidricidade e a formação de calos, garantindo a recuperação de plantas sem indução de desdiferenciação celular (CHANG; REED, 1999; BENSON; HARDING, 2012) e favorecendo a resposta morfogênica.

Diante desse cenário, o presente estudo teve como objetivo principal avaliar a eficácia da metodologia CCV na criopreservação da mandioca, por meio da comparação sistemática de três aspectos: (a) a influência dos meios K0.5 e K0.5+ suplementado com 10% de água de coco sobre as taxas de recuperação; (b) o efeito diferencial das temperaturas de 28 °C e 33 °C no desenvolvimento morfogênico pós-criopreservação; e (c) geração de conhecimento científico para comparações futuras com tecnologias estabelecidas, como a droplet-vitrification (DV)

2. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos do Núcleo de Biologia Avançada da Embrapa Mandioca e Fruticultura, em Cruz das Almas, Bahia.

2.1. Material Vegetal

Os explantes utilizados no experimento foram obtidos de culturas *in vitro*. Foram selecionados 20 acessos representativos da diversidade genética do banco de germoplasma da Embrapa: BGM 0029, BGM 0226, BGM 0540, BGM 0668, BRS 396, BRS 399, BRS 400, BRS 401, BRS Caipira, BRS Corrente, BRS CS 01, BRS Formosa, BRS Gema de Ovo, BRS Jari, BRS Kiriris, BRS Mulatinha, BRS Novo Horizonte, BRS Olho Roxo, BRS Platina e BGM 1216 (Secundina).

2.2. Padronização do material de partida

Para padronização do material, as plantas foram subcultivadas em meio MS0,01, modificado a partir do meio basal (MS) de Murashige e Skoog (1962) conforme Souza et al. (2008), suplementado com 20 g L⁻¹ de sacarose, 0,01 mg L⁻¹ de 6-benzilaminopurina (BAP), 0,01 mg L⁻¹ de ácido 1-naftalenoacético (ANA), 0,01 mg L⁻¹ de ácido giberélico (AG₃) e 2,4 g L⁻¹ de Phytigel®, com pH ajustado para 5,8. Os explantes foram mantidos em condições controladas (27 ± 1 °C, fotoperíodo de 16/8 h e intensidade luminosa de 30 μmol m⁻² s⁻¹) por 60 dias.

2.3. Retirada dos ápices

Com auxílio de microscópio estereoscópico, foram excisados 90 ápices meristemáticos (2 mm × 1 mm) das brotações terminais de cada acesso e inoculados em meio basal MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) para evitar desidratação.

2.4. Controles Experimentais

Para avaliar a eficiência do protocolo, foram estabelecidos três grupos controle nos 20 acessos. Os controles crioprotetores não foram submetidos ao congelamento em nitrogênio líquido, no entanto, passaram por uma solução de lavagem para eliminar os osmoprotetores e o agente vitrificante. Cada grupo controle foi constituído por cinco réplicas por acesso, utilizando ápices de 2 mm x 1 mm, mantidos a 28 ± 1 °C e com fotoperíodo de 16 h.

O controle absoluto teve como objetivo avaliar a funcionalidade dos meios de recuperação K0.5 estabelecido por Escobar et al. (2014), e K0.5 suplementado com 10% de AC, com ápices cultivados diretamente nesses meios. Os controles LS e PVS2, propostos por Sakai et al. (1990), avaliaram a exposição à solução

osmoprotetora LS (MS suplementado com 136,92 g L⁻¹ de sacarose e 184,16 g L⁻¹ de glicerol, pH 5,8) e a solução vitrificante PVS2 (MS suplementado com 136,92 g L⁻¹ de sacarose, 300 g L⁻¹ de glicerol, 135,2 mL L⁻¹ de etilenoglicol e 136,4 mL L⁻¹ de DMSO, pH 5,8).

Todas as soluções foram filtradas em 0,22 µm e autoclavadas por 7 min. Os resultados desses controles permitiram avaliar isoladamente os efeitos das soluções crioprotetoras e osmoprotetoras sobre a recuperação e a integridade dos ápices, possibilitando discriminar se os danos observados resultam das soluções. Isso viabiliza ajustes ou otimizações e evita a atribuição prematura de falhas ao processo de congelamento.

2.5. Osmoproteção

Oitenta ápices de cada acesso foram transferidos para crio tubos de 2 mL com 1 mL de solução carga LS, mantidos por 2 h à temperatura ambiente, após este intervalo retirou-se os 10 ápices do controle da solução de carga, passando por solução de lavagem e inoculados em meio de recuperação R3. Em seguida, a solução LS foi substituída por 1 mL de solução PVS2 gelada por 30 min a 0 °C (inserido em gelo em escamas). Após este período retirou-se os 10 ápices do controle PVS2, transferindo para criotubos contendo solução de lavagem e após dupla lavagem por 15 min foram inoculados no meio de recuperação R3. Simultaneamente, os ápices remanescentes foram transferidos para as crio-canaletas, de papel alumínio, de dimensões 2,5 cm (comprimento) x 0,2 cm x 0,2 cm (diâmetro), contendo solução nova de PVS2, completadas para total submersão dos ápices e imediatamente submersas em nitrogênio líquido para vitrificação e introduzidas nos criotubos, armazenando-os em nitrogênio líquido por no mínimo 1 h.

2.6. Descongelamento e recuperação

As crio-canaletas foram retiradas dos criotubos e transferidas para novos criotubos de 2,0 mL com 2,0 mL de solução de lavagem (MS suplementado com 410,76 g L⁻¹ de sacarose, pH 5,8, filtrada e autoclavada). Os ápices foram lavados por 15 min com intervalos de agitação suaves, com substituição da solução ao final de 15 minutos e repetição do processo uma segunda vez. Após remoção da solução de lavagem, os ápices foram transferidos para placas de Petri com meio

R3 (MS suplementado com $102,7 \text{ g L}^{-1}$ de sacarose, 2 g L^{-1} de carvão ativado, $4,5 \text{ g L}^{-1}$ de ágar, pH 5,7) e cultivado por dois dias sob penumbra (ESCOBART et al., 2014). Posteriormente, foram transferidos e cultivados por 30 dias em meio K0.5 (MS suplementado com $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de cinetina, $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ de ácido giberélico (AG₃), $1,14 \text{ mg L}^{-1}$ de tiamina, 100 mg L^{-1} de mio-inositol, $3,45 \text{ g L}^{-1}$ de ágar e $1,15 \text{ g L}^{-1}$ de Gelzan™) ou K0.5 suplementado com 10% de AC e incubação a 28 °C e 33 °C , com iluminação ajustada gradualmente na primeira semana (Figura 1).

Figura 1. Esquema das etapas metodológicas empregadas na criopreservação de germoplasma de mandioca por meio de vitrificação em crio-canaletas.



As avaliações de sobrevivência foram realizadas aos 10, 20 e 30 dias (tecido verde e turgescendo), e aos 30 dias, também se registrou a recuperação (brotamentos > 2 mm com primórdios foliares), além de altura da brotação, número de folhas semi-expandidas e formação de calo na base das brotações. Todos os meios foram autoclavados por 20 min, as soluções filtradas em 0,22 µm e autoclavadas por 7 min e a cinetina filtrada foi adicionada ao meio após autoclavagem na concentração final.

2.7. Aclimatização

Para avaliar a viabilidade pós-criopreservação e recuperação *in vitro*, 5 plantas de cada um dos 20 acessos de mandioca selecionados foram cultivadas em meio MS0,01 por 30 dias. Após esse período, as plantas com raízes formadas e altura média de 5 cm, foram extraídas dos tubos, lavada com um jato brando de água para retirada do meio de cultura e transferidas para copos plásticos descartáveis de 250 mL, contendo substrato comercial Carolina Soil suplementado com 10% de fibra de coco e 0,25% de micronutrientes, logo em seguida umedecido com bastante água (tipo II). Imediatamente após esses procedimentos, para criar um ambiente com alta umidade e evitar a desidratação e facilitar a adaptação às novas condições, estabeleceu-se uma câmara úmida inicial cobrindo cada planta com um copo plástico descartável de 200mL.

As plantas foram mantidas em casa de vegetação a aproximadamente 29 °C. A remoção da umidade foi gradual: os copos foram paulatinamente descobertos a partir do 15º dia e removidos totalmente após 20 dias de aclimação. As plantas permaneceram totalmente descobertas por mais 10 dias, recebendo irrigação por nebulização três vezes ao dia. Após o período total de 30 dias de aclimação, foram coletados dados de porcentagem de plantas sobreviventes.

2.8. Delineamento experimental

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com arranjo fatorial 20 × 2 × 2 (acessos × temperaturas × meios de cultivo), totalizando 80 combinações experimentais, com 15 repetições cada, compondo 1.200 unidades experimentais. Os tratamentos controle (absoluto, LS e PVS2) foram analisados separadamente por testes não paramétricos de Kruskal-Wallis e Wilcoxon. Para os dados da criopreservação, utilizaram-se modelos lineares

generalizados mistos (GLMM) (BOLKER et al., 2009; BROOKS et al., 2017), com distribuição binomial para recuperação, expressa como odds ratio. E, análise de correlações entre fases experimentais (controle vs. pós-crio) foram estudadas pelo coeficiente de Spearman (ρ). As análises foram realizadas no ambiente R (R Core Team, 2024), com auxílio dos pacotes tidyverse, lme4, glmmTMB, emmeans, ggeffects, ggplot2, FactoMineR, dplyr e corrplot, adotando-se nível de significância de $\alpha = 0,05$, com ajustes de comparações múltiplas quando necessário.

3. RESULTADOS E DISCURSÃO

3.1. Sobrevivência e taxas de recuperação das brotações controles

Aos 30 dias de cultivo *in vitro*, a frequência de recuperação dos ápices caulinares de mandioca manteve-se constante (mediana = 1) entre os tratamentos controle (Absoluto, Solução de Carga (LS), e PVS2) e entre os meios de recuperação (K0.5 e K0.5+), sem diferenças estatísticas significativas ($p > 0,48$). A altura das brotações (AP) (Tabela 1) mostrou variação apenas no grupo LS, onde o meio K0.5 promoveu crescimento significativamente superior ao K0.5+ ($p = 0,016$). Para os controles Absoluto e PVS2, não houve diferença significativa em AP ($p > 0,90$), entre os genótipos testados. O número de folhas (NF) manteve-se entre 1 e 2 unidades por explante em todos os grupos, sem diferenças significativas ($p > 0,27$).

Tabela 1. Efeito combinado dos tratamentos controle (Absoluto, LS e PVS2) e dos meios de recuperação (K0.5 e K0.5+) sobre características morfofisiológicas da mandioca aos 30 dias de cultivo, com comparações estatísticas não paramétricas.

