

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ

LEILA INES WIGGERS MAFESSONI

**ENRAIZAMENTO *IN VITRO* E ACLIMATAÇÃO DE MICROPLANTAS DE
MANDIOQUINHA-SALSA (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft)**

PATO BRANCO

2023

LEILA INES WIGGERS MAFESSONI

**ENRAIZAMENTO *IN VITRO* E ACLIMATAÇÃO DE MICROPLANTAS DE
MICROPLANTAS DE MANDIOQUINHA-SALSA (*Arracacia xanthorrhiza*
Bancroft)**

**In vitro rooting and acclimatization of mandioquinha-salsa microplants
(*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft)**

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do título de Mestre em Agronomia no Programa de Pós-Graduação em Ensino de Agronomia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).

Orientador(a): Dra. Taciane Finatto

Coorientador: Dr. Thiago de Oliveira Vargas

PATO BRANCO

2023



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)

Esta licença permite remixe, adaptação e criação a partir do trabalho, para fins não comerciais, desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es) e que licenciem as novas criações sob termos idênticos. Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.



Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Campus Pato Branco



LEILA INES WIGGERS

ENRAIZAMENTO IN VITRO E ACLIMATAÇÃO DE MICROPLANTAS DE MANDIOQUINHA-SALSA (ARRACACIA XANTHORRHIZA BRANCROFT)

Trabalho de pesquisa de mestrado apresentado como requisito para obtenção do título de Mestra Em Agronomia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR). Área de concentração: Produção Vegetal.

Data de aprovação: 29 de Maio de 2023

Dra. Taciane Finatto, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Dra. Luciana Luiza Pelegrini, Doutorado - Faculdade Campo Real (Campo Real)

Simone Neumann Wendt, - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Dra. Taina Soraia Muller, Doutorado - Universidade Federal do Sul da Bahia

Documento gerado pelo Sistema Acadêmico da UTFPR a partir dos dados da Ata de Defesa em 29/06/2023.



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)

Esta licença permite remixe, adaptação e criação a partir do trabalho, para fins não comerciais, desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es) e que licenciem as novas criações sob termos idênticos. Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.

Dedico este trabalho a minha família, em especial ao
meu filho e meu esposo.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, pela vida e pelas oportunidades que ela me deu.

Ao meu esposo Rafael, por ser paciente nos momentos de ausência. Por ser meu alicerce, minha base, meu companheiro de alegrias e adversidades. Mesmo quando minhas forças desapareciam, você sempre foi meu colo e meu fomento para seguir adiante.

Ao meu amado filho Rafael, minha alegria diária, minha vida resumida em outra vida. És minha alma, minha essência, minha existência.

À minha orientadora Taciane, pela orientação, por todos ensinamentos repassados. Em especial pela compreensão e paciência dedicada a mim. Sem dúvidas você é muito mais que uma orientadora, você é uma pessoa incrível.

À Universidade Tecnológica Federal do Paraná e ao Programa de Pós Graduação em Agronomia, pelos recursos, infraestrutura e oportunidades.

Aos amigos e aos colegas de laboratório, por toda ajuda concedida.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, pelo apoio financeiro e concessão de bolsa de estudos.

São nossas escolhas, mais do que as nossas
capacidades, que mostram quem realmente
somos.
(ROWLING, 2000).

RESUMO

MAFESSONI, Leila Ines Wiggers. **Enraizamento *in vitro* e aclimação de microplantas de mandioquinha-salsa (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft)**. 65 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Área de Concentração: Produção Vegetal), Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR). Pato Branco, 2023.

A mandioquinha-salsa é uma hortaliça tuberosa que apresenta alto valor nutritivo e comercial, sendo o Brasil o maior produtor mundial. A propagação dessa espécie é realizada de forma vegetativa, que em muitos casos, apresenta problemas relacionados à sanidade das mudas, por permitir a propagação de doenças. Uma das alternativas encontradas, é a produção de mudas por meio da cultura de tecidos. Para tanto é necessário o estudo de protocolos de micropropagação eficaz. O objetivo deste trabalho foi determinar um protocolo de enraizamento *in vitro* de mandioquinha-salsa (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft) cultivar BRS Rubia 41, visando estabelecimento da cultura *ex vitro*. Foram conduzidos quatro ensaios (ensaios 1 à 4) de enraizamento *in vitro* e um ensaio de aclimação (ensaio 5). No ensaio 1 foi avaliado o enraizamento *in vitro* em resposta a cinco concentrações de auxina AIB (0,0; 3,0; 6,0; 9,0; 12,0 mg L⁻¹) e dois meios de cultura (B5 completo e B5 50% de concentração). No ensaio 2 foi avaliado o enraizamento *in vitro* em resposta a duas concentrações de AIB (0,0 e 2,5 mg L⁻¹), dois meios de cultura (B5 completo e B5 50% de concentração) com e sem carvão ativado (1,0 g L⁻¹). No ensaio 3 foi avaliado o enraizamento *in vitro* em resposta a cinco concentrações de auxina AIB (0,0; 3,0; 6,0; 9,0; 12,0 mg L⁻¹) com e sem carvão ativado (1,0 g L⁻¹). No ensaio 4 foi avaliado enraizamento *in vitro* em resposta a diferentes combinações de AIB e BAP (0:0; 6:6; 12:0 mg L⁻¹ respectivamente). O ensaio 5 foi estudado a aclimação *ex vitro* em resposta a diferentes composições de substrato (substrato Plantmax® + casca de carbonizada e substrato Plantmax® + pó de fibra de coco). As variáveis estudadas nos ensaios *in vitro* (1, 2 e 3) foram: número de raízes (NR), comprimento da maior raiz (CR), presença de calo (PC). No ensaio *in vitro* 4, além dos caracteres acima foram avaliados número de brotos (NB), número de folhas (NF) e altura de plantas (AP). No ensaio 5 *ex vitro*, os caracteres avaliados foram: número de folhas verdes (NFV), comprimento de parte aérea (CPA), número de raízes (NR), comprimento da maior raiz (CR), número de brotos (NB), número de folhas senescentes (NFS) e porcentagem de sobrevivência (%SOB). Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado e comparados pelo teste de Tukey a 5%. Para formação de calo, utilizou-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. A redução de 50% da concentração de sais do meio de cultura B5 não favorece o enraizamento. Deste modo, de acordo com este estudo para a cultura da mandioquinha-salsa o melhor meio de cultura para o enraizamento *in vitro* foi o B5 completo. O carvão ativado não contribui para um melhor enraizamento. A combinação do meio de cultura B5 completo com balanço hormonal 12:0 mg L⁻¹ (AIB:BAP) propiciou maior número de raízes. Entretanto, o comprimento das raízes obteve o melhor resultado em meio de cultura B5 completo sem adição de regulador de crescimento (0:0 mg L⁻¹). Para aclimação o melhor resultado foi obtido com o substrato Plantmax® + pó de fibra de coco, que apresentou maior taxa de sobrevivência, bem como maior comprimento de parte aérea, número de raízes e comprimento de raiz.

Palavras-chave: mandioquinha-salsa; rizogênese, auxina, cultura *in vitro*; *ex vitro*.

ABSTRACT

Arracacia xanthorrhiza Bancroft is a tuberous vegetable that has a high nutritional and commercial value, with Brazil being the world's largest producer. The propagation of this species occurs vegetatively, which sometimes presents problems related to the health of the seedlings. One of the alternatives found is the production of seedlings through tissue culture. Therefore, it is necessary to study effective micropropagation protocols. The objective of this work was to determine an *in vitro* rooting protocol for parsnip (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft) cultivar BRS Rubia 41, aiming at establishing an *ex vitro* culture. For that, four *in vitro* rooting tests (tests 1 to 4) and one acclimatization test (test 5) were conducted. In test 1, *in vitro* rooting was evaluated in response to five concentrations of AIB auxin (0,0; 3,0; 6,0; 9,0; 12,0 mg L⁻¹) and two culture media (B5 complete and B5 50% of the concentration). In test 2, *in vitro* rooting was evaluated in response to two concentrations of AIB (0,0 and 2,5 mg L⁻¹) and two culture media (B5 complete and B5 50% of the concentration) with and without activated charcoal (1,0 g L⁻¹). In test 3, *in vitro* rooting was evaluated in response to five concentrations of AIB auxin (0,0; 3,0; 6,0; 9,0; 12,0 mg L⁻¹) with and without activated charcoal (1 g L⁻¹). In test 4, *in vitro* rooting was evaluated in response to different combinations of AIB and BAP (0:0; 6:6; 12:0 mg L⁻¹ respectively). Trial 5 studied was *ex vitro* acclimation in response to different substrate composition (substrate Plantmax® + rice husk; substrate Plantmax® + coconut fiber powder). The variables studied in the *in vitro* tests (1, 2 and 3) were: number of roots (NR), length of the largest root (CR), presence of callus (PC). In the *in vitro* test 4, in addition to the above characters, the number of shoots (NB), number of leaves (NF) and plant height (AP) were evaluated. In the 5 *ex vitro* test, the evaluated characters were: number of green leaves (NFV), shoot length (CPA), number of roots (NR), length of the largest root (CR), number of shoots (NB), number of senescent leaves (NFS) and percentage of survival (%SOB). The experiments were conducted in a completely randomized design and compared using Tukey's test at 5%. For callus formation, the Kruskal-Wallis non-parametric test was used. The 50% reduction in the concentration of salts in the B5 culture medium does not favor rooting. Thus, for the culture of parsnip, the best culture medium for *in vitro* rooting is whole B5. Activated charcoal does not contribute to better rooting. The combination of whole culture medium B5 and hormone balance 12:0 mg L⁻¹ provides a greater number of roots. However, for root length, the best result is the same culture medium, but without growth regulator (0:0 mg L⁻¹). For acclimatization, the substrate + coconut fiber was the best, where it presents the best performance both in terms of survival rate, as well as shoot length, number of roots and root length.