Controle	Meio	Mediana			Kruskal-Wallis (ρ)			Wilcoxon (ρ)		
		R 30	AP	NF	R 30	A P	NF	R 30	A P	NF
Absoluto	K0.5	1	0,7	2	-	0,904	0,983	-	0,905	0,984
	K0.5+	1	0,7	2						
LS	K0.5	1	0,4	1	0,481	0,016*	0,308	0,482	0,016*	0,309
	K0.5+	1	0,3	1						
PVS2	K0.5	1	0,3	1	0,720	0,158	0,273	0,721	0,160	0,274
	K0.5+	1	0,3	1						

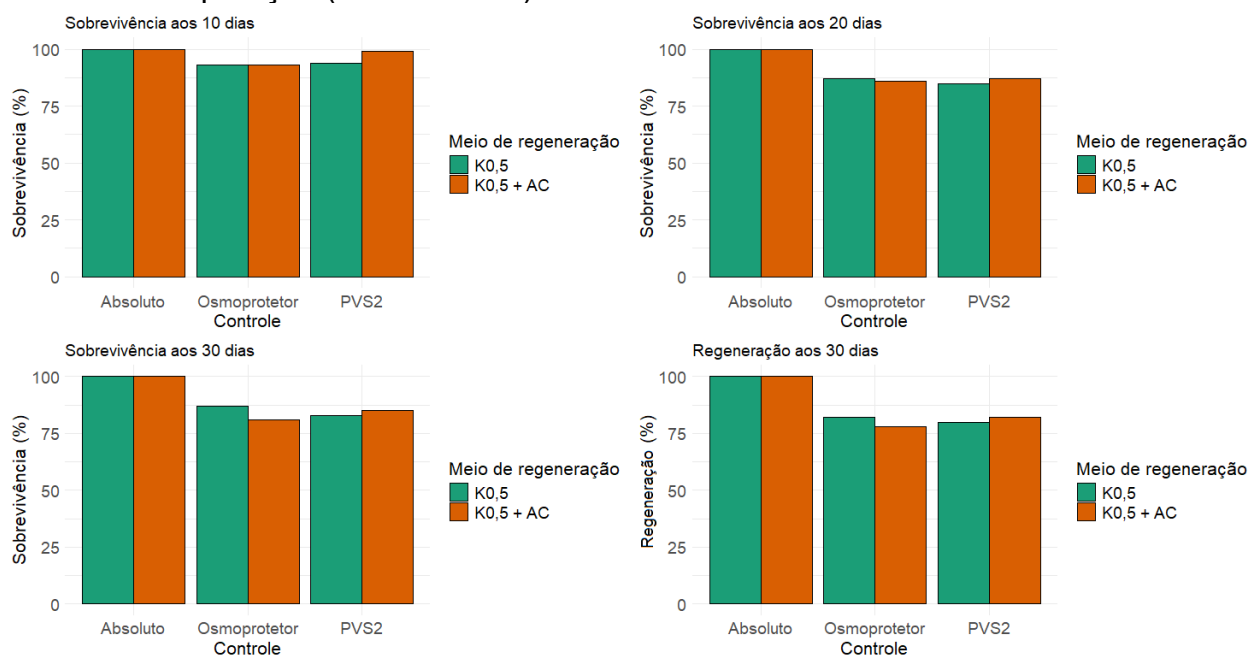
Todas as variáveis expressas são valores de mediana por grupo. Testes não paramétricos de Wilcoxon foram usados para comparar K0.5 vs K0.5+ dentro de cada controle; Kruskal-Wallis foi aplicado para avaliar o efeito do controle como um todo. *Significância estatística ($p < 0,05$). R 30 (recuperação aos 30 dias), AP (altura de brotações; cm), NF (número de folhas).

A estabilidade da recuperação nos tratamentos controle confirma a integridade fisiológica dos ápices caulinares de mandioca nas etapas pré-criogênicas, devido à alta taxa de recuperação de plantas nesta etapa, reforçando sua aptidão para protocolos de vitrificação. A ausência de efeito do PVS2 sobre a recuperação está em consonância com estudos de Souza et al. (2016) e Popova, Kulichenko e Kim (2023), que relatam a resistência e resiliência de meristemas tropicais a curtas exposições a solução de vitrificação, sem prejuízos à organogênese. A ausência de toxicidade do PVS2 é uma vantagem crucial, pois indica uma alta probabilidade de sucesso na fase subsequente de criopreservação (congelamento). A maior altura observada nos brotos do grupo controle LS (meio de carga osmoprotetora) em K0.5 pode refletir uma resposta transitória ao estresse osmótico, possivelmente mediada por alterações de reguladores de crescimento presente no meio de cultura. Essa modulação por hormônios e osmólitos é consistente com a descrição de Ruan et al. (2022), segundo a qual a exposição osmótica em cultivos de mandioca induz mudanças em glutaredoxinas e desencadeia sinais hormonais que favorecem a adaptação e o crescimento.

A uniformidade no número de folhas sugere uma morfogênese estável e previsível, característica desejável em protocolos de criopreservação voltados à conservação clonal (POPOVA; KULICHENKO; KIM, 2023). De forma geral, os resultados obtidos nesta fase são promissores, corroborando a robustez dos tecidos e a eficácia das etapas prévias à criopreservação.

A análise da Figura 2 evidencia que os 20 acessos de *Manihot esculenta* apresentaram altas taxas de sobrevivência aos 10, 20 e 30 dias sob condições controle, com médias superiores a 83% em todos os grupos avaliados. Embora pequenas reduções tenham sido registradas ao longo do tempo, especialmente após o 20º dia, a manutenção da viabilidade em níveis elevados demonstra boa estabilidade fisiológica dos explantes aos procedimentos pré-criogênicos, validando a aptidão do material para protocolos de criopreservação. A recuperação aos 30 dias também se manteve acima de 80%, com pouca variação entre os meios de cultivo (K0.5 e K0.5+), reforçando a consistência da resposta morfogênica independentemente da formulação utilizada.

Figura 2. Porcentagem de sobrevivência aos 10, 20 e 30 dias e recuperação dos ápices caulinares aos 30 dias de cultivo *in vitro* de 20 acessos de mandioca sob três condições controle (absoluto, solução de carga (LS) e PVS2), empregando dois meios de recuperação (K0.5 e K0.5+).

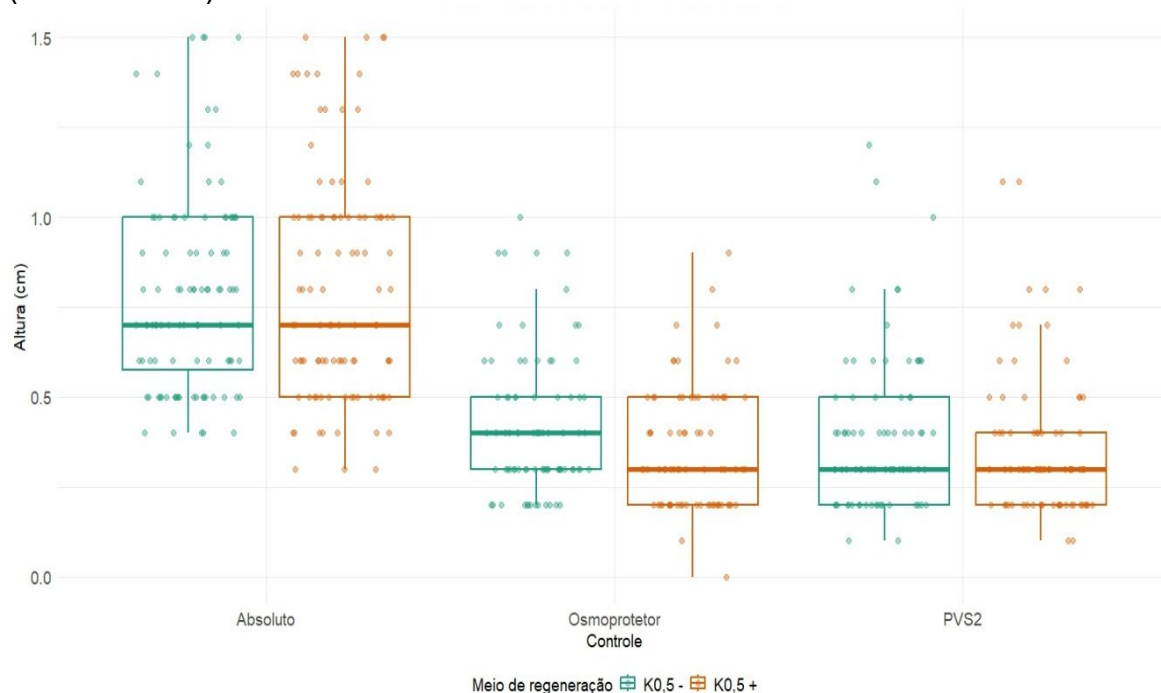


Os resultados obtidos evidenciam que os ápices caulinares de mandioca apresentaram elevada responsividade morfogênica às etapas pré-criogênicas, com taxas de recuperação consistentes entre os meios de recuperação testados. Esse comportamento está em consonância com relatos de Charoensub, Hirai e Sakai (2004) e com estudos recentes que destacam a importância da qualidade fisiológica dos explantes e da otimização das condições prévias à crioconservação para assegurar respostas regenerativas (ESCOBAR et al., 2014; POPOVA; KULICHENKO; KIM, 2023). De forma semelhante, Souza et al. (2016) demonstraram respostas comparáveis entre diferentes formulações de meios de recuperação em culturas tropicais submetidas a etapas prévias de osmoproteção, reforçando que a estabilidade observada decorre da qualidade do material vegetal utilizado e da adequação dos meios de recuperação. Esses achados estabelecem uma base robusta para a etapa subsequente de exposição às soluções vitrificantes e ao nitrogênio líquido, ao evidenciar a integridade e o potencial regenerativo do material antes da crioconservação propriamente dita.

3.2. Altura das brotações controles

A altura das brotações foi maior nos tratamentos sem pré-exposição a soluções osmoprotetoras (controle absoluto), evidenciando maior variabilidade na resposta morfogênica entre os acessos. O meio K0.5 favoreceu brotações ligeiramente mais altas em todos os controles (Figura 3). Já nos tratamentos com LS e PVS2, as brotações apresentaram distribuição mais concentrada nos boxplots e menor amplitude interquartílica, resultando em altura reduzida, especialmente no meio básico (K0.5). Esses resultados sugerem que os acessos expressaram seu potencial de resposta de forma mais pronunciada em condições livres de estresse osmótico, refletindo um possível efeito fisiológico adverso das soluções osmoprotetoras.

Figura 3. Altura das brotações regeneradas aos 30 dias em função dos tratamentos controle (absoluto, solução de carga (LS) e PVS2) e dos meios de recuperação (K0.5 e K0.5+) em 20 acessos de *Manihot esculenta* cultivados *in vitro*.



Os resultados obtidos nos controles evidenciaram o potencial fisiológico dos acessos testados para regenerar brotações com vigor considerável. A presença de soluções como LS e PVS2 resultou em brotações de menor altura, possivelmente em razão do estresse osmótico e ao efeito de alguns componentes das soluções usadas tais como o DMSO, etilenoglicol e glicerol, presentes no PVS2, conforme relatado por Zámečník et al. (2012) e Benelli (2021). Esse padrão também foi observado por Ndiaye e Panis (2025), que descreveram efeitos

inibitórios semelhantes na recuperação de mandioca senegalesa após exposição ao PVS2. Ainda assim, a resposta foi positiva nos meios de recuperação, inclusive naqueles suplementados com AC (K0.5+), que atuou como fonte natural de citocininas, aminoácidos e açúcares.