Keywords: arracacha; rhizogenesis; auxin; *in vitro* culture; *ex vitro*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 – Pré-brotação dos rebentos de mandiоquinha-salsa (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft) cultivar BRS Rubia 41..... 13
- Figura 2 –Desinfestação dos rebentos de mandiоquinha-salsa (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft) cultivar BRS Rubia 41 em etanol a 70%, hipoclorito de sódio 4% e Tween 20. 14
- Figura 3 – Introdução, propagação e multiplicação do material vegetal de mandiоquinha-salsa (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft) cultivar BRS Rubia 41. A) Extração de gema apical; B) Introdução da gema apical em meio de cultura B5 para multiplicação; C) Microplantas multiplicadas e repicadas; D) Microplantas aptas a indução da rizogênese *in vitro* 15
- Figura 4 – Aclimação de microplantas de mandiоquinha-salsa (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft) cultivar BRS Rubia 41 18
- Figura 5 - Presença de calo em mandiоquinha-salsa (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft) cultivar BRS Rubia 41 submetidas a diferentes tipos de tratamentos A) B5 com 0,0 mg L⁻¹ de AIB. B) B5 com 3,0 mg L⁻¹ de AIB. C) B5 com 6,0 mg L⁻¹ de AIB. D) B5 com 9,0 mg L⁻¹ de AIB. E) B5 com 12,0 mg L⁻¹ de AIB. F) ½ B5 com 0,0 mg L⁻¹ de AIB. G) ½ B5 com 3,0 mg L⁻¹ de AIB. H) ½ B5 com 6,0 mg L⁻¹ de AIB. I) ½ B5 com 9,0 mg L⁻¹ de AIB. J) ½ B5 com 12,0 mg L⁻¹ de AIB e 3,0 mg L⁻¹ de BAP em todos os tratamentos 22
- Figura 6 - Comprimento radicular de microplantas de mandiоquinha-salsa (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft) cultivar BRS Rubia 41 submetidas a diferentes tipos de tratamentos sem a presença de carvão ativado. A) meio B5 0,0 mg L⁻¹ de AIB; B) meio B5 com 2,5 mg L⁻¹ de AIB. C); meio ½ B5 0,0 mg L⁻¹ de AIB; D) meio ½ B5 com 2,5 mg L⁻¹ de AIB. 26
- Figura 7 - Comprimento radicular de microplantas de mandiоquinha-salsa (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft) cultivar BRS Rubia 41 submetidas a diferentes tipos de tratamentos com a presença de carvão ativado. A) meio B5 0,0 mg L⁻¹ de AIB; B) meio B5 com 2,5 mg L⁻¹ de AIB. C); meio ½ B5 0,0 mg L⁻¹ de AIB; D) meio ½ B5 com 2,5 mg L⁻¹ de AIB. 27
- Figura 8 - Concentrações de AIB em função do uso de carvão ativado (com e sem) no cultivo *in vitro* de mandiоquinha-salsa (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft) cultivar BRS Rubia 41; A) número de raízes, e B) comprimento de raízes. 30
- Figura 9 - Microplantas de mandiоquinha-salsa (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft) cultivar BRS Rubia 41 cultivadas em meio B5 submetidas a diferentes concentrações de AIB com e sem carvão ativado (CA). A) 0,0 mg L⁻¹ de AIB com carvão ativado; B) 3,0 mg L⁻¹ de AIB com carvão ativado; C) 6,0 mg L⁻¹ de AIB com carvão ativado; D) 9,0 mg L⁻¹ de AIB com carvão ativado; E) 12,0 mg L⁻¹ de AIB com carvão ativado; F) 0,0 mg L⁻¹ de AIB sem carvão ativado; G) 3,0 mg L⁻¹ de AIB sem carvão ativado; H) 6,0 mg L⁻¹ de AIB sem carvão ativado; I) 9,0 mg L⁻¹ de AIB sem carvão ativado; J) 12,0 mg L⁻¹ de AIB sem carvão ativado 32
- Figura 10 - Microplantas de mandiоquinha-salsa (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft) cultivar BRS Rubia 41 na fase de aclimação, submetidas a diferentes

substratos. A) substrato Plantmax® + casca de arroz carbonizada. B) substrato Plantmax® + pó de fibra de coco.....37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição básica do meio de cultura B5.....	15
Tabela 2 - Efeito do meio de cultura (B5 e ½ B5), doses de AIB (0,0; 3,0; 6,0; 9,0; 12,0 mg L ⁻¹) para as variáveis presença de calo (PC), número de raízes (NR) e comprimento de raízes (CR) no cultivo <i>in vitro</i> de mandiоquinha-salsa (<i>Arracacia xanthorrhiza</i> Bancroft) cultivar BRS Rubia 41	20
Tabela 3 - Resumo da análise de variância para as variáveis número de raízes (NR) e comprimento de raízes (CR) em função de duas doses de AIB (ácido indól butírico 0,0 e 2,5 mg L ⁻¹), com e sem adição de carvão ativado (1,0 mg L ⁻¹), utilizando dois meios de cultura (B5 e ½ B5) para cultivo <i>in vitro</i> de mandiоquinha-salsa (<i>Arracacia xanthorrhiza</i> Bancroft) cultivar BRS Rubia 41	24
Tabela 4 - Teste de comparação de médias para a variável número de raízes (NR) com adição (com) e não adição (sem) de carvão ativado, em função da combinação de meio de cultura (B5 e ½ B5) e dose de AIB (0,0 e 2,5 mg L ⁻¹) para cultivo <i>in vitro</i> de mandiоquinha-salsa (<i>Arracacia xanthorrhiza</i> Bancroft) cultivar BRS Rubia 41.....	24
Tabela 5 - Teste de comparação de médias para a variável comprimento de raízes (CR) com adição (com) e não adição (sem) de carvão ativado, em função da combinação de meio de cultura (B5 e ½ B5) em relação a dose de AIB (ácido indól butírico 0,0 e 2,5 mg L ⁻¹), para cultivo <i>in vitro</i> de mandiоquinha-salsa (<i>Arracacia xanthorrhiza</i> Bancroft) cultivar BRS Rubia 41	26
Tabela 6 - Resumo da análise de variância para as variáveis número de raízes (NR) e comprimento de raízes (CR) em função de doses de AIB (ácido indól butírico) e com e sem adição de carvão ativado, em meios de cultura para cultivo <i>in vitro</i> de mandiоquinha-salsa (<i>Arracacia xanthorrhiza</i> Bancroft) cultivar BRS Rubia 41	28
Tabela 7 – Porcentagem de presença de calo em relação a presença ou ausência de carvão ativado em função de diferentes doses de AIB no cultivo <i>in vitro</i> de mandiоquinha-salsa (<i>Arracacia xanthorrhiza</i> Bancroft) cultivar BRS Rubia 41.	31
Tabela 8 - Resumo da análise de variância para as variáveis número de raízes (NR), comprimento de raízes (CR), número de brotos (NB), número de folhas (FOL), comprimento de parte aérea (CPA) e taxa de sobrevivência (TXSO) em função de diferentes balanços hormonais AIB:BAP (0:0; 6:6; 12:0) no cultivo <i>in vitro</i> de mandiоquinha-salsa (<i>Arracacia xanthorrhiza</i> Bancroft) cultivar BRS Rubia 41.	33
Tabela 9 - Teste de comparação de médias para as variáveis número de raízes (NR), comprimento de raízes (CR), número de brotos (NB), número de folhas (FOL), comprimento de parte aérea (CPA) e taxa de sobrevivência (TXSO) em função de diferentes balanços hormonais AIB:BAP (0:0; 6:6; e 12:0) no cultivo <i>in vitro</i> de mandiоquinha-salsa (<i>Arracacia xanthorrhiza</i> Bancroft) cultivar BRS Rubia 41	34
Tabela 10 - Resumo da análise de variância para as variáveis número de folhas verdes (NFV), comprimento de parte aérea (CPA), número de raízes (NR), comprimento de raízes (CR), número de brotos (NB) e número de folhas	

senescentes (NFS) em função de diferentes balanços hormonais AIB:BAP (6:6 e 0:0) e substratos (substrato Plantmax® + casca de arroz carbonizada e substrato Plantmax® + pó de fibra de coco) no cultivo *ex vitro* de mandioquinha-salsa cultivar BRS Rubia 41.36

Tabela 11 - Teste de comparação de médias para as variáveis número de folhas verdes (NFV), comprimento de parte aérea (CPA), número de raízes (NR), comprimento de raízes (CR), número de brotos (NB) e número de folhas senescentes (NFS) em função de diferentes balanços hormonais AIB:BAP (6:6 e 0:0) e substratos (substrato Plantmax® + casca de arroz carbonizada e substrato Plantmax® + pó de fibra de coco) no cultivo *ex vitro* de mandioquinha-salsa (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft) cultivar BRS Rubia 4138

Tabela 12 – Teste de comparação de médias para a variável taxa de sobrevivência (TXSO) diferentes balanços hormonais AIB:BAP (0:0, 6:6 e 12:0) e substratos (substrato Plantmax® + casca de arroz carbonizada e substrato Plantmax® + pó de fibra de coco) no cultivo *ex vitro* de mandioquinha-salsa (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft) cultivar BRS Rubia 4139

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIA	3-indolil Acético
AIB	Ácido Indolbutírico
ANA	Ácido Naftaleno Acético
ANOVA	Análise de Variância
BAP	6-benzilaminopurina
Capes	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CFL	Câmara de Fluxo Laminar
Cm	Centímetros
CPA	Comprimento de Parte Aérea
CR	Comprimento de Raízes
Embrapa	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
ENR	Enraizamento
FOL	Número de Folhas
GL	Graus de Liberdade
H	Horas
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
Mm	Milímetros
NB	Número de Brotos
NFS	Número de Folhas Senescentes
NFV	Número de Folhas Verdes
NR	Número de Raízes
PC	Presença de Calo
QM	Quadrado Médio
SOB	Sobrevivência
T	Tonelada
UTFPR	Universidade Tecnológica Federal do Paraná

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
<	Menor
>	Maior
°C	Graus Celsius
G	Grama
g L ⁻¹	Grama por litro
L	Litro
Mg	Miligrama
mg L ⁻¹	Miligrama por litro
mL	Mililitro
mL	Mililitro
mm	Milímetro
pH	Potencial hidrogeniônico
ug L ⁻¹	Micrograma por litro
μL	Microlitro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 Objetivos	14
1.1.1 Objetivo geral	14
1.1.2 Objetivos específicos.....	14
2 REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1 Origem e caracterização botânica da mandioquinha-salsa	16
2.2 Importância econômica da mandioquinha-salsa	17
2.3 Propagação da mandioquinha-salsa: produção de mudas	18
2.4 Cultura de tecidos	19
3 MATERIAL E MÉTODOS	13
3.1 Preparo do material vegetal	13
3.2 Introdução, propagação e multiplicação do material vegetal <i>in vitro</i>	14
3.3 Condução experimental	16
3.3.1 Ensaio 1: Enraizamento <i>in vitro</i>	16
3.3.2 Ensaio 2: Enraizamento <i>in vitro</i>	16
3.3.3 Ensaio 3: Enraizamento <i>in vitro</i> e aclimação	16
3.3.4 Ensaio 4: Enraizamento <i>in vitro</i>	17
3.3.5 Ensaio 5: Aclimação	17
3.4 Avaliações	18
3.5 Análise de dados	19
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
4.1 Ensaio 1 – Enraizamento <i>in vitro</i>	20
4.2 Ensaio 2 – Enraizamento <i>in vitro</i>	23
4.3 Ensaio 3 – Enraizamento <i>in vitro</i> e aclimação	28
4.4 Ensaio 4 – Enraizamento <i>in vitro</i>	32
4.5 Ensaio 5 – Aclimação	35
5 CONCLUSÃO	41
REFERÊNCIAS	42

1 INTRODUÇÃO

A mandioquinha-salsa (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft) tem origem nos Andes, e apresenta alto valor nutritivo e comercial, sendo excelente fonte de carboidratos para dieta humana. Suas raízes tuberosas, são fonte de vitaminas, minerais e principalmente amido (CASTANHA *et al.*, 2018; LODOÑO-RESTREPO *et al.*, 2018). É uma cultura que vem ganhando espaço nas indústrias alimentícias (LEONEL *et al.*, 2016; LODOÑO-RESTREPO *et al.*, 2018; SILVA *et al.*, 2021), e recentemente, vem sendo estudada na fabricação de produtos como lâminas de plásticos (CHUIZA-ROJAS; RODRÍGUEZ-BASANTES; BRITO-MOÍNA, 2020) e biofilmes (PÉREZ, 2019), aumentando sua aplicação industrial, e elevando, assim, sua importância e necessidade de cultivo (CASTANHA *et al.*, 2018).