A performance superior nos controles indica que esses acessos apresentam resiliência fisiológica frente a condições adversas. Esse vigor inicial sugere que seriam capazes de suportar os estresses adicionais impostos pelos tratamentos criogênicos. Essa interpretação é sustentada pelos dados da Figura 2, que mostram porcentagens de recuperação elevadas e distribuição consistente das alturas, reforçando a capacidade adaptativa dos acessos ao protocolo testado.

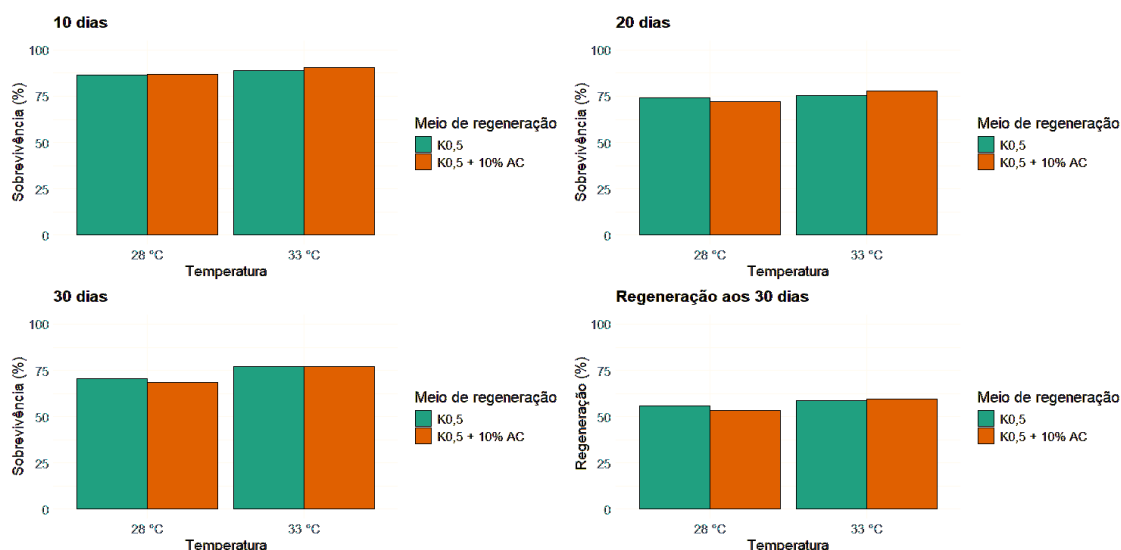
3.3. Resposta à criopreservação

3.3.1. Eficiência pós-congelamento: sobrevivência e recuperação

A sobrevivência dos ápices caulinares pós-criopreservação foi elevada nas avaliações aos 10 dias, com médias variando entre 88 e 90% para as condições testadas. Aos 20 e 30 dias, observou-se queda gradual, estabilizando entre 70% e 78%, com ligeira vantagem para a temperatura de 33 °C. A recuperação aos 30 dias acompanhou esse padrão, com valores entre 53% e 60%, levemente superior no meio suplementado com AC (K0.5+), especialmente a 33 °C (Figura 4). No entanto, essas diferenças não foram expressivas entre os meios empregados.

A elevada taxa de sobrevivência inicial confirma a eficácia do protocolo de crio-canaleta e vitrificação (CCV) na proteção dos ápices de mandioca contra danos causados pelo contato direto com o nitrogênio líquido, incluindo formação de fissuras, choque térmico abrupto e lesões estruturais decorrentes da expansão desigual da água intracelular. Esses resultados estão em consonância com Benelli (2021) e Wang et al. (2021), que destacam a importância da vitrificação rápida e da reexpansão eficiente para o sucesso da criopreservação. A redução gradual das taxas ao longo do tempo pode refletir estresses fisiológicos acumulados, como estresse oxidativo, toxicidade residual de crioprotetores ou reativação metabólica incompleta, conforme relatado por Zámečník et al. (2012) e por Popova, Kulichenko e Kim (2023).

Figura 4. Porcentagem geral de sobrevivência e recuperação de ápices caulinares de mandioca submetidos à criopreservação, cultivados em dois meios (K0.5 e K0.5 + 10% de AC) e duas temperaturas (28 °C e 33 °C). Avaliações aos 10, 20 e 30 dias para sobrevivência e aos 30 dias para recuperação.



A adição da AC ao meio K0.5 (K0.5+), embora não tenha promovido diferenças significativas, apresentou tendência de melhora na recuperação em condições de temperatura de 33 °C. Este efeito pode ser atribuído à presença de compostos naturais como açúcares, aminoácidos e fitormônios, já reconhecidos por promoverem recuperação pós-estresse em tecidos vegetais *in vitro* (HERNÁNDEZ-RAMÍREZ et al., 2020).

A recuperação dos ápices caulinares de mandioca aos 30 dias pós-criopreservação variou amplamente entre os acessos, refletindo forte interação entre genótipo, temperatura de incubação e composição do meio de recuperação. Em geral, a incubação a 33 °C promoveu maiores taxas de recuperação do que a 28 °C, destacando os acessos como BRS Corrente, BRS Caipira, BGM 0540 e BRS Novo Horizonte alcançaram valores próximos ou superiores a 90% de recuperação. Em contrapartida, genótipos como BGM 0029, BRS 400, BRS Olho Roxo e BRS Jari mantiveram desempenho limitado ($\cong 33\%$), independentemente do ambiente, confirmando sua baixa responsividade.

A probabilidade de recuperação aos 30 dias (Reg30; 0 = falha, 1 = sucesso) foi modelada por um modelo linear generalizado misto (GLMM) com família binomial e função de ligação logit. O modelo incluiu temperatura (28 °C; 33 °C), meio (K0.5; K0.5+) e sua interação como efeitos fixos, e Acesso como efeito fixo

de interesse (variável categórica com referência BGM 0029). A estrutura de correlação das repetições foi modelada por um efeito aleatório de repetição u_l . Em notação:

$$\text{logit}(p_{ijk}) = \beta_0 + \beta_1 \text{Temp}_i + \beta_2 \text{Meio}_j + \beta_3 (\text{Temp}_i \times \text{Meio}_j) + \gamma_k \text{Acesso}_k + u_l$$

Onde:

p_{ijk} = é a probabilidade de recuperação do ápice caulinar do acesso k no meio j na temperatura i;

β_0 = É o intercepto corresponde ao log-odds de recuperação para o acesso de referência (BGM 0029) sob os níveis de referência de temperatura (28 °C) e meio (K0,5);

$\beta_1, \beta_2, \beta_3$ = São os coeficientes fixos dos efeitos principais e interação;

γ_k = São os coeficientes dos demais acessos (em relação ao acesso de referência); com $u_l \sim N(0, \sigma^2_{rep})$.

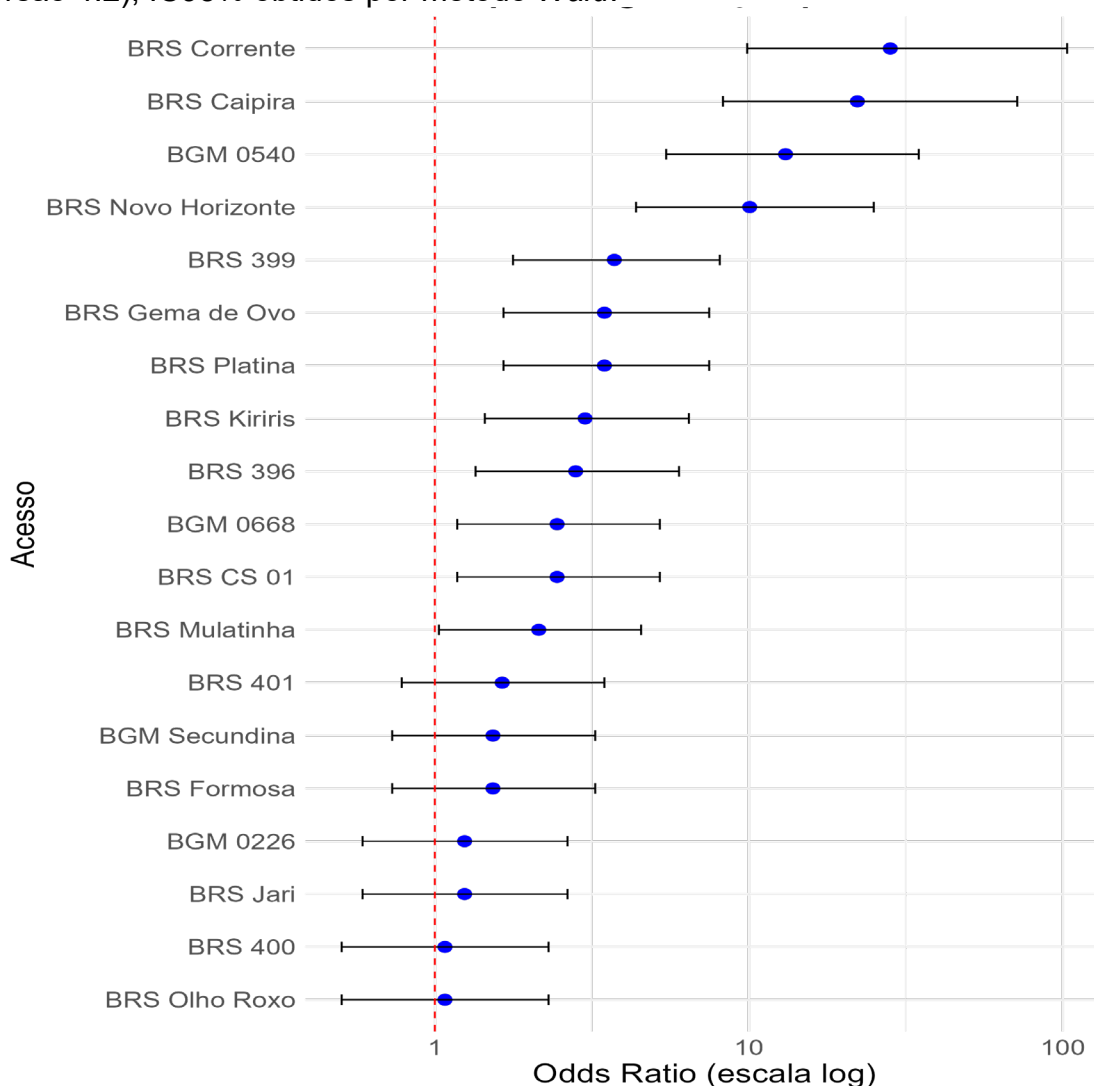
Relatamos os coeficientes em escala logit, transformados em odds ratios (OR = exp(coef)) com IC95% e p-valores, além de predições marginais por acesso. O modelo não apresentou superdispersão (razão = 1,066; p = 0,568) e o efeito aleatório de repetição foi altamente significativo ($\Delta\chi^2 = 1048,9$; p < 2.2×10^{-16}), garantindo robustez às inferências. As análises foram realizadas em R (versão 4.2) com o pacote lme4/glmmTMB e o cálculo de IC95% por método (Wald).

A análise por GLMM confirmou forte heterogeneidade genotípica na recuperação (Figura 5). O efeito global da temperatura foi significativo (p = 0,00026), com incubação a 33 °C associada a aumento das razões de chance de recuperação em relação a 28 °C (OR = 2,96). O meio suplementado com água de coco (K0.5+) não apresentou efeito global significativo (OR = 0,82; p = 0,48), embora beneficie alguns acessos em particular como o BRS Olho Roxo.

Entre os genótipos, BRS Corrente (OR = 28,2; IC95%: 9,9–103,3; p $\approx 1,2 \times 10^{-8}$) e BRS Caipira (OR = 22,2; IC95%: 8,3–71,6; p $\approx 1,1 \times 10^{-8}$) exibiram probabilidades de recuperação significativamente superior, com razão de chance de recuperação 28 e 22 vezes superior ao intercepto de referência (BGM 0029) respectivamente, confirmadas com a porcentagem de recuperação (Figura 6) e pelo ranqueamento descritivo na Figura A.1 (Apêndice A). A maioria das diferenças

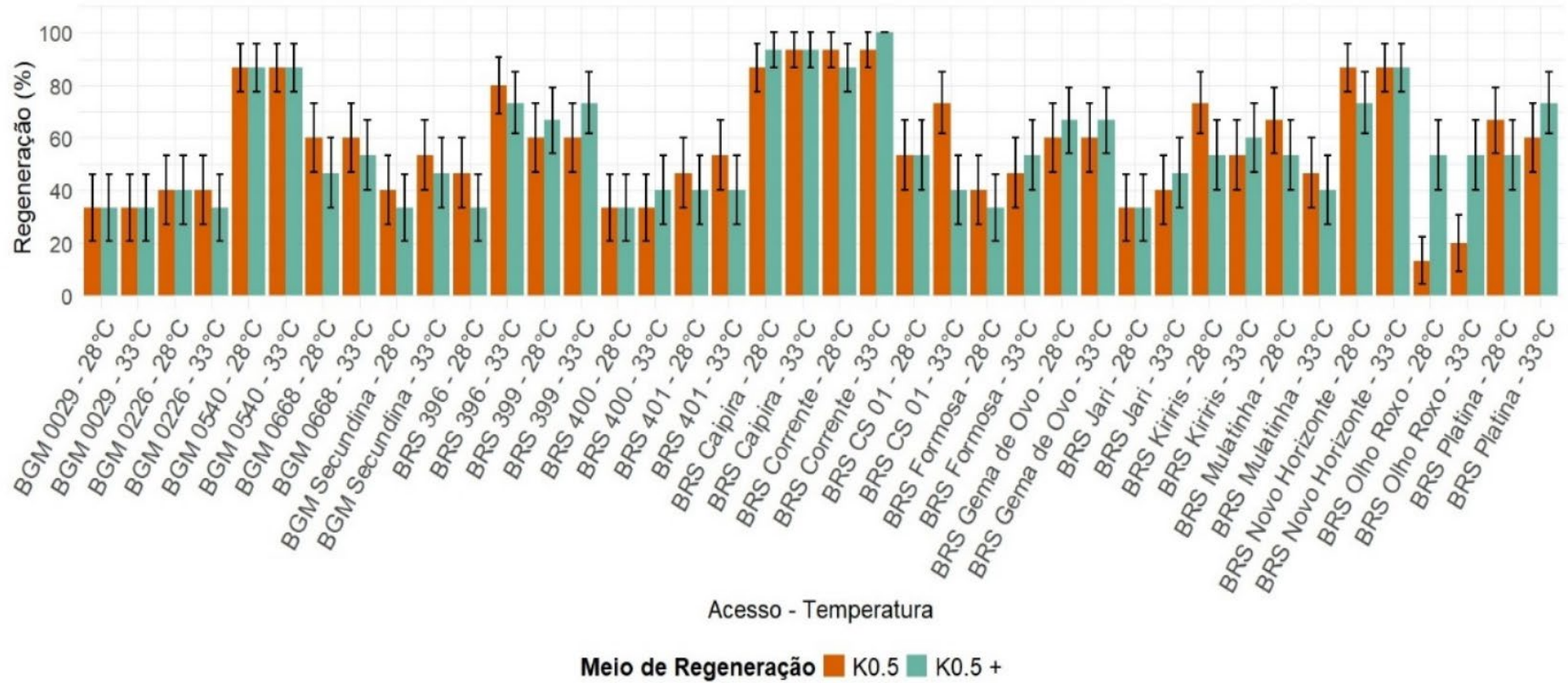
relatadas encontra correspondência nas porcentagens médias de recuperação por acesso, indicando que a resposta é genótipo dependente.

Figura 5. Odds ratios (OR) para probabilidade de recuperação (Reg30) estimados por GLMM binomial (link logit) com efeito aleatório de repetição. Pontos = OR estimada para cada acesso ($\exp(\text{coef})$); barras horizontais = IC95% ($\exp(\text{confint})$). Linha tracejada vermelha em $OR = 1$ indica ausência de efeito em relação ao intercepto (acesso de referência: BGM 0029). $OR > 1$ indica maior chance de recuperação que a referência. Cálculos realizados em R (pacote lme4/glmmTMB; versão 4.2); IC95% obtidos por método *Wald*.



Outros acessos de alto desempenho incluíram BGM 0540 ($OR = 13,10$) e BRS Novo Horizonte ($OR = 10,07$), todos acima de 80%. Em contraste, acessos como BRS 400 ($OR = 1,1$), BRS Olho Roxo ($OR = 1,1$), BRS Jari ($OR = 1,2$) e BGM 0226 ($OR = 1,2$) não diferiram estatisticamente do intercepto (referência BGM 0029, $OR = 1,0$), indicando um desempenho inferior na recuperação.

Figura 6. Porcentagem média de recuperação por acesso de mandioca (\pm EP), em função da temperatura (28 °C e 33 °C) e do meio (K0.5 e K0.5+). O padrão descritivo apresentado confirma as tendências inferenciais estimadas pelo GLMM (Figura 5).



O ranqueamento descritivo (Apêndice 1) confirmou os achados do modelo, com BRS Corrente, BRS Caipira, BGM 540 e BRS Novo Horizonte exibindo as maiores porcentagens de recuperação (>90%) (Figura 6 / Apêndice 1), enquanto os acessos de baixo desempenho se concentraram na cauda inferior.

A presença de AC contribuiu positivamente para o desempenho regenerativo de vários acessos, como BRS 399, BRS Platina, BRS Gema de Ovo e principalmente o BRS Olho Roxo (Figura 6), que chegou a triplicar a porcentagem de recuperação, indicando que os compostos orgânicos presentes no suplemento exercem papel determinante em alguns genótipos.

A forte influência do genótipo sobre a recuperação confirma achados prévios em mandioca, como os de Escobar et al. (2014), que relataram diferenças marcantes entre clones recalcitrantes e responsivos submetidos ao droplet-vitrification (DV). Fenômeno semelhante foi relatado em outras culturas clonais, incluindo batata e inhame, onde a constituição genética exerce papel determinante na viabilidade pós-criogênica (POPOVA et al., 2015).

O desempenho superior de acessos como BRS Corrente e BRS Caipira sugere resiliência intrínseca ao estresse do congelamento, provavelmente associada à composição da parede celular e à ativação de mecanismos antioxidantes, fatores-chave na proteção contra danos de gelo e estresse osmótico (NAGEL et al., 2024). Em contraste, acessos como BRS 400 e BRS Olho Roxo mostraram-se pouco responsivos, indicando a necessidade de protocolos mais específicos ou seleção de tecidos fisiologicamente mais competentes para otimizar seu resgate.

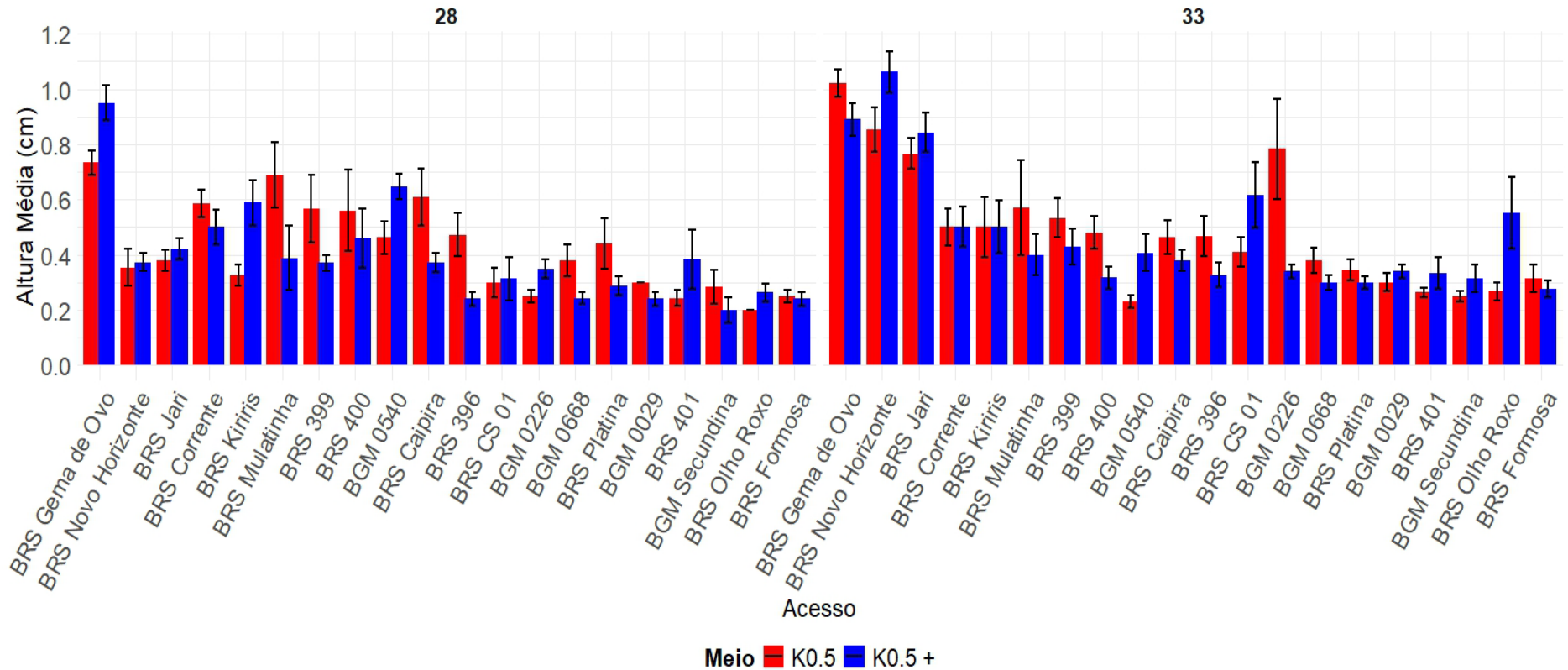
A influência positiva da temperatura de 33 °C reforça evidências de que condições térmicas próximas ao ótimo fisiológico aceleram a retomada metabólica e a divisão celular em tecidos meristemáticos (BENELLI, 2021; NAGEL et al., 2024). Embora o efeito global da AC não tenha sido significativo no GLMM, respostas positivas em acessos como BRS 399, BRS Platina, BRS Gema de Ovo e BRS Olho Roxo confirmam o potencial organogênico de seus compostos naturais, como açúcares, aminoácidos e fitohormônios (MONADAL et al., 2012; KHATUN; ROY; RAZZAK, 2018; POPOVA; KULICHENKO; KIM, 2023). Esse efeito genótipo-dependente é coerente com as observações de Ndiaye e Panis (2025) em cassava africana, onde protocolos otimizados foram fundamentais para superar a recalcitrância parcial.