O Brasil é o maior produtor mundial do tubérculo, seguido pela Colômbia, Venezuela, Peru, Equador e Bolívia, (MADEIRA *et al.*, 2021). A produção brasileira é de 250 mil toneladas ano⁻¹, em aproximadamente 20 mil hectares cultivados (MADEIRA *et al.*, 2021). Isso resulta em uma receita anual de 2 bilhões de reais, gerando empregos para mais de cinco mil famílias (ALENCAR, 2018). As expectativas com a cultura são promissoras, pois cada vez mais áreas estão sendo destinadas ao seu cultivo (MACEDO, 2019), o que resulta em uma maior demanda pela produção de mudas com qualidade.

A propagação via sementes não é viável em escala comercial, uma vez que suas sementes possuem baixa taxa de germinação. Desta forma, a propagação é feita vegetativamente, através de mudas. A principal dificuldade deste tipo de propagação é devido a qualidade destas que geralmente apresentam problemas relacionados à fitossanidade. Mudas com baixa qualidade agrônômica, genética e fitossanidade, afetam o desenvolvimento e o rendimento potencial da lavoura (SOLANO *et al.*, 2022). Com isso, a busca por estratégias de desenvolvimento de mudas de mandioquinha-salsa livres de agentes patogênicos e de maior qualidade genética e fitossanitária tem sido alvo de estudos na cultura (MATOS *et al.*, 2015; VITAMVAS *et al.*, 2019; SOLANO *et al.*, 2022). Uma das alternativas encontradas, é a produção de mudas através da técnica de cultura de tecidos vegetais.

A cultura de tecidos vegetais, também conhecida como cultura *in vitro*, refere-se a uma técnica biotecnológica de cultivar células e tecidos vegetais, de forma asséptica sob condições físicas e químicas controladas (ALVES *et al.*, 2008). Esta

técnica permite rápida multiplicação do material vegetal, produzindo plantas saudáveis a partir de um único indivíduo em curto período (SOUZA; SOUZA, 1986). Diversos explantes podem ser utilizados para se iniciar a propagação *in vitro* de plantas, mas os ápices caulinares, gemas axilares e meristemas isolados são os explantes mais indicados (ARAÚJO; CARVALHO, 2005). A cultura de meristemas é a mais utilizada quando se busca a obtenção de plantas livres de agentes patogênicos (TORRES; CALDAS; BUSO, 1998).

Entretanto na cultura de tecidos, cada espécie vegetal possui um protocolo específico, visando o sucesso de sua propagação. Escolha do meio de cultura, reguladores de crescimento vegetal, bem como as concentrações dos reguladores e dos componentes do meio de cultura impactam diretamente no desenvolvimento do explante (ANDRADE, 2002). Alguns trabalhos apresentam resultados satisfatórios com o cultivo *in vitro* de mandioca-salsa, contudo, não há protocolos bem estabelecidos, principalmente na fase de enraizamento e aclimação (MADEIRA, 2004; CANDIDO, 2022), o que dificulta a produção em escala comercial de clones. Desta forma, estudos para estabelecer protocolos de enraizamento *in vitro* e aclimação desta cultura são necessários.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo geral

Determinar protocolo de enraizamento *in vitro* de mandioca-salsa visando o estabelecimento da cultura *ex vitro*.

1.1.2 Objetivos específicos

Verificar o efeito de diferentes concentrações da auxina AIB no enraizamento *in vitro* de mandioca-salsa;

Verificar se há diferenças nas proporções do meio de cultura básico B5 completo e 50% da concentração no enraizamento das plantas *in vitro* de mandioca-salsa;

Constatar a eficácia do carvão ativado no enraizamento de mandioca-salsa;

Identificar a combinação favorável de meio de cultura e reguladores de crescimento vegetal para o desenvolvimento e estabelecimento de plantas de mandioquinha-salsa *ex vitro*.

Identificar a melhor composição de substrato para a sobrevivência das plantas *ex vitro*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Origem e caracterização botânica da mandioquinha-salsa

A *Arracacia xanthorrhiza* Bancroft, é popularmente conhecida no Brasil como mandioquinha, mandioquinha-salsa, batata-salsa e/ou batata-baroa (GOMES *et al.*, 2010). Originária das terras altas dos Andes (Colômbia, Venezuela, Equador, Peru e Bolívia) (LEBLANC *et al.*, 2008), possui boa adaptação a regiões com elevada altitude, temperaturas médias anuais entre 15 e 18 °C. No Brasil, os primeiros registros da cultura foram em 1907, no estado do Rio de Janeiro (MADEIRA *et al.*, 2021).

A mandioquinha-salsa é uma planta dicotiledônea, da ordem Umbellales (ou Apiales), família Apiaceae (antiga Umbelliferae). Foi descrita botanicamente pela primeira vez em 1825, sendo considerada uma raiz comestível e uma das plantas mais antigas cultivadas na América do Sul (HERMANN, 1997). É uma planta perene, que raramente atinge a fase reprodutiva, pois a colheita é realizada ao final do estágio vegetativo, antes do florescimento (MADEIRA *et al.*, 2021).

A planta possui uma estrutura chamada de coroa, que consiste no conjunto da parte aérea. O caule é cilíndrico e rugoso, na parte superior saem ramificações curtas denominadas rebentos, filhotes, cormelos ou propágulos. Geralmente, entre 10 a 30, dos quais são emitidas as folhas com formato penatissecto. Na parte inferior da cepa, saem as raízes tuberosas, que constituem a parte comercializável. Podem ser alongadas, cilíndricas ou cônicas, com coloração variando de branco a amarelo-intenso ou púrpura-escuro, dependendo do clone (SANTOS; MADEIRA, 2008).

A flor é em forma de umbelas, que juntas compõem a umbela composta (inflorescência), formadas em diferentes épocas. Em condições adequadas (temperatura ou umidade relativa ideal), a cultura floresce e produz sementes viáveis (LOPES, 2009). Apesar de produzir sementes viáveis, estas apresentam baixa taxa de germinação e vigor, dificultando a sua produção em escala comercial, sendo assim, a propagação é realizada de forma vegetativa (SANTOS; MADEIRA, 2008; SOLANO *et al.*, 2022).

A Embrapa (Empresa brasileira de pesquisa agropecuária) possui três cultivares de mandioquinha-salsa lançadas, desenvolvidas através de melhoramento genético, que possuem registro no Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento – MAPA (FAYAD *et al.*, 2018). A Amarela de Senador Amaral, a BRS Catarina 64 e BRS Rubia 41. Segundo Carvalho, Madeira e Silva (2018) mais de 90% da área

plantada no Brasil é ocupada pela cultivar Amarela de Senador Amaral, por possuir alta produtividade e precocidade. Entretanto Madeira (2018), ressalta que tanto a BRS Rúbia 41 quanto a BRS Catarina 64 possuem produtividades de 60% a 80% maiores que a Amarela de Senador Amaral.

A Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (EPAGRI) possui as cultivares CS380 INCA e SCS381 COQUEIRAL, que apresentam grande potencial, podendo até substituir as cultivares tradicionais, pois entre outras características como adaptabilidade, apresentam maior potencial produtivo que as tradicionalmente cultivadas (EPAGRI, 2008; NUNES *et al.*, 2023).

Plantas da cultivar BRS Rubia 41 possuem arquitetura ereta, com um porte mediano entre 40 e 50 cm. Possui uma característica em seu pecíolo que permite sua distinção de outras cultivares, uma coloração vermelha violácea do pecíolo, sendo a região da base púrpura e na inserção dos folíolos verde. Suas raízes são cônicas cilíndricas com comprimento médio de 15 a 20 cm e sem muitas reentrâncias, apresenta coloração amarela (EMBRAPA, 2015).

A cultivar utilizada foi a BRS Rubia 41, é originada por meio de seleção de clones (EMBRAPA, 2015). Sua vantagem segundo estes é que possui um maior potencial produtivo, o que gera interesse por parte dos produtores. Sua propagação é realizada por meio de rebentos, comumente utilizados para a cultura.

2.2 Importância econômica da mandioquinha-salsa

A mandioquinha-salsa (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft), é uma importante fonte de vitaminas, principalmente pela composição de suas raízes que contém Vitamina A, vitaminas do complexo B (niacina, tiamina, riboflavina e piridoxina), e minerais como cálcio, fósforo, magnésio e ferro (ROCHA *et al.*, 2008; ALENCAR, 2018). Contudo, apesar de apresentar boas quantidades de vitaminas e minerais, ganha destaque pelas altas concentrações de amidos, chegando a cerca de 80% (ROCHA *et al.*, 2008; CASTANHA *et al.*, 2018; LODONO-RESTREPO *et al.*, 2018).

Característica que faz com que a mandioquinha-salsa venha ganhando cada vez mais espaço no mercado alimentício. O amido contido nas raízes pode ser fonte de carboidratos para dieta humana, consumido *in natura* ou servir para indústria alimentícia na produção de pães, biscoitos, chips etc. (LEONEL *et al.*, 2016; LODONO-RESTREPO *et al.*, 2018; SILVA *et al.*, 2021), e até mesmo ser utilizada para fabricação de outros produtos como lâminas de plásticos (CHUIZA-ROJAS;

RODRÍGUEZ-BASANTES; BRITO-MOÍNA, 2020) e biofilmes (PÉREZ, 2019), o que eleva sua importância econômica.