Por fim, a aplicação do sistema de crio-canaletas representa uma inovação metodológica frente ao droplet-vitrification clássico (SAKAI; ENGELMANN, 2007). Ao reduzir o contato direto dos ápices com o nitrogênio líquido e assegurar maior uniformidade térmica, essa abordagem promove resultados mais consistentes e comparáveis entre genótipos, ampliando a aplicabilidade da criopreservação nos bancos de germoplasma de mandioca da Embrapa. Além de fornecer proteção física e uniformidade térmica, destaca-se que a integração entre novas metodologias e estratégias genótipo-específicas é essencial para superar barreiras de recalcitrância e consolidar a criopreservação como uma ferramenta robusta para a conservação de recursos genéticos vegetais. Essa interpretação confirma recomendações recentes de protocolos que enfatizam a importância da fase de recuperação pós-descongelamento (Wang et al., 2021; Ndiaye; Panis, 2025).

3.3.2. Desenvolvimento das brotações regeneradas

A altura das brotações regeneradas (Figura 7) apresentou forte variação genotípica em resposta às condições de recuperação. Em geral, a incubação a 33 °C promoveu maior crescimento, sobretudo em acessos como BRS Gema de Ovo, BRS Novo Horizonte, BRS Jari, BGM 0226 e BRS CS01 respectivamente, com valores médios próximo ou acima de 0,8 cm. Já para a temperatura de recuperação de 28 °C, se destacaram os acessos BRS Gema de Ovo, BRS Mulatinha, BRS Kiriris, BRS corrente, BRS 399, BRS 400, BGM 0540 e BRS Caipira, com valores de altura média próximas e pouco acessos superiores a 0,7 cm, indicando interação positiva entre estímulo térmico e efeito não significativo para a suplementação orgânica. Esse padrão confirma o efeito positivo da temperatura elevada, já observado para a porcentagem de recuperação (Figura 6), e reforçando o caráter sinérgico entre temperatura e suplementação com AC na promoção do desenvolvimento pós-criogênico para os acessos menos responsivos.

Figura 7. Altura média de brotações regeneradas de ápices caulinares de mandioca aos 30 dias após criopreservação em nitrogênio líquido, em função do acesso, da temperatura de incubação (28 °C e 33 °C) e do meio de recuperação (K0.5 e K0.5+). Resultados expressos como distribuição de valores por ambiente de cultivo e em ordem decrescente de desenvolvimento, evidenciando as diferenças genotípicas na resposta morfogênica.



Os acessos BGM 0029, BRS 401 BGM Secundina e BRS Olho Roxo apresentaram desenvolvimentos reduzidos (<0,4 cm) independentemente do ambiente, mesmo sob condições otimizadas, coincidindo com suas baixas taxas de recuperação observadas nas Figuras 6. Esses resultados demonstram que, além da sobrevivência inicial, a capacidade de crescimento vegetativo após o descongelamento foi modulada por fatores genotípicos e ambientais, evidenciando a o efeito genótipo dependente em cultura de tecidos entre acessos.

O maior alongamento obtido a 33 °C confirma que a temperatura exerce papel determinante na fase de recuperação pós-criogênica, estimulando a atividade enzimática associada à alongação celular e favorecendo o restabelecimento fisiológico, como já relatado em espécies tropicais por Benelli (2021) e Wang et al. (2021). A resposta positiva à temperatura elevada confirma estudos recentes que destacam o papel de condições térmicas otimizadas na recuperação de tecidos vegetais, favorecendo divisão celular e expansão de tecidos após criopreservação (WANG et al., 2021; NAGEL et al., 2024). Os resultados indicam que o crescimento pós-descongelamento, assim como a sobrevivência inicial, é condicionado pelo genótipo. Dados semelhantes aos encontrados por Escobar et al. (2014), que descrevem diferenças marcantes entre clones responsivos e recalcitrantes submetidos ao droplete-vitrificação.

A água de coco não apresentou efeito deletério; contudo, nos acessos menos responsivos à crioconservação, o meio K0.5+ exerceu efeito benéfico para este experimento, necessitando de estudos mais aprofundado para comprovar seus efeitos na recuperação. Esse resultado está em consonância com Popova, Kulichenko e Kim (2023), que destacaram a influência do balanço osmótico e de reguladores naturais na retomada metabólica. Entretanto, a ausência de resposta em acessos recalcitrantes demonstra que a suplementação com AC não substitui a influência genotípica, como evidenciado por Ndiaye e Panis (2025), que observaram respostas contrastantes em clones africanos de mandioca submetidos à droplet-vitrificação.

A consistência entre os resultados de recuperação percentual (Figura 6) e altura de brotações (Figura 7) demonstra que acessos como BRS Corrente, BRS Caipira, BGM 0540 e BRS Novo Horizonte apresentam não apenas maiores taxas de recuperação, mas também vigor vegetativo superior, caracterizando-os como genótipos promissores para criopreservação. Em contraste, acessos como BGM

0029, BRS 400 e BRS Olho Roxo apresentaram baixa tolerância aos procedimentos, com desempenho inferior em ambos os parâmetros, o que demanda o desenvolvimento de protocolos de criopreservação otimizados para esses genótipos de baixa aptidão.

O uso de crio-canaletas neste estudo foi decisivo para minimizar danos decorrentes do contato direto com o nitrogênio líquido, assegurando maior uniformidade e permitindo evidenciar diferenças entre genótipos. Esses achados ressaltam que a integração de inovações metodológicas com abordagens genótipo-dependentes é fundamental para otimizar a criopreservação da mandioca e ampliar sua aplicabilidade em programas de conservação de germoplasma.

3.4. Comparação entre droplet vitrification e crio-canaletas na criopreservação

O sistema clássico de droplet vitrification (DV) posiciona os ápices em microgotas de solução crioprotetora (geralmente PVS2) sobre tiras de alumínio e os submete à imersão direta em nitrogênio líquido. Estudos relatam altas taxas de resfriamento e aquecimento para esse sistema, atribuídas ao pequeno volume de solução e à grande razão superfície/volume (PANTA et al., 2014; KIM, 2023; BETTONI; CHEN; VOLK, 202–). No entanto, também descrevem a possibilidade de gradientes térmicos abruptos e de contato direto com o NL, associados a estresses físicos e osmóticos (PERÁN et al., 2006; KIM, 2023). Além disso, a manipulação de gotas muito pequenas pode levar a perdas por adesão ou flutuação, o que pode dificultar padronização em protocolos de maior escala (KIM, 2023; BETTONI; CHEN; VOLK, 202–).

Na metodologia de crio-canaletas (CCV), utilizam-se pequenas estruturas de papel-alumínio em forma de calha (2 cm de comprimento por $\approx 0,2 \text{ cm} \times 0,2 \text{ cm}$ de diâmetro), semipreenchidas com PVS2, nas quais os ápices são inseridos. Essa configuração mantém volumes reduzidos de solução e acrescenta uma barreira física parcial entre o explante e o nitrogênio líquido, hipótese descrita em técnicas análogas, como o encapsulamento (SAKAI; ENGELMANN, 2007; KACZMARCZYK et al., 2012; WANG et al., 2021; NDIAYE; PANIS, 2025). Ainda não há dados comparativos diretos que confirmem diferenças significativas em velocidade de resfriamento ou em taxas de recuperação entre CCV e DV, sendo necessária investigação futura.

A crio-canaletas pode oferecer três vantagens, a serem verificadas em estudos comparativos futuros:

1. Possível obtenção de taxas de resfriamento e aquecimento elevadas, pela pequena quantidade de solução por ápice e alta razão superfície/volume, o que poderá minimizar gradientes térmicos internos, hipótese que demanda confirmação experimental em comparação direta com DV.
2. Fornece proteção física parcial do explante contra choques térmicos diretos, pois a parede metálica funciona como barreira relativa, mantendo-o imerso no crioprotetor, mas reduzindo parcialmente o contato direto com o nitrogênio líquido, de forma análoga ao sistema de encapsulamento (KACZMARCZYK et al., 2012).
3. Pode atuar de maneira semelhante ao encapsulamento no fornecimento de um “buffer” frente a estresses mecânicos, osmóticos ou térmicos, aspecto descrito para explantes encapsulados em alginato, que resistem melhor a desidratação severa ou exposição prolongada a crioprotetores e mantêm maior integridade morfológica e regenerativa (PAULET; ENGELMANN; GLASZMANN, 1993; PRUDENTE et al., 2017; ZARGAR AZAD; KAVIANI; SEDAGHATHOOR, 2024), mas esta equivalência ainda necessita de validação específica para a técnica das crio-canaletas.

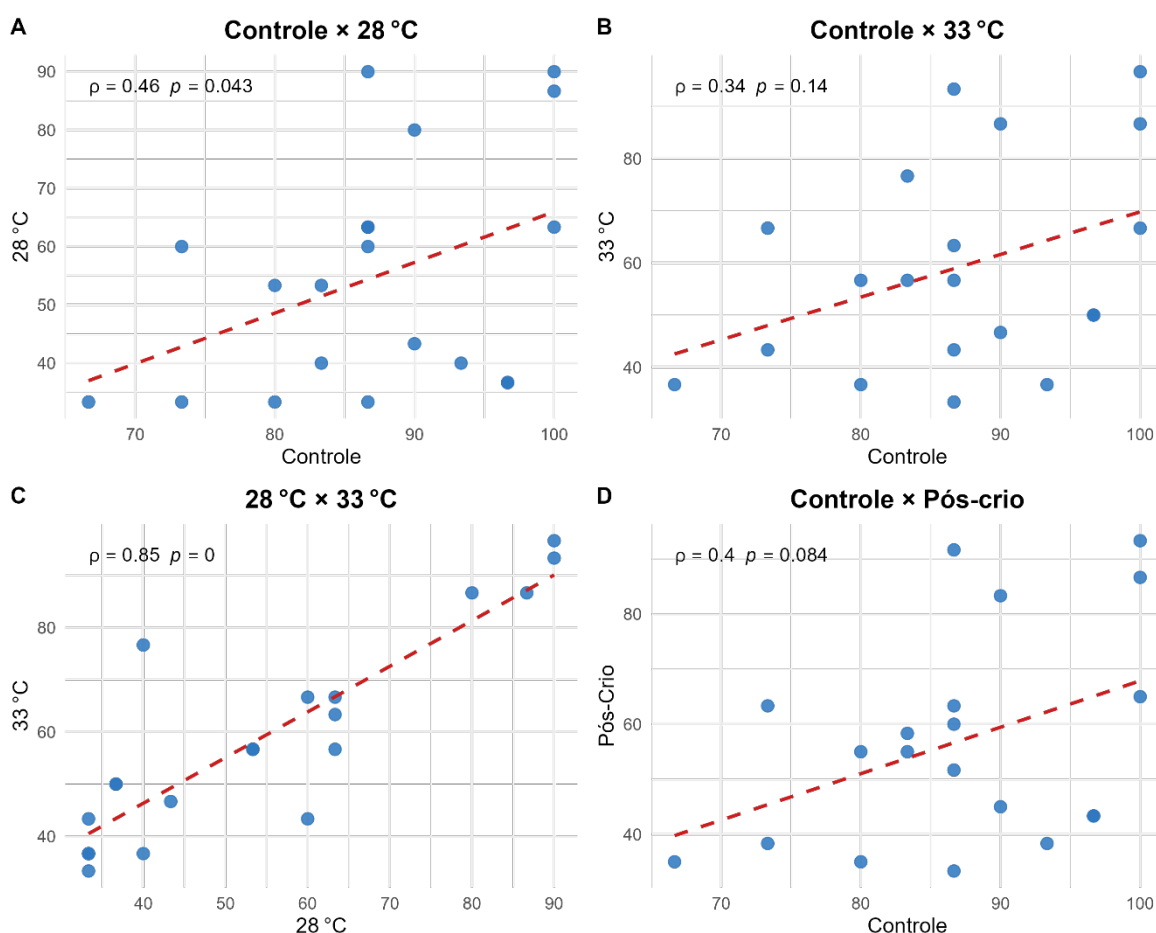
Assim, a CCV pode representar uma alternativa promissora a ser explorada em estudos futuros, por combinar baixo volume de solução com um suporte que potencialmente oferece proteção física parcial ao explante e facilita o manuseio. Além disso, o recipiente utilizado na CCV permite acomodar uma maior quantidade de ápices por unidade, o que contribui para otimizar o uso do espaço e aumentar a eficiência do processo. A avaliação sistemática dessa técnica em comparação com métodos tradicionais permitirá determinar sua real eficácia e possíveis benefícios para espécies sensíveis ou explantes frágeis.

3.5. Correlações entre tratamentos

As análises de correlação de Spearman (Figura 8) demonstram padrões distintos de associação entre os desempenhos regenerativos nas diferentes fases do experimento. A associação entre os tratamentos pós-criogênicos a 28 °C e 33 °C foi muito forte e estatisticamente significativa ($\rho = 0,85$; $p < 0,001$), indicando estabilidade da resposta regenerativa frente a variações térmicas moderadas. Já a

correlação entre o controle e o ambiente a 28 °C foi moderada e significativa ($\rho = 0,46$; $p = 0,043$), enquanto com 33 °C foi mais fraca e não significativa ($\rho = 0,34$; $p = 0,14$). A comparação entre o controle e a média geral dos ambientes pós-criogênicos também revelou correlação moderada ($\rho = 0,40$), porém sem significância estatística ($p = 0,084$). Esses achados indicam que o desempenho *in vitro* sob condições ideais não prediz adequadamente a recuperação após criopreservação.

Figura 8. Correlação de Spearman (ρ) entre os valores médios de recuperação aos 30 dias de acessos de mandioca nas diferentes fases do experimento: (A) controle (sem congelamento) versus pós-crio a 28 °C; (B) controle versus pós-crio a 33 °C; (C) 28 °C versus 33 °C; e (D) controle versus média geral dos ambientes pós-criogênicos. Cada ponto representa um acesso genético. As linhas tracejadas indicam a tendência linear; os coeficientes ρ e os respectivos valores de p estão apresentados em cada painel.



A elevada correlação observada entre os ambientes a 28 °C e 33 °C evidencia que a resposta regenerativa dos acessos de mandioca foi consistentemente mantida entre condições térmicas moderadas, mesmo após o estresse imposto pela criopreservação. Esse comportamento sugere a presença de mecanismos genéticos de resiliência, compatíveis com o conceito de estabilidade genotípica descrito por Adjebeng-Danquah et al. (2020) ao investigar o desempenho de acessos de mandioca sob diferentes condições ambientais.

A ausência de correlação significativa entre os dados do controle e os ambientes pós-criogênicos, por sua vez, indica que a viabilidade dos tecidos sob condições ideais não garante eficiência regenerativa após estresse térmico e osmótico. Esse padrão está alinhado com as observações de Popova, Kulichenko e Kim (2023), que destacam a importância das condições pós-descongelamento para o sucesso da recuperação e sugerem que a criotolerância está associada a fatores fisiológicos específicos não evidentes em condições não estressantes.

Nesse contexto, a seleção de materiais para criopreservação deve priorizar o desempenho em ambientes pós-descongelamento, e não apenas sob cultivo padrão, conforme defendido por Kulak et al. (2022) em suas diretrizes para conservação biotecnológica de germoplasma. Essa abordagem permite identificar genótipos mais robustos e responsivos, essenciais para o sucesso em programas de longo prazo.

3.6. Aclimatização

A sobrevivência das plantas de mandioca durante a aclimatização (Figura 9) variou conforme o meio de cultura utilizado na recuperação, a temperatura de incubação e o acesso genético. Brotações regeneradas no meio K0.5+ apresentaram taxa de sobrevivência (97,9%) em comparação ao meio K0.5 (98,4%), ambos com números elevados de aclimatização ($n = 187/191$ e $n = 184/187$, respectivamente) (Figura 10).

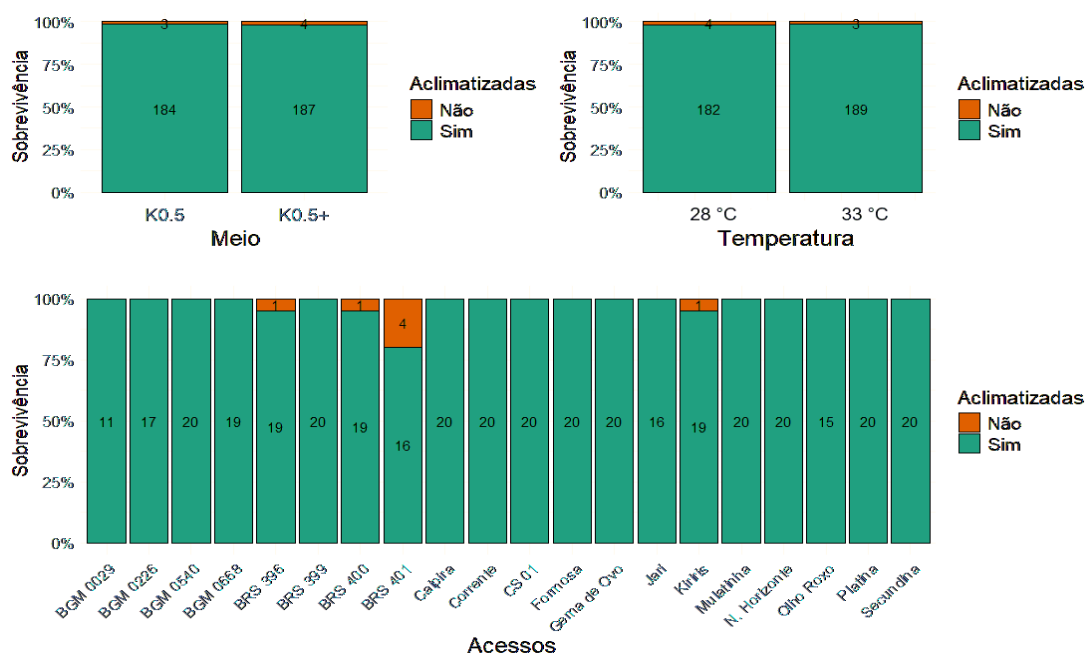
Em relação à temperatura, não foi observada diferença significativa na sobrevivência das plantas. Contudo, a incubação a 33 °C resultou em uma taxa de sobrevivência ligeiramente superior (98,4% ou 192 plantas aclimatizadas) em comparação com 28 °C (97,9% ou 186 plantas aclimatizadas).

Figura 9. Etapa da aclimatização das plantas regeneradas da criopreservação, (A) copos plásticos com mistura de substrato, (B) plantas em processo de aclimatização mantida em câmara úmida pela união de 2 copos, (C) plantas aclimatizadas aos 30 dias na etapa de avaliação.



A análise por acesso revelou altas taxas de sobrevivência, variando de 80% a 100%. A maioria dos acessos, incluindo BGM 0029, BGM 0226, BGM 0540, BGM 0668 e as diversas variedades, atingiram 100% de sobrevivência. Apenas BRS 396 (95,0%), BRS 400 (95,0%), BRS 401 (80,0%) e BRS Kirirris (95,0%) apresentaram perdas. A quantidade reduzida de plantas aclimatizadas de alguns acessos foi em função do número de plantas regeneradas inferior a 5 por tratamento (Figura 10).

Figura 10. Taxa de sobrevivência de plantas de mandioca durante a aclimatização, de acordo com (A) o meio de cultura utilizado na recuperação *in vitro* (K0.5 e K0.5+), (B) a temperatura de incubação (28 °C e 33 °C) e (C) os diferentes acessos genéticos avaliados. Os números dentro das barras indicam a quantidade total de ápices utilizados na aclimatização.



Os resultados obtidos demonstram que os 20 acessos de mandioca regenerados após criopreservação apresentaram excelente estado fisiológico, o que se refletiu em altos índices de sobrevivência durante a aclimatização. A robustez das brotações regeneradas, aliada à eficiência dos meios de cultivo utilizados nas etapas de recuperação e alongamento (meio MS0,01), permitiu não apenas a retomada do crescimento *in vitro*, mas também o fechamento completo do ciclo de conservação e recuperação das plantas, com sucesso em todas as fases do protocolo, incluindo a aclimatização *ex vitro*. Esse desempenho positivo

confirma que a manutenção da qualidade fisiológica dos explantes é determinante para o sucesso da criopreservação, como também destacado por Zimmerman et al. (2007), que relataram a importância do vigor inicial e do controle gradual das condições ambientais para minimizar perdas. Da mesma forma, Gado et al. (2022) reforçam que substratos adequados e regulador de crescimento durante a aclimatização são fundamentais para garantir elevadas taxas de sobrevivência. Esses resultados indicam que o protocolo proposto é eficiente e viável para assegurar a conservação segura de germoplasma de mandioca em nitrogênio líquido, com posterior recuperação completa das plantas.