Vários países apresentam produção significativa do tubérculo incluindo Colômbia, Venezuela, Peru, Equador e Bolívia, sendo o Brasil o maior produtor mundial (EMBRAPA, 2021). O Brasil produz cerca de 250 mil toneladas ano⁻¹, em aproximadamente 20 mil hectares cultivados. Vários estados brasileiros produzem a mandioquinha-salsa, sendo que Minas Gerais é o maior produtor (68 mil t), seguido por Paraná (30 mil t) e Santa Catarina (16 mil t), entre outros. Contudo, a produção brasileira não supre a demanda pelo tubérculo, o que resulta em um mercado ainda crescente (EMBRAPA, 2021).

Segundo Macedo (2019), a cada ano, as áreas agrícolas com cultivo de mandioquinha-salsa crescem, e com isso o interesse dos produtores por novas tecnologias e sistemas de cultivos, além de boas práticas de cultivo e manejo, a fim de aumentar também a produtividade da área plantada. Uma das principais práticas de manejo desejáveis, é a produção de mudas de boa qualidade genética e fitossanitária, fator limitante da produtividade (SANTOS; MADEIRA, 2008; FAYAD *et al.*, 2018).

2.3 Propagação da mandioquinha-salsa: produção de mudas

A propagação sexuada, ou seja, por meio de sementes, não é viável em plantios comerciais, devido à baixa taxa de germinação destas sementes, além da desuniformidade que apresenta a população de plantas oriundas de sementes (MADEIRA *et al.*, 2021).

Portanto, a propagação da mandioquinha-salsa, é comumente realizada de forma vegetativa, a partir de mudas (SOLANO *et al.*, 2022). A produção de mudas para formação de novas lavouras comerciais é a fase mais importante do processo de produção de mandioquinha-salsa (SANTOS; MADEIRA, 2008; FAYAD *et al.*, 2018). As mudas são obtidas através de rebentos, que são produzidos na parte superior e lateral da coroa da planta-mãe. Nesta etapa, é importante conhecer a morfologia da planta, pois, na coroa encontram-se mudas (rebentos) em diferentes idades fisiológicas. Recomenda-se o uso de rebentos mais jovens, os quais resultam em plantas com maior vigor e melhor pegamento. Mesmo com a seleção dos rebentos

mais jovens, estes devem ser separados por idade fisiológica (tamanho), a fim de manter a uniformidade da lavoura (SANTOS; MADEIRA, 2008; FAYAD *et al.*, 2018).

Na propagação vegetativa, é comum ocorrer uma carga considerável de patógenos degenerativos, como bactérias, fungos, micoplasmas e principalmente, vírus (MADEIRA, 2004). Estes são transferidos da planta-mãe aos rebentos, gerando assim, mudas com baixa qualidade, afetando o desenvolvimento e o rendimento potencial da lavoura (SOLANO *et al.*, 2022).

Com isso, a busca por desenvolver mudas de mandioquinha-salsa livres de agentes patogênicos e de maior qualidade genética e fitossanitária tem sido alvo de estudos na cultura (MATOS *et al.*, 2015; VITAMVAS *et al.*, 2019; SOLANO *et al.*, 2022). Uma das alternativas encontradas, é a produção de mudas através da cultura de tecidos vegetais.

2.4 Cultura de tecidos vegetais

O termo cultura de tecidos, também conhecido como cultivo *in vitro*, refere-se a uma técnica biotecnológica de cultivar células vegetais, de forma asséptica sob condições físicas e químicas controladas. Permite o aperfeiçoamento das interações de fatores abióticos (nutricionais, luminosos, temperatura etc.) e de fatores bióticos (hormonais e genéticos) (ALVES *et al.*, 2008).

Esta técnica é fundamentada pela totipotência celular, a qual se refere à capacidade de uma célula vegetal possuir condições genéticas para se diferenciar e produzir um organismo completo idêntico à planta-mãe (TORRES; CALDAS; BUSO, 1998).

A cultura de tecidos é uma ferramenta que pode ser utilizada para diversas finalidades, como, auxiliar na base para a regeneração e obtenção de plantas geneticamente modificadas, conservação de espécies vegetais, obtenção de clones em escala comercial, além de produzir plantas livres de patógenos, principalmente vírus (EMBRAPA, 2006). Esta técnica vem sendo muito utilizada para propagação comercial de espécies vegetais, especialmente aquelas que apresentam problemas relacionados à fitossanidade de mudas.

A propagação *in vitro* pode ocorrer por organogênese e a embriogênese somática, podendo ser de forma direta ou indireta (CONCEIÇÃO; CARMO; LIMA-BRITO, 2021). Pela via indireta em ambos os processos, é necessária uma fase intermediária onde as células se desdiferenciam em uma massa celular de calos, a

partir da ação de reguladores vegetais específicos, auxinas e citocininas combinadas (NAMASIVAYAM, 2007). Assim o balanço hormonal entre auxinas e citocininas pode promover a formação de calo ou induzir a geração de brotos ou raízes (TAIZ et al., 2017).

No geral, os reguladores de crescimento, especialmente as auxinas e citocininas, desempenham um papel muito importante na micropropagação de plantas. As auxinas são geralmente utilizadas quando o propósito for o alongamento celular, a expansão dos tecidos e divisão celular (formação de calo), já as citocininas são utilizadas para estimular o crescimento e desenvolvimento de múltiplas brotações (PIERIK, 1990).

Diversas são as fontes de explantes, desde raiz, folha, cotilédone, caule, meristema, entre outros. Entretanto, a cultura meristemas é a mais utilizada quando se busca a obtenção de plantas livres de agentes patogênicos, são utilizados ápices caulinares (meristemas) aliados a técnicas de termoterapia, quimioterapia e eletroterapia (TORRES; CALDAS; BUSO, 1998). para propagação. Esta técnica permite rápida multiplicação do material vegetal, produzindo plantas saudáveis a partir de um único indivíduo em curto período de tempo, independentemente de local e estação do ano (SOUZA; SOUZA, 1986).

Na cultura de tecidos, cada espécie vegetal possui um protocolo específico, visando o sucesso de sua micropropagação. A escolha do meio de cultura, reguladores de crescimento vegetal, bem como as concentrações dos reguladores e dos componentes do meio de cultura impactam diretamente no desenvolvimento do explante (ANDRADE, 2002).

O carvão ativado é frequentemente utilizado na micropropagação vegetal, sua propriedade adsorvente pode modificar a composição do meio de cultura, por isso, em algumas circunstâncias, melhora ou regula o crescimento da planta *in vitro*. Dentre as vantagens com sua utilização estão: adsorção de compostos exsudados dos tecidos cultivados ou presentes no ágar; evitar o excesso de crescimento de calo; promover a formação de raízes, possivelmente devido à sua alta capacidade em reduzir a luz do meio de cultura (FIOR, 2007).

O meio de cultura B5 (GAMBORG; MILLER; OJIMA, 1968) apresenta quantidades menores de sais minerais quando comparado ao meio de cultura MS (CLASSIC MURASHIGE; SKOOG, 1962) o qual apresenta elevada concentração de sais minerais, sendo bastante utilizado na morfogênese, cultura de meristema e

regeneração das plantas. Para leguminosas o meio de cultura SH (SCHENK; HILDEBRANT, 1972) possui uma maior utilização. Para a propagação de espécies lenhosas o meio de cultura Anderson (1978, 1980) é o mais utilizado, apesar do meio de cultura WPM – Wood Plant Medium (MC COWN, 1981) ser amplamente utilizado. Quando o objetivo desejado é o crescimento de calos *in vitro* o meio de cultura White (1951) é mais aplicado (PINTO, 2021).

Alguns trabalhos de propagação *in vitro* de mandioquinha-salsa vêm sendo desenvolvidos: Matos *et al.* (2015) tentaram desenvolver protocolos para cultivo de mandioquinha-salsa *in vitro*, utilizando cinco cultivares oriundas da Venezuela, utilizando o meio de cultura B5 e MS associados ao regulador de crescimento ANA (Ácido Naftalenoacético). Os autores relataram que nenhum dos meios de cultura foi favorável ao crescimento de microplantas de mandioquinha-salsa quando utilizado gema apical como explante. Gonçalves (2019), avaliando o estabelecimento e desenvolvimento da cultura *in vitro*, encontrou resultados satisfatórios utilizando o meio de cultura B5 suplementado com BAP (6-Benzilaminopurina) e ANA e B5 sem reguladores de crescimento.

Das etapas da micropropagação vegetal, destaca-se de suma importância as o enraizamento e a aclimação. Ambas possuem efeito direto sobre a taxa de sobrevivência das microplantas no ambiente *ex vitro*. O processo de enraizamento de plantas propagadas *in vitro* é complexo, pois envolve fatores endógenos e exógenos. Cada espécie apresenta sua condição ótima de enraizamento, que pode ser promovida via reguladores de crescimento, carboidratos, carvão ativado, compostos fenólicos, além de condições ambientais ótimas (SOUZA; PEREIRA, 2007).

A aclimação, consiste em passar a plântula do ambiente *in vitro* para o ambiente *ex vitro*. Neste processo, a plântula precisa passar gradativamente, de um metabolismo heterotrófico para um autotrófico. Isso é realizado, em condições de umidade e luminosidade controladas (GONÇALVES *et al.*, 2019), sendo que as condições ideais variam de espécie para espécie.

Na fase de aclimação das plantas, alguns fatores necessitam de cuidados indispensáveis para a eficiência do processo. Dentre eles, estão o tipo de substrato, controle de temperatura, umidade, luz, bem como a nutrição da microplanta. Essa passagem crítica, deve-se basicamente aos fatores de estresse hídrico, fotossíntese, absorção de nutrientes e fitossanidade (LONE *et al.*, 2008; MORAES; CAVALCANTE; FARIA, 2002).

Apesar de alguns trabalhos apresentarem resultados satisfatórios com o cultivo *in vitro* de mandiquinha-salsa, não há protocolos bem estabelecidos, principalmente na fase de enraizamento e aclimação *ex vitro* (MADEIRA, 2004; CANDIDO, 2022), o que dificulta a produção em escala comercial de clones. Souza e Pereira (2007) apontam que ainda não se tem esclarecidos todos os mecanismos envolvidos no enraizamento *in vitro*, apesar de se saber que há muitos fatores relevantes como o genótipo, a juvenilidade, os níveis endógenos de auxina, compostos fenólicos e carboidratos. Desta forma, estudos para aprimorar o enraizamento *in vitro* são contribuições valiosas para viabilizar protocolos de micropropagação desta espécie.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos e casa de vegetação do Departamento Acadêmico de Ciências Agrárias, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, Paraná.