4. CONCLUSÕES

O meio K0.5 favoreceu o alongamento celular, enquanto o K0.5+ induziu maior recuperação, associada à formação de calo na base das brotações recuperadas.

A temperatura de 33 °C foi mais eficiente na recuperação pós-criogênica, devendo ser explorada em novos experimentos. A variabilidade genotípica reforça a necessidade de abordagens específicas.

As variedades BRS Corrente, BRS Caipira, BRS Novo Horizonte, BGM 0540 se destacaram, apresentando resultados superiores às demais.

O sistema CCV mostrou-se seguro, eficiente e reprodutível, consolidando-se como uma alternativa viável aos protocolos convencionais de droplet vitrification.

Os acessos criopreservados apresentaram altas taxas de aclimatização, possibilitando a recuperação completa das plantas empregadas no experimento.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADJEBENG-DANQUAH, J. et al. Genetic diversity and population structure analysis of Ghanaian and exotic cassava accessions using simple sequence repeat (SSR) markers. **Heliyon**, v. 6, n. 1, e03154, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e03154>

BARROS, T. B.; TONIOLLI, R. Uso potencial da água de coco na tecnologia de sêmen. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 35, n. 4, p. 400-407, 2011.

BENELLI, C. Plant cryopreservation: a look at the present and the future. **Plants**, v. 10, n. 12, p. 2744, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/plants10122744>

BENSON, E. E.; HARDING, K. Cryopreservation of Shoot Tips and Meristems: An Overview of Contemporary Methodologies. In: LOYOLA-VARGAS, V.; OCHOA-

ALEJO, N. (ed.). **Plant cell culture protocols**. v. 877. Totowa, NJ: Humana Press, 2012. p. 191-226. (Methods in Molecular Biology). DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-61779-818-4_16

BETTONI, J. C.; CHEN, K.; VOLK, G. M. An overview of shoot tip cryopreservation. In: **Training in plant genetic resources: cryopreservation of clonal propagules**. Fort Collins, CO: Colorado State University, [202-]. Disponível em: <https://colostate.pressbooks.pub/clonalcryopreservation/chapter/an-overview-of-shoot-tip-cryopreservation/>. Acesso em: 13 set. 2025.

BOLKER, B. M. et al. Generalized linear mixed models: a practical guide for ecology and evolution. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 24, n. 3, p. 127-135, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tree.2008.10.008>

BROOKS, M. E. et al. glmmTMB balances speed and flexibility among packages for zero-inflated generalized linear mixed modeling. **The R Journal**, v. 9, n. 2, p. 378-400, 2017. Disponível em: <https://journal.r-project.org/archive/2017/RJ-2017-066>

CHANG, Y.; REED, B. M. Extended cold acclimation and recovery medium alteration improve regrowth of *Rubus* shoot tips following cryopreservation. **Cryo-Letters**, v. 20, n. 6, p. 371-376, 1999.

CHAROENSUB, R.; HIRAI, D.; SAKAI, A. Cryopreservation of in vitro-grown shoot tips of cassava by encapsulation-vitrification method. **Cryoletters**, v. 25, n. 1, p. 51-58, 2004.

COLARICCIO, A. et al. Ocorrência do *Cassava Common Mosaic Virus* (CsCMV) e *Cassava Vein Mosaic Virus* (CsVMV) em cultivares de mandioca em Santa Catarina, Brasil. **O Biológico**, v. 82, n. 1, p. 1-9, 2020. DOI: <https://doi.org/10.31368/1980-6221v82a10001>

DUMET, D. et al. Cryopreservation for the 'in perpetuity' conservation of yam and cassava genetic resources. **CryoLetters**, v. 34, n. 2, p. 107-118, 2013.

EMBRAPA AMAPÁ. **Notificação de nova doença - 'Vassoura de Bruxa' da mandioca causada por *Ceratobasidium theobromae* (*Rhizoctonia theobromae*) no Brasil**. Amapá: Embrapa, 2024. Nota Técnica n. 10729769. Disponível em: https://www.embrapa.br/documents/1354337/83055060/NT_PDF_21157.001205_2024_84+doen%C3%A7a+da+mandioca.pdf. Acesso em: 3 jul. 2025.

ESCOBAR, R. H. et al. Using a droplet-vitrification method to partially overcome the recalcitrance of cassava to cryostorage. **International Society for Horticultural Science (ISHS)**, Leuven, Bélgica. 2014. p. 227-232. DOI: <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2014.1039.29>

FAO. **Faostat- Crops and livestock products**. 2023. Disponível em: <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>. Acesso em 15 maio 2025.

GADO, N. G. Y. K. et al. Optimisation de l'acclimatation de vitroplants d'une accession de manioc (*Manihot esculenta* Crantz) de la République Centrafricaine par la méthode de culture ex vitro. **International Journal of Biological and Chemical Sciences**, v. 16, n. 3, p. 957-966, 2022. DOI: <https://doi.org/10.4314/ijbcs.v16i3.6>

GIL-ORDÓÑEZ, A. et al. Isolation, genome analysis and tissue localization of *Ceratobasidium theobromae*, a new encounter pathogen of cassava in Southeast Asia. **Scientific Reports**, v. 14, n. 1, p. 18139, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-024-69061-8>

GOWTHAMI, R.; MARTINEZ-MONTERO, M. E.; RAJASEKHARAN, P. E. Cryoconservation of antiallergic medicinal plants: techniques and applications. In: GANTAIT, S.; MAJUMDER, J.; SHARANGI, A. B. (ed.). **Biotechnology of medicinal plants with antiallergy properties**. Cingapura: Springer, 2024. p. 453-488. DOI: https://doi.org/10.1007/978-981-97-1467-4_21

GUERRA, P. A. et al. Comparison of shoot tip culture and cryotherapy for eradication of ampeloviruses associated with *Pineapple mealybug* wilt in wild varieties. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 56, p. 903-910, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11627-020-10100-0>

GUERRA, P. A. et al. Morphoanatomical aspects of the starting material for the improvement of pineapple cryopreservation by the droplet-vitrification technique. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 93, n. 1, p. e20190555, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1590/0001-3765202120190555>

HERNÁNDEZ-RAMÍREZ, F. et al. Advances in cryopreservation of vanilla (*Vanilla planifolia* Jacks.) shoot-tips: assessment of new biotechnological and cryogenic factors. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 56, p. 236-246, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11627-020-10069-w>

HOHENFELD, C. S. et al. Genome-wide association study and selection for field resistance to cassava root rot disease and productive traits. **PLoS One**, v. 17, n. 6, p. e0270020, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0270020>

IBGE. **Sistema IBGE de Recuperação Automática-SIDRA**. Rio de Janeiro, 2022. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/home/pimpfbr/brasil>. Acesso em: 7 jul. 2025.

JULIÃO, E. C. et al. Reduction of brown leaf spot and changes in the chlorophyll a content induced by fungicides in cassava plants. **European Journal of Plant Pathology**, v. 157, n. 2, p. 433-439, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10658-020-02001-0>

KACZMARCZYK, A. et al. Current Issues in Plant Cryopreservation. In: KATKOV, I. (Ed.). **Current Frontiers in Cryobiology**. InTech, 2012. p. 417-438. DOI: <http://dx.doi.org/10.5772/32860>

KHATUN, M.; ROY, P.; RAZZAK, M. A. Additive effect of coconut water with various hormones on in vitro regeneration of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). **Journal of Animal and Plant Sciences**, v. 28, n. 2, p. 589-596, 2018.

KIM, H. Optimizing the droplet-vitrification procedure by balancing the cryoprotection and cytotoxicity of alternative plant Vitrification solutions based on the nature of donor plant vigor. **Plants**, v. 12, n. 23, p. e4040, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/plants12234040>

KULAK, V. et al. In vitro technology in plant conservation: relevance to biocultural diversity. **Plants**, v. 11, n. 4, p. 503, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/plants11040503>

LAMBOLEZ, A. et al. Warm temperature promotes shoot regeneration in *Arabidopsis thaliana*. **Plant and Cell Physiology**, v. 63, n. 5, p. 618-634, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1093/pcp/pcac017>

LEGG, J. P.; ÁLVAREZ, E. Diseases affecting cassava. In: HERSHEY, C. (ed.). **Achieving sustainable cultivation of cassava: genetics, breeding, pests and diseases**. Burleigh Dodds, 2017. p. 1-32. DOI: 10.19103/AS.2016.0014.10. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/319866187_Diseases_affecting_cassava. Acesso em: 3 jul. 2025.

LEIVA, A. M. et al. *Ceratobasidium* sp. is associated with cassava witches' broom disease, a re-emerging threat to cassava cultivation in Southeast Asia. **Scientific Reports**, v. 13, n. 1, p. 22500, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-023-49735-5>

LIU, Z. et al. Taxonomy and phylogeny of *cercosporoid fungi* (Mycosphaerellaceae) from China 1. **Phytotaxa**, v. 278, n. 3, p. 212-224, 12 out. 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.11646/phytotaxa.278.3.2>

MCCALLUM, E. J. et al. Tackling agriculturally relevant diseases in the staple crop cassava (*Manihot esculenta*). **Current Opinion in Plant Biology**, v. 38, p. 50-58, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2017.04.008>

MONDAL, S. et al. Effect of coconut water and ascorbic acid on shoot regeneration in banana variety Dwarf Cavendish. **The Asian Journal of Horticulture**, v. 7, n. 2, p. 416-419, 2012.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>

MURGAS, L. D. S.; FRANCISCATTO, R. T.; SANTOS, A. G. O. Avaliação espermática pós-descongelamento em piraçanjuba (*Brycon orbignyanus*, Valenciennes, 1849). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, n. 6, p. 1810-1814, 2003.

NAGEL, M. et al. Plant cryopreservation: principles, applications, and challenges of banking plant diversity at ultralow temperatures. **Annual Review of Plant Biology**, v. 75, p. 797-824, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-070623-103551>

NDIAYE, A.; PANIS, B. Use of droplet vitrification for the conservation of a Senegalese cassava cultivar. **Acta Horticulturae**, v. 1421, p. 61-66, 2025. DOI: <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2025.1421.9>

OLIVEIRA, R. S. et al. Cryopreservation and low-temperature storage of seeds of *Tillandsia* species (Bromeliaceae) with ornamental potential. **3 Biotech**, v. 11, n. 4, p. 186, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13205-021-02730-x>

OLIVEIRA, S. A. S. et al. *Colletotrichum* species causing cassava (*Manihot esculenta* Crantz) anthracnose in different eco-zones within the Recôncavo Region of Bahia, Brazil. **Journal of Plant Diseases and Protection**, v. 127, n. 3, p. 411-416, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s41348-020-00327-9>

PANTA, A. et al. Development of a PVS2 droplet vitrification method for potato cryopreservation. **Cryo Letters**, v. 35, n. 3, p. 255-266, 2014.

PARTHIBHAN, S.; RAO, M. V.; SENTHIL KUMAR, T. In vitro regeneration from protocorms in *Dendrobium aqueum* Lindley - an imperiled orchid. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 13, n. 2, p. 227-233, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2015.07.001>

PAULET, F.; ENGELMANN, F.; GLASZMANN, J. C. Cryopreservation of apices of in vitro plantlets of sugarcane (*Saccharum* sp. hybrids) using encapsulation/dehydration. **Plant Cell Reports**, v. 12, n. 9, p. 525-529, 1993. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00236101>

PERÁN, R. et al. Cryopreservation, encapsulation and promotion of shoot production of embryonic axes of a recalcitrant species *Ekebergia capensis*, Sparrm. **Cryo Letters**, v. 27, n. 1, p. 5-16, 2006.

POPOVA, E. et al. Plant cryopreservation for biotechnology and breeding. In: AL-KHAYRI, J. M.; JAIN, S. M.; JOHNSON, D. T. (Ed.). **Advances in plant breeding strategies: breeding, biotechnology and molecular tools**. Cham: Springer, 2015. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-319-22521-0_3

POPOVA, E.; KULICHENKO, I.; KIM, H. H. Critical role of regrowth conditions in post-cryopreservation of in vitro plant germplasm. **Biology**, v. 12, n. 4, p. 542, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/biology12040542>

PRUDENTE, D. de O. et al. Behavior of lateral buds of *Hancornia speciosa* after cryopreservation by encapsulation-vitrification. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 39, n. 1, p. 87-93, 2017. DOI: <https://doi.org/10.4025/actascibiols.v39i1.31620>

R Core Team. **R**: A Language and environment for statistical computing. r foundation for statistical computing, vienna, Austria, 2024. Disponível em: <https://www.R-project.org/>. Acesso: 06 de jun. 2024

REN, R. et al. Changes of pollen viability of ornamental plants after long-term preservation in a cryopreservation pollen bank. **Cryobiology**, v. 89, p. 14-20, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2019.07.001>

RUAN, M. B. et al. Role of cassava CC-type glutaredoxin MeGRXC3 in regulating sensitivity to mannitol induced osmotic stress dependent on its nuclear activity. **BMC Plant Biology**, v. 22, p. 41, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12870-022-03433-y>

RUTA, C.; LAMBARDI, M.; OZUDOGRU, E. A. Biobanking of vegetable genetic resources by in vitro conservation and cryopreservation. **Biodiversity and Conservation**, v. 29, n. 13, p. 3495-3532, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10531-020-02051-0>

SAKAI, A.; ENGELMANN, F. Vitrification, encapsulation-vitrification and droplet-vitrification: a review. **CryoLetters**, v. 28, n. 3, p. 151-172, 2007.

SAKAI, A.; KOBAYASHI, S.; OIYAMA, I. Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification. **Plant Cell Reports**, v. 9, p. 30-33, 1990. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00232130>

SILVA, S. S. S. et al. Post-seminal development and cryopreservation of endemic or endangered bromeliads. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 93, n. 1, p. 1-14, e20191133, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1590/0001-3765202120191133>

SOUZA, A. da S. et al. **Micropropagação da mandioca mediante ápices caulinares e segmentos nodais**. Cruz das Almas, BA: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2008. 12 p. (Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical. Circular Técnica, 88)

SOUZA, F. V. D. et al. Droplet-vitrification and morphohistological studies of cryopreserved shoot tips of cultivated and wild pineapple genotypes. **Plant Cell Tiss Organ Cult**, v. 124, p. 351-360, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11240-015-0899-8>

SOUZA, L. D.; SILVA, A. F. (ed.). **Sistema de produção de mandioca no Semiárido**. 2. ed. Brasília, DF: Embrapa, 2020. (Embrapa Mandioca e Fruticultura. Sistema de Produção, 12). Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1131107/1/Sistema-de-Producao-de-Mandioca-no-Semiarido.pdf>. Acesso em: 7 jul. 2025.

THAMMASIRI, K.; SOAMKUL, L. Cryopreservation of *Vanda coerulea* Griff. ex Lindl. seeds by vitrification. **ScienceAsia**, v. 33, p. 223-227, 2007. DOI: <http://dx.doi.org/10.2306/scienceasia1513-1874.2007.33.223>

UCHENDU, E. E.; JOACHIM KELLER, E. R. Melatonin-loaded alginate beads improve cryopreservation of yam (*Dioscorea alata* and *D. cayenensis*). **Cryoletters**, v. 37, n. 2, p. 77-87, 2016.

WANG, M. R. et al. Cryobiotechnology of apple (*Malus* spp.): development, progress and future prospects. **Plant Cell Reports**, v. 37, n. 5, p. 689-709, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00299-018-2249-x>

WANG, M. R. et al. Advances in cryopreservation of in vitro-derived propagules: technologies and explant sources. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 144, n. 1, p. 7-20, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11240-020-01770-0>

YAMAMOTO, S. I. et al. Development of a cryopreservation procedure using aluminium cryo-plates. **Cryoletters**, v. 32, n. 3, p. 256-265, 2011.

ZÁMEČNÍK, J. et al. Comparison of cryopreservation methods of vegetatively propagated crops based on thermal analysis. In: **Current Frontiers in Cryopreservation**. InTech, 2012. p. 1–18. DOI: <http://dx.doi.org/10.5772/34454>

ZARGAR AZAD, M.; KAVIANI, B.; SEDAGHATHOOR, S. Cold storage and cryopreservation by encapsulation-dehydration of *Cephalanthera rubra* (L.) Rich., a threatened orchid species. **Acta Agrobotanica**, v. 77, n. e, p. 1-13, 2024. DOI: <https://doi.org/10.5586/aa/189312>

ZIMMERMAN, T. W. et al. A. Rooting and acclimatization of cassava (*Manihot esculenta*) *ex vitro*. In: International symposium on biotechnology of temperate fruit crops and tropical species, 2005, Lisboa. **Acta Horticulturae**, v. 738, p. 735–740, 2007. DOI: <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2007.738.97>

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A mandioca representa uma cultura estratégica para a segurança alimentar e o desenvolvimento socioeconômico de diversas regiões tropicais, destacando-se pelo elevado teor de amido, ampla adaptabilidade e versatilidade de uso em diferentes setores industriais. No entanto, a complexidade genética da espécie e as limitações dos métodos tradicionais de propagação exigem o desenvolvimento de técnicas biotecnológicas que viabilizem sua conservação, multiplicação e melhoramento genético de forma mais eficiente e segura.

Neste contexto, o presente estudo contribuiu significativamente para o avanço do cultivo *in vitro* da mandioca, abordando aspectos fundamentais para a consolidação de protocolos aplicáveis em larga escala. A avaliação do potencial morfogênico de genótipos suplementados com água de coco sob diferentes regimes de temperatura revelou a importância da interação entre fatores nutricionais, hormonais e ambientais para a otimização da resposta organogênica, especialmente no que se refere à eficiência da recuperação e à adaptação de protocolos para diferentes materiais genéticos.

A validação de um protocolo de introdução *in vitro* de ápices caulinares representa um passo importante para a expansão e qualificação do Banco de Germoplasma *in vitro* da Embrapa Mandioca e Fruticultura, contribuindo diretamente para a conservação da variabilidade genética da espécie e para a formação de coleções de trabalho voltadas ao melhoramento genético. Já os resultados obtidos com a criopreservação demonstram o potencial da técnica como ferramenta complementar para a conservação de longo prazo, assegurando a viabilidade e integridade dos materiais genéticos mesmo após o armazenamento em nitrogênio líquido.

Dessa forma, os três capítulos que compõem este trabalho se integram de maneira sinérgica, oferecendo soluções práticas e baseadas em evidências para os principais desafios enfrentados na micropropagação e conservação de mandioca. Os dados aqui gerados subsidiam a formulação de protocolos mais robustos, reprodutíveis e economicamente viáveis, com impacto direto na aceleração de programas de melhoramento, produção de mudas de qualidade e preservação do patrimônio genético da espécie. A continuidade desses estudos, com a validação em condições de campo e a aplicação em genótipos de interesse

agronômico, será essencial para consolidar os avanços obtidos e ampliar o uso dessas tecnologias na cadeia produtiva da mandioca.

APÊNDICE A

Quadro A.1. Modelos logísticos ajustados para os eventos dicotômicos avaliados durante a introdução *in vitro* de ápices caulinares de mandioca, com respectivos coeficientes, equações estimadas e interpretação dos odds ratios (IC95%). Os modelos foram obtidos a partir das estimativas apresentadas na Tabela 3 (pag. 101), segundo a forma geral $\text{logit}(p) = \beta_0 + \sum \beta_i X_i$, em que β_0 é o intercepto, β_i são os coeficientes logísticos das variáveis independentes X_i e p é a probabilidade do evento de interesse.

Evento (variável dependente)	Modelo logístico estimado	Interpretação (Odds ratio/IC95%)
Formação de calo (FC1) em função da altura da brotação (AltP1)	$\text{logit}(p_{\text{calo}}) = -0,8694 + 1,6489 \times \text{AltP1}$	Cada cm adicional em AltP1 aumenta 5,20 vezes a chance de formação de calo (IC95%: 3,45–8,14; $p < 0,001$).
Sobrevivência inicial (VL1) em função do número de ápices (NAP)	$\text{logit}(p_{\text{sobrevivencia1}}) = 2,4537 + 0,7915 \times \text{NAP3} + 0,3278 \times \text{NAP4}$ (ref=2 ápices)	Dois ápices = 92,1% sobrevivência; três ápices aumentam 2,21 vezes ($p = 0,099$); quatro aumentam 1,39 vezes ($p = 0,473$).
Uso do meio MS0,01 em função da altura no repique (AltP2)	$\text{logit}(p_{\text{MS0,01-altura}}) = -0,6495 + 0,2514 \times \text{AltP2}$	Cada cm adicional em AltP2 aumenta 1,29 vezes a chance de uso do MS0,01 (IC95%: 1,20–1,38; $p < 0,001$).
Uso do meio MS0,01 em função da validação pós-repicagem (VL2)	$\text{logit}(p_{\text{MS0,01-sobrevivencia2}}) = -0,6931 + 1,4027 \times \text{VL2}$	Explantos validados elevam 4,07 vezes a chance de uso do MS0,01 (IC95%: 1,90–9,26; $p < 0,001$).
Uso do meio MS0,01 em função do número de miniestacas após repicagem (NmE2)	$\text{logit}(p_{\text{MS0,01-miniastacas}}) = -0,9546 + 0,5342 \times \text{NmE2}$	Cada miniestaca adicional aumenta 1,71 vezes a chance de uso do MS0,01 (IC95%: 1,49–1,97; $p < 0,001$).

Figura A.1. Ranqueamento da recuperação pós-criopreservação de ápices caulinares de 20 acessos de mandioca submetidos ao método de vitrificação em crio-canaletas. As barras representam as probabilidades previstas de recuperação aos 30 dias e estão dispostas em ordem decrescente de desempenho. A escala de cores realça os acessos com maior e menor sucesso regenerativo.