3.1 Material vegetal e preparo dos explantes

As plantas matrizes de mandioquinha salsa, da variedade BRS Rubia 41 oriundas da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Hortaliças (EMBRAPA) foram colocadas para pré-brotação em casa de vegetação. As etapas de pré-brotação seguiram com o isolamento dos rebentos, com posterior corte em bisel, deixando cerca de 5 cm de base. Após foi realizada, lavagem em água corrente por 10 minutos e desinfestação em água sanitária a 10% por 10 minutos. Após esta etapa, os rebentos foram alocados em substrato Plantmax® em casa de vegetação, até que emitissem os primórdios foliares (Figura 1).

Figura 1 – Pré-brotação dos rebentos de mandioquinha-salsa (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft) cultivar BRS Rubia 41.



Fonte: Autoria própria (2022)

Os rebentos brotados foram transportados para o laboratório de cultura de tecidos vegetais. Estes passaram por duas etapas de desinfestação (MADEIRA, 2004).

Etapa 1: os rebentos foram cortados com 3 cm de base e 3 cm de pecíolo, e posteriormente lavados em água corrente por 10 minutos. Após esse processo, focaram imersos em etanol a 70% por 3 minutos, seguido pela imersão em solução de hipoclorito de sódio a 4% + 3 gotas de Tween 20 durante 20 minutos e posterior tríplice lavagem em água ultrapura estéril. Após esse procedimento, foi realizada uma nova redução de rebentos, cortando-os a 1 cm de base e 5 mm de pecíolo (Figura 2).

Figura 2 –Desinfestação dos rebentos de mandiquinha-salsa (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft) cultivar BRS Rubia 41 em etanol a 70%, hipoclorito de sódio 4% e Tween 20.



Fonte: Autoria própria (2022)

Etapa 2: A segunda etapa de desinfestação foi realizada na câmara de fluxo laminar (CFL), com imersão dos rebentos em etanol a 70% por 1 minuto, e posterior imersão em solução de hipoclorito 2% + 3 gotas L⁻¹ de Tween 20 por 3 minutos, seguido de tríplice lavagem em água ultrapura estéril.

3.2 Introdução, propagação e multiplicação do material vegetal *in vitro*

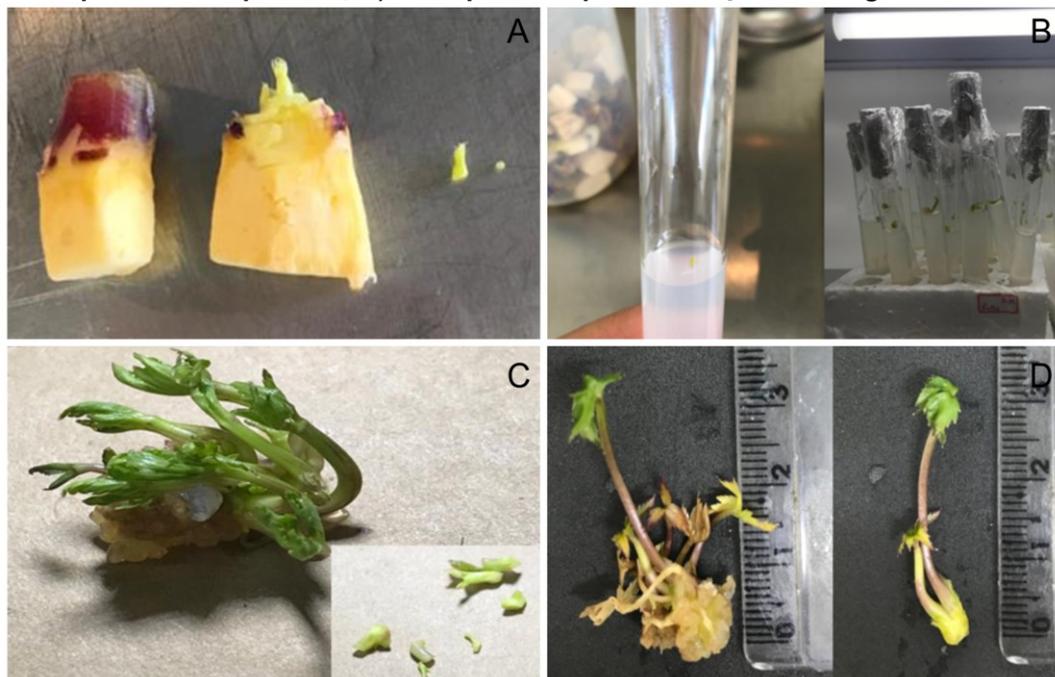
Após a etapa de desinfestação, com auxílio de pinça e bisturi esterilizados e estereomicroscópio foi realizada a extração do explante que consiste na gema apical com tamanho aproximado de 0,5 mm (Figura 3A). Posteriormente, para indução de brotações foi realizada a introdução dos explantes individualmente em tubos de ensaio contendo 15 mL de meio de cultura B5 (GAMBORG; MILLER; OJIMA, 1968) (Tabela 1) + 3,0 mg L⁻¹ de BAP + 1,0 mg L⁻¹ de ANA, + 7 g L⁻¹ de ágar, ajustado o pH para 5,8 e autoclavado por 21 minutos.

Tabela 1 – Composição básica do meio de cultura B5.

Componente	Concentração dos componentes	
	mg L ⁻¹	g L ⁻¹
Macronutrientes		
(NH ₄) ₂ SO ₄	134	0,134
KNO ₃	2500	2,5
CaCl ₂ . 2H ₂ O	150	0,15
MgSO ₄ . 7H ₂ O	250	0,25
NaH ₂ PO ₄ . H ₂ O	150	0,15
Micronutrientes		
MnSO ₄ . H ₂ O	10	0,01
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	2,0	0,002
H ₃ BO ₃	3,0	0,003
KI	0,75	0,00075
NaMoO ₄ . 2H ₂ O	0,25	0,00025
CuSo ₄ . 5H ₂ O	0,025	0,000025
CoCl. 6H ₂ O	0,025	0,000025
Fe-EDTA		
FeSO ₄ . 7H ₂ O	27,8	0,0278
Na ₂ EDTA	37,3	0,0373
Constituintes orgânicos		
Ácido nicotínico	1,0	0,001
Piridoxina-HCl	1,0	0,001
Tiamina-HCl	10	0,01
Mio-inositol	100	0,1
Sacarose	20000	30

Fonte: Gamborg; Miller e Ojima (1968)

Figura 3 – Introdução, propagação e multiplicação do material vegetal de mandioca-salsa (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft) cultivar BRS Rubia 41. A) Extração de gema apical; B) Introdução da gema apical em meio de cultura B5 para multiplicação; C) Microplantas multiplicadas e repicadas; D) Microplantas aptas a indução da rizogênese *in vitro*



Fonte: Autoria própria (2022)

Os tubos foram isolados com folhas de alumínio, seguido de filme plástico, acondicionados em sala de cultura de tecidos com temperatura $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, com fotoperíodo de 14h (Figura 3B). A cada 30 dias, foi realizada uma repicagem e troca de tubo de ensaio contendo o meio de cultura com mesma formulação para a multiplicação do material vegetal (Figura 3C).

Após 30 dias da terceira repicagem (120 dias de cultivo), as microplantas medindo acima de 2,5 cm foram submetidas a condução experimental, conforme ensaios descritos no item 3.3. No processo de transferência para os meios de cultura dos respectivos tratamentos, agora em frascos, realizou-se uma limpeza das plantas através da remoção dos tecidos necrosados bem como remoção dos calos presentes, permanecendo apenas folhas verdes e dois brotos por microplanta (Figura 3D).

3.3 Condução experimental

3.3.1 Ensaio 1: Enraizamento *in vitro*

O ensaio foi composto por dois meios de cultura (B5 completo e B5 50% da formulação), suplementados com cinco concentrações da auxina AIB (0,0; 3,0; 6,0; 9,0; 12,0 mg L⁻¹), com 3,0 mg L⁻¹ de citocinina BAP. Adicionado 7 g L⁻¹ de ágar, ajustado o pH para 5,8 e autoclavado por 20 minutos. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com dez repetições. Cada unidade experimental foi composta por um frasco com 4 microplantas.

3.3.2 Ensaio 2: Enraizamento *in vitro*

O ensaio foi composto por dois meios de cultura (B5 completo e B5 50% da formulação), e duas concentrações da auxina AIB (0,0 e 2,5 mg L⁻¹), com ou sem carvão ativado (1,0 g L⁻¹). Adicionado 7 g L⁻¹ de ágar, ajustado o pH para 5,8 e autoclavado por 20 minutos. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com dez repetições. Cada unidade experimental foi composta por um frasco com 3 microplantas.

3.3.3 Ensaio 3: Enraizamento *in vitro*

O ensaio foi composto pelo meio de cultura B5 completo, suplementado com cinco concentrações da auxina AIB (0,0; 3,0; 6,0; 9,0; 12,0 mg L⁻¹) com ou sem adição de carvão ativado (1,0 g L⁻¹). Adicionado 7 g L⁻¹ de ágar, ajustado o pH para 5,8 e

autoclavado por 20 minutos. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com dez repetições. Cada unidade experimental foi composta por um frasco com 3 microplantas.

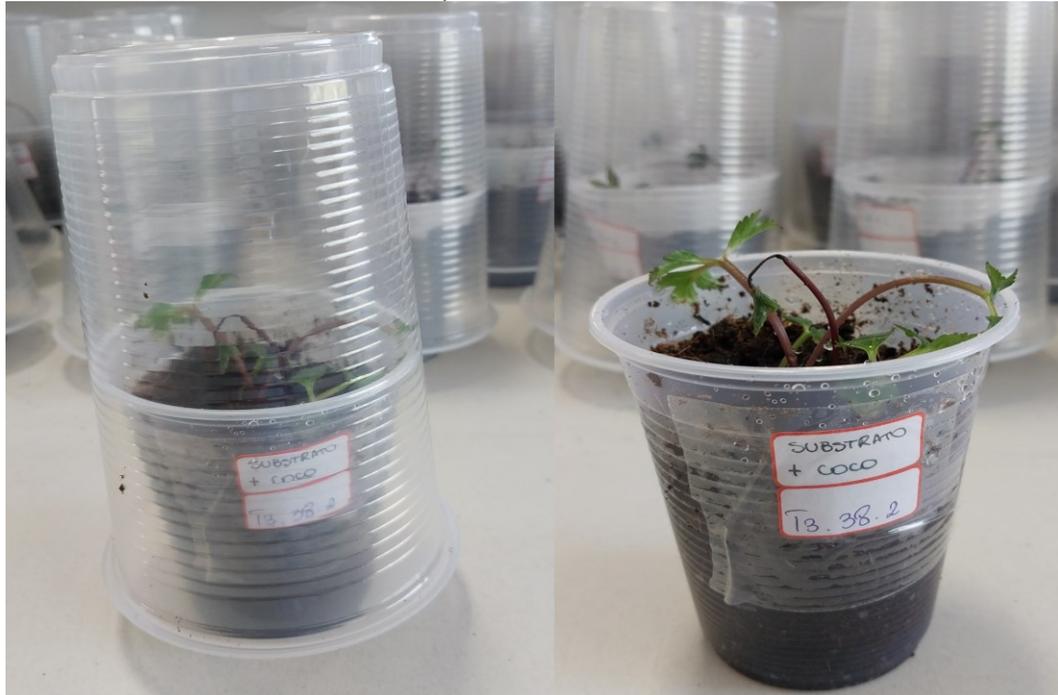
3.3.4 Ensaio 4: Enraizamento *in vitro*

O ensaio foi composto pelo meio de cultura B5 completo suplementado com três combinações diferentes de auxina AIB e citocinina BAP (0:0; 6:6; 12:0 mg L⁻¹, respectivamente). Adicionado 7 g L⁻¹ de ágar, ajustado o pH para 5,8 e autoclavado por 20 minutos. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com cinquenta repetições. Cada unidade experimental foi composta por um frasco com 2 microplantas.

3.3.5 Ensaio 5: Aclimação

Após 30 dias de cultivo no meio de cultura do ensaio 4, as microplantas que apresentaram 2 cm ou mais de comprimento foram submetidas ao processo de aclimação deste ensaio, sendo transplantadas para recipientes plásticos (volume 120 mL) contendo duas composições de substratos: substrato Plantmax® + pó de fibra de coco (1:1) e substrato Plantmax® + casca de arroz carbonizada (1:1). O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com cinquenta repetições. Cada unidade experimental foi composta por um copo plástico com 1 microplanta. A irrigação foi realizada uma vez ao dia com solução nutritiva composta pelos mesmos nutrientes e concentração do meio de cultura B5. Durante 15 dias, as microplantas ficaram cobertas pela sobreposição de um recipiente plástico transparente, sendo retirado gradativamente, com objetivo de manter uma maior umidade nos primeiros dias para as microplantas (Figura 4). Em todo o processo de aclimação as microplantas ficaram na sala de crescimento com temperatura 24°C.

Figura 4 – Aclimação de microplantas de mandioca-salsa (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft) cultivar BRS Rubia 41



Fonte: Autoria própria (2022)

3.4 Avaliações

As avaliações foram realizadas nos ensaios *in vitro* (1, 2 e 3) após 30 dias, onde foram avaliados os caracteres: número de raízes (NR), comprimento da maior raiz (CR), presença de calo (PC). Para o ensaio 3 foi avaliada também a porcentagem de sobrevivência *ex vitro*.

Para a variável calo, foram atribuídas notas: 0 para ausência de calo e 1 para presença de calo nas amostras avaliadas. Posteriormente, essas notas foram transformadas em percentual de formação de calo, e submetidas ao teste de comparação não paramétrico de Kruskal-Wallis.

No ensaio *in vitro* 4, além dos caracteres acima citados foram ainda avaliados número de brotos (NB), número de folhas (NF) e altura de microplantas (AP).

No ensaio 5 *ex vitro*, as microplantas foram avaliadas aos 30 dias após transplante, sendo avaliados os caracteres: número de folhas verdes (NFV), comprimento de parte aérea (CPA), número de raízes (NR), comprimento da maior raiz (CR), número de brotos (NB), número de folhas senescentes (NFS) e porcentagem de sobrevivência (%SOB).

3.5 Análise de dados

Os dados foram submetidos à análise de pressupostos de homogeneidade de variâncias (Bartlett, $p < 0,05$) e normalidade dos resíduos (Lilliefors, $p < 0,05$). Quando os dados não atendiam estes pressupostos, foram submetidos a transformação. Após a verificação do atendimento, os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA).

O ensaio 2, foi analisado seguindo esquema trifatorial $2 \times 2 \times 2$ sendo uso de carvão ativado (com e sem) x diferentes concentrações de AIB ($0,0$ e $2,5 \text{ mg L}^{-1}$) x meio de cultura (B5 e $\frac{1}{2}$ B5). Quando verificado efeito significativo da interação entre os fatores, as médias foram submetidas a teste de comparação de médias de Tukey, a 5% de probabilidade de erro.

No ensaio 1 e 3, as análises seguiram em esquema fatorial 2×5 : meio de cultura X dose de AIB e uso de carvão ativado x doses de AIB respectivamente. Quando verificado efeito significativo da interação entre os fatores, procedeu-se com análise de regressão para o fator quantitativo (doses de AIB) em função do uso de carvão ativado.

No ensaio 4, foram testados efeitos isolados de tratamentos (6:6 e 0:0) uma vez que os demais tratamentos não se obtiveram microplantas sobreviventes. Quando verificado significância na ANOVA, as médias foram submetidas a teste de comparação de médias de Tukey, a 5% de probabilidade de erro.

Todas as análises foram realizadas no software R v. 4.2.3 (R core development team, 2022), com auxílio dos pacotes ExpDes.pt (FERREIRA *et al.*, 2018) e nortest (GROSS, 2015).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Ensaio 1 – Enraizamento *in vitro*

No presente ensaio, não se obteve diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos para os caracteres avaliados, número de raízes (NR), comprimento de raízes (CR), presença de calo (PC) (Tabela 2).

Tabela 2 - Efeito do meio de cultura (B5 e ½ B5), doses de AIB (0,0; 3,0; 6,0; 9,0; 12,0 mg L⁻¹) para as variáveis presença de calo (PC), número de raízes (NR) e comprimento de raízes (CR) no cultivo *in vitro* de mandioquinha-salsa (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft) cultivar BRS Rubia

Meio de Cultura	AIB	BAP	PC	NR	CR
B5	0,0	3,0	1	0	0
B5	3,0	3,0	1	0	0
B5	6,0	3,0	1	0	0
B5	9,0	3,0	1	0	0
B5	12,0	3,0	1	0	0
1/2 B5	0,0	3,0	1	0	0
1/2 B5	3,0	3,0	1	0	0
1/2 B5	6,0	3,0	1	0	0
1/2 B5	9,0	3,0	1	0	0
1/2 B5	12,0	3,0	1	0	0

Fonte: Autoria própria (2022)

Em todos os tratamentos ocorreu a formação de calo (Figura 5). A presença de calo ocorre em resposta à interação da planta ao ambiente. Sabe-se, que cada genótipo responde de forma diferente ao meio de cultura, bem como aos reguladores de crescimento expostos.

As citocininas são necessárias para a divisão das células vegetais, agindo nos controles que governam a passagem da célula pela divisão celular, em geral, relacionam-se com quase todos os aspectos do desenvolvimento, promovendo nas plantas divisão, alongamento e diferenciação celular, retardando a senescência, promovendo a superação da dominância apical e induzindo a proliferação de gemas axilares (TAIZ; ZEIGER, 2009).

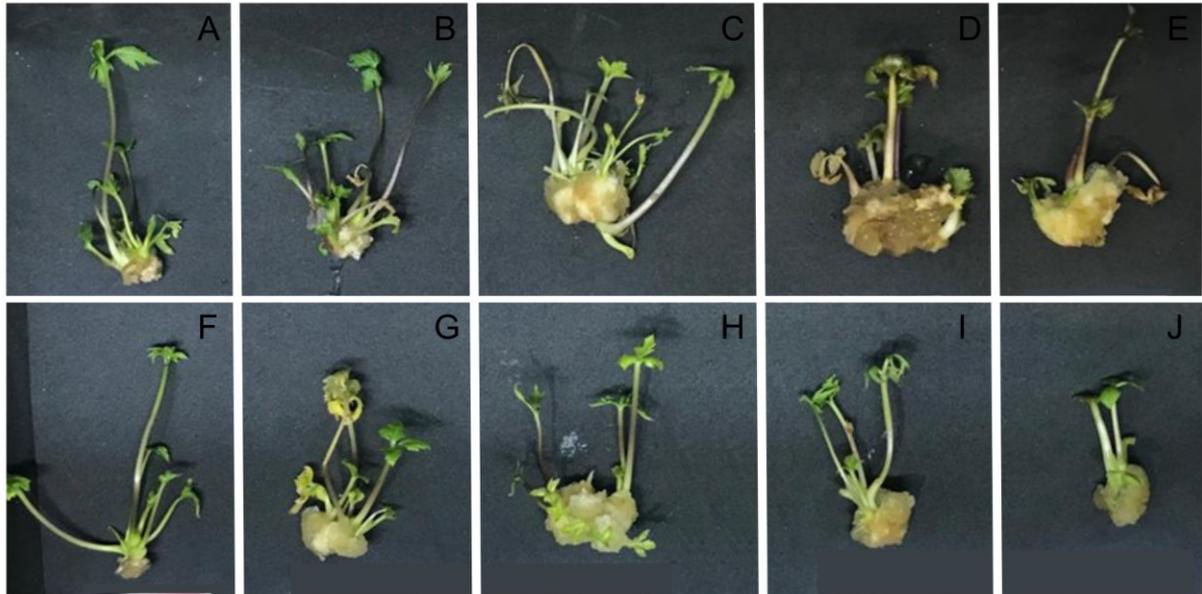
A adição de 3,0 mg L⁻¹ BAP, indiferentemente das concentrações de AIB ao meio de cultura, contribuiu para a formação de calo. Nesse caso a presença de calo ocasionado pelo balanço hormonal pode ter interferido na formação de raízes. Segundo Fior (2007), a rizogênese geralmente ocorre na presença de auxina ou com misturas contendo maior concentração de auxina em relação à citocinina, além disso as citocininas exógenas são geralmente inibitórias na formação de raízes.

Para a formação de calo de mandioquinha-salsa, não houve efeito em relação às doses de auxina, nem ao meio de cultura utilizados. É conhecido que muitos efeitos resultantes na formação de calo em determinados genótipos são causados por interações entre o genótipo e o ambiente de cultivo, bem como as induções sobrepostas (GEORGE; HALL; KLERK, 2008; HERNÁNDEZ, 2014). A formação de calo pode comprometer a rizogênese e o crescimento da parte aérea. Este fato, pode ocorrer também devido a altas concentrações de auxina do meio de cultura (RADMAN; FACHINELLO; PETERS, 2002; GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Os ferimentos causados no processo de limpeza, também podem estimular a formação de calo. As lesões causam a liberação de substâncias inibidoras de crescimento e também induz a produção natural de gás etileno que frequentemente propicia estímulos à formação de tecidos não-organizados (FIOR, 2007).

Além disso, na fase de propagação, os explantes passaram 120 dias em meio de cultura contendo BAP, acarretando um acúmulo de citocinina nas folhas. Logo, enquanto esse regulador de crescimento estiver presente nas folhas não será emitido sinalização para transferência de citocinina das raízes. D'arth *et al.* (2002) afirmaram que o uso prolongado de BAP na propagação *in vitro* pode inibir ou reduzir o comprimento do sistema radicular em até 80%, durante o processo de aclimação, quando comparado com microplantas advindas de cultivo *in vitro* na ausência de BAP, esse fator se refere sobretudo ao efeito residual desse regulador de crescimento.

Figura 5 - Presença de calo em mandioquinha-salsa (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft) cultivar BRS Rubia 41 submetidas a diferentes tipos de tratamentos A) B5 com 0,0 mg L⁻¹ de AIB. B) B5 com 3,0 mg L⁻¹ de AIB. C) B5 com 6,0 mg L⁻¹ de AIB. D) B5 com 9,0 mg L⁻¹ de AIB. E) B5 com 12,0 mg L⁻¹ de AIB. F) ½ B5 com 0,0 mg L⁻¹ de AIB. G) ½ B5 com 3,0 mg L⁻¹ de AIB. H) ½ B5 com 6,0 mg L⁻¹ de AIB. I) ½ B5 com 9,0 mg L⁻¹ de AIB. J) ½ B5 com 12,0 mg L⁻¹ de AIB e 3,0 mg L⁻¹ de BAP em todos os tratamentos



Fonte: Autoria própria (2022)

O correto balanço entre auxinas e citocininas pode influenciar diretamente no processo de formação e desenvolvimento de calo (CORPES; SANTOS, 2021). Nesse estudo se observou formação de calo em todos os tratamentos, nesse caso tais balanços hormonais resultaram na formação de calo em detrimento da formação de raízes. De acordo com Welander e Snygg (1987), a formação de calo está muito ligada às concentrações e tipo de auxina utilizados no meio de cultura. Madeira *et al.* (2005) destacam que a formação de calo nos explantes pode ser reduzida com o aumento da concentração de BAP no meio de cultura que é utilizado para estimular a formação de brotações. No entanto, se houver um grande aumento da concentração de citocinina em relação à auxina, pois à medida que a relação aumenta, apesar de estimular a formação de brotações, pode ocorrer inibição ou atraso no enraizamento (PAIVA; PAIVA, 2001).

Por mais comum que a calogênese seja, é válido ressaltar que na organogênese direta a mesma é indesejável, uma vez que pode afetar o crescimento e desenvolvimento de demais partes da planta (GÜNTHER, 2017). Erig, Schuch e Haves (2004) afirmam que a formação de calo na zona de enraizamento é indesejável, pois ela pode afetar a qualidade das raízes, sendo desfavorável à conexão vascular da planta com as raízes.

Neste estudo, em nenhum dos tratamentos foram observadas presença de raízes, logo não foi possível avaliar o número e tamanho das mesmas. A formação de calo é um dos principais problemas durante a elaboração de protocolos de micropropagação, principalmente o enraizamento, pois essa massa celular indiferenciada compromete a protrusão de raízes, uma vez que impede a absorção de nutrientes pela microplanta (RADMANN; FACHINELLO; PETERS, 2002). Além do problema exposto, estas estruturas podem interferir na funcionalidade do sistema radicular, comprometendo principalmente o processo de aclimatação das plantas (SOUZA; PEREIRA, 2007).

Os resultados deste ensaio mostram de modo geral, que a adição de BAP combinado às diferentes doses de AIB resultou no desenvolvimento de calos *in vitro* em mandioquinha-salsa, o que resultou no não enraizamento das microplantas.

Os mesmos autores ressaltam que para formação radicular o explante necessita de auxina nas fases de indução e iniciação, mas na fase de alongação, as raízes podem sofrer inibição na presença de determinadas dosagens de auxina. Rossato (2015) observou a formação de calos em *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg para todos os tratamentos utilizados com a presença de auxina nas concentrações de 1,0; 2,0; 4,0 mg L⁻¹.

Para a espécie *Psidium guajava* L., foi obtido taxa de 78% de indução de raízes sem a presença de reguladores de crescimento. Ainda nesse estudo, todas as concentrações de auxinas testadas induziram a formação de calo e não de raízes (RAI; JAISWAL; JAISWAL, 2009). Assim, sugere-se novos estudos sem a presença de citocinina.

4.2 Ensaio 2 – Enraizamento *in vitro*

A análise de variância apresentou efeitos significativos ($p < 0,05$) para a interação tripla: uso de carvão ativado (com e sem) x diferentes concentrações de AIB (0 e 2,5 mg L⁻¹) x meio de cultura (B5 e ½ B5) apenas para variável número de raízes (NR). Interações duplas significativas ($p < 0,05$), entre meio de cultura x dose de AIB e entre uso de carvão ativado x meio de cultura foram observadas para a variável comprimento de raiz (CR) (Tabela 3).

Tabela 3 - Resumo da análise de variância para as variáveis número de raízes (NR) e comprimento de raízes (CR) em função de duas doses de AIB (ácido indól butírico 0,0 e 2,5 mg L⁻¹), com e sem adição de carvão ativado (1,0 mg L⁻¹), utilizando dois meios de cultura (B5 e ½ B5) para cultivo *in vitro* de mandioca-salsa (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft) cultivar BRS Rubia 41

Fator de variação	Graus de liberdade	NR	CR ¹
Carvão	1	170.29 *	21.50 *
Meio	1	43.71*	11.03 *
Dose	1	17.26 *	3.37 *
Carvão x Meio	1	5.73 ns	1.26 *
Carvão x Dose	1	0.11 ns	0.20 ns
Meio x Dose	1	0.00001 ns	0.94 *
Carvão x Meio x Dose	1	8.48 *	0.06 ns
Resíduo	24	36.89	3.88
Coeficiente de variação		29.28	19.46

Legenda: (*) significativo a 5% de probabilidade de erro pelo teste F. ns: não significativo. ¹ Dados transformados por raiz quadrada. Fonte: Autoria própria (2022)

Para a variável número de raízes, todas as combinações entre meios de cultura e doses de AIB, apresentaram um maior número de raízes na ausência de carvão ativado (Tabela 4). O carvão ativado é adicionado ao meio de cultura com objetivo de promover o crescimento e enraizamento *in vitro*, a concentração é variável dependendo da espécie e do tecido utilizado. Druart e Wulf (1993) apontam que o carvão ativado adsorve compostos tóxicos, que são produzidos pela autoclavagem da sacarose, assim como impurezas do ágar e etileno produzido pela cultura.

Tabela 4 - Teste de comparação de médias para a variável número de raízes (NR) com adição (com) e não adição (sem) de carvão ativado, em função da combinação de meio de cultura (B5 e ½ B5) e dose de AIB (0,0 e 2,5 mg L⁻¹) para cultivo *in vitro* de mandioca-salsa (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft) cultivar BRS Rubia 41

Carvão/Meio x Dose	B5 0	B5 2.5	½ B5 0	½ B5 2.5
Sem	8.41 a	7.85 a	6.25 a	3.64 a
Com	3.87 b	1.48 b	1.34 b	1.02 b

Legenda: ¹médias seguidas por letras diferentes na coluna diferem estatisticamente entre si, a 5% de probabilidade de erro pelo teste de Tukey. Fonte: Autoria própria (2022)

O uso de carvão ativado no meio de cultura é uma prática comum pois, seu uso promove uma liberação controlada de nutrientes e compostos potencialmente tóxicos ao material que se pretende introduzir nesse tipo de cultivo (CHAPLA *et al.*,

2009; PACEK-BIENIEK; DYDUCH-SIEMIŃSKA; RUDAŚ., 2010). Entretanto essa capacidade de adsorção, pode reter tanto substâncias inibitórias de crescimento, quanto vitaminas, citocininas e auxinas, substâncias promotoras do crescimento e enraizamento (GUSON; MORAES; RONCONI, 2012).

A concentração de carvão ativado utilizada neste estudo ($1,0 \text{ g L}^{-1}$), pode ter sido muito elevada, pois além de absorver substâncias tóxicas, os nutrientes do meio de cultura podem ter sido adsorvidos. Dessa maneira, indiferentemente da concentração de AIB inserida nos diferentes tratamentos, o fitorregulador foi adsorvido pela presença de carvão ativado, o que ocasionou uma indisponibilidade dessa auxina para as microplantas de mandioquinha-salsa, retardando o desenvolvimento de raízes. Além disso, demais componentes do meio de cultura macronutrientes, micronutrientes, bem como vitaminas e minerais ficaram adsorvidos, resultando na baixa eficiência do enraizamento (VILLA *et al.*, 2008).

Além disso, os autores Arditti e Ernest (1993), apontam que o favorecimento na utilização do carvão ativado no enraizamento, se dá pela redução de intensidade luminosa na região onde as raízes são formadas, porém elevadas concentrações podem atrapalhar, ou impedir, o enraizamento.

Para a variável comprimento de raiz, independente do meio de cultura (B5 e $\frac{1}{2}$ B5), a não adição de carvão ativado proporcionou um maior comprimento de raízes (Tabela 5) (Figuras 6 e 7). Esse resultado aponta que a redução de intensidade luminosa pela utilização do carvão ativado não beneficiou o crescimento das raízes. Da mesma forma que o carvão ativado inibiu o desenvolvimento de raízes ele reduziu o crescimento. Conforme apontado por Villa *et al.* (2008) e Guson, Moraes e Ronconi (2012), esse resultado confirma a ação de adsorção dos nutrientes, bem como fitorreguladores do meio de cultura

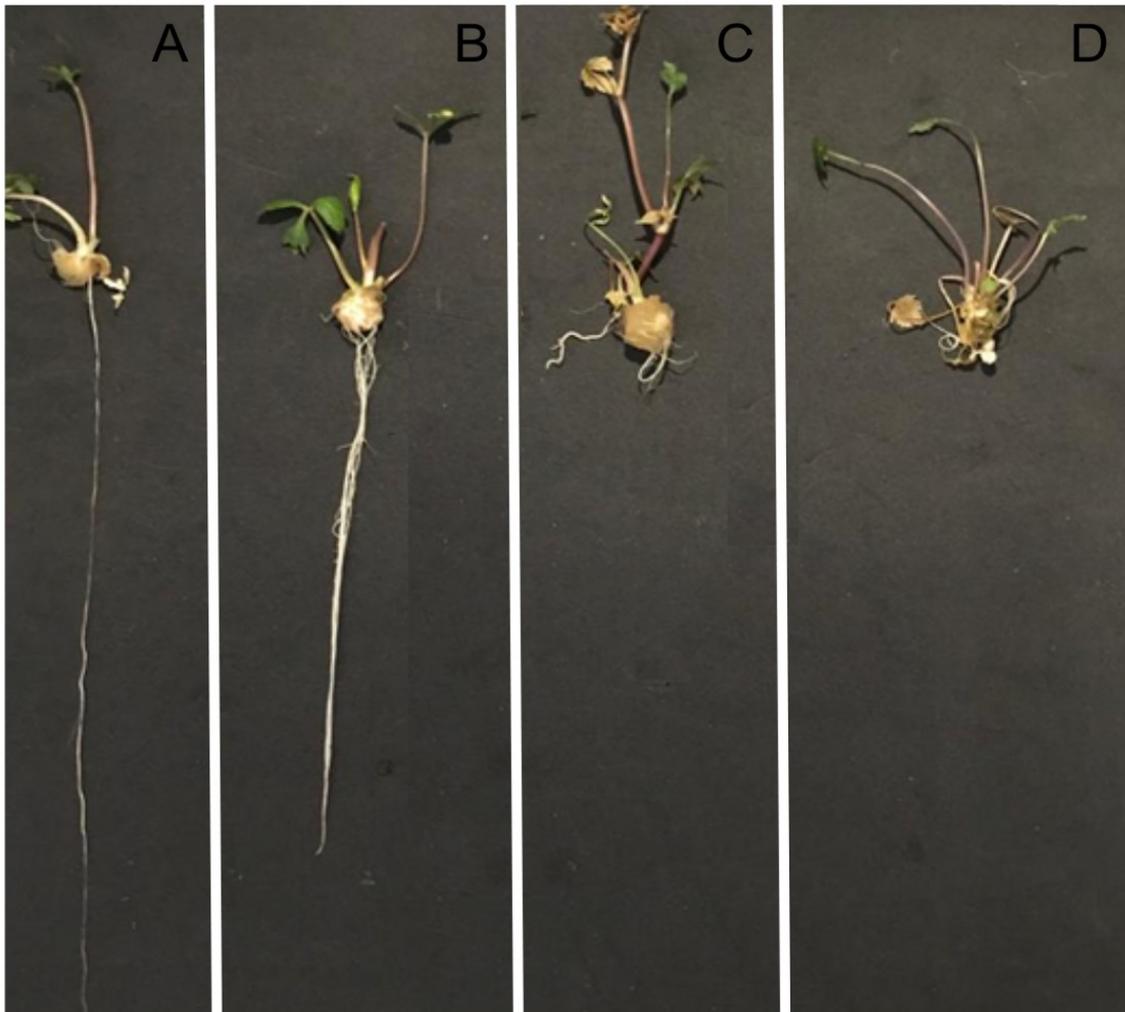
Tabela 5 - Teste de comparação de médias para a variável comprimento de raízes (CR) com adição (com) e não adição (sem) de carvão ativado, em função da combinação de meio de cultura (B5 e 1/2 B5) em relação a dose de AIB (ácido indól butírico 0,0 e 2,5 mg L⁻¹), para cultivo *in vitro* de mandiоquinha-salsa (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft) cultivar BRS Rubia 41

Carvão/Meio	B5	1/2 B5
Sem	14.03 ¹ aA	4.60 aB
Com	2.94 bA	0.83 bB
Meio/Dose		
0	11.33 ¹ aA	3.19 aB
2.5	5.63 bA	2.23 aB

Legenda: ¹médias seguidas por letras minúsculas na coluna e maiúscula na linha diferentes, diferem estatisticamente entre si, a 5% de probabilidade de erro pelo teste de Tukey.

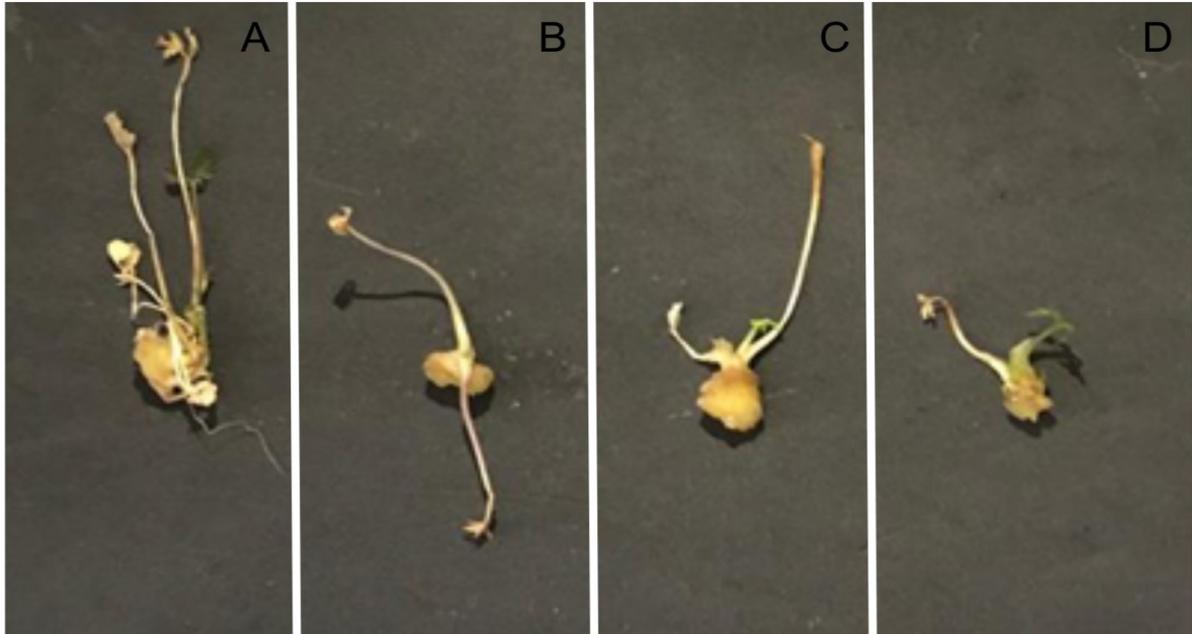
Fonte: Autoria Própria (2022)

Figura 6 - Comprimento radicular de microplantas de mandiоquinha-salsa (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft) cultivar BRS Rubia 41 submetidas a diferentes tipos de tratamentos sem a presença de carvão ativado. A) meio B5 0,0 mg L⁻¹ de AIB; B) meio B5 com 2,5 mg L⁻¹ de AIB. C); meio 1/2 B5 0,0 mg L⁻¹ de AIB; D) meio 1/2 B5 com 2,5 mg L⁻¹ de AIB.



Fonte: Autoria própria (2022)

Figura 7 - Comprimento radicular de microplantas de mandioquinha-salsa (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft) cultivar BRS Rubia 41 submetidas a diferentes tipos de tratamentos com a presença de carvão ativado. A) meio B5 0,0 mg L⁻¹ de AIB; B) meio B5 com 2,5 mg L⁻¹ de AIB. C); meio ½ B5 0,0 mg L⁻¹ de AIB; D) meio ½ B5 com 2,5 mg L⁻¹ de AIB.



Fonte: A autoria própria (2022)

Quanto ao meio de cultivo, independente do uso de carvão ativado, o meio B5 completo obteve o maior comprimento de raízes, comparativamente ao meio B5 50% da concentração (½ B5). Durante o enraizamento, a fotossíntese realizada por explantes é relativamente baixa e como a formação de raízes é um processo que requer energia, o fornecimento de carboidratos é fundamental. Além de ter a função de suprir a energia para o enraizamento, os carboidratos atuam na manutenção do potencial osmótico do meio de cultivo (ASSIS; TEIXEIRA, 1998). Entretanto, para muitas espécies, a redução dos nutrientes bem como, o uso de meios menos concentrados tem permitido melhores resultados no enraizamento de microplantas *in vitro* (OLIVEIRA, 2016; SOUZA; PERREIRA, 2007).

Neste estudo, a redução em 50% (½ B5) de macronutrientes, micronutrientes, vitaminas, aminoácidos e carboidratos não promoveu um aumento no número de raízes como esperado pela rustificação de microplantas. Assim, compreende-se que essa redução de nutrientes não foi capaz de suprir as necessidades metabólicas básicas das microplantas, pois esses compostos exógenos atuam como fonte de energia e nutrientes às microplantas, influenciando diretamente na sua fisiologia, diferenciação e crescimento dos tecidos, indução e diferenciação de órgãos (CALVETE; KÄMPF; SUZIN, 2002).

Assim as microplantas de mandioquinha-salsa não desfrutaram de energia suficiente para promoção e crescimento de novos tecidos em específico para o crescimento de raízes. O meio de cultura B5 possui um menor teor de sais, comparado ao meio de cultura MS por exemplo, e sua redução de sais e fonte de carbono torna-se um fator limitante à rizogênese. Silveira *et al.* (2013) avaliando as respostas morfofisiológicas das plantas micropropagadas de caroá (*Neoglaziovia variegata* (Arruda) Mez) observaram uma menor taxa de enraizamento quando utilizado meio de cultura com menor concentração de sais bem como carboidratos.

Todas as microplantas de mandioquinha-salsa, independente do tratamento aplicado, apresentaram a formação de calo (Figura 7). Entretanto, tal condição diferentemente do primeiro ensaio não atuou como fator limitante para a formação e desenvolvimento de raízes. Este experimento demonstra que neste estágio a adição de BAP é desnecessária na indução do enraizamento.

4.3 Ensaio 3 – Enraizamento *in vitro*

A análise de variância (ANOVA), apresentou efeitos significativos ($p < 0,05$), para a interação entre doses de AIB (0,0; 3,0; 6,0; 9,0; 12,0 mg L⁻¹) x uso de carvão ativado, para todos os caracteres avaliados (Tabela 6).

Tabela 6 - Resumo da análise de variância para as variáveis número de raízes (NR) e comprimento de raízes (CR) em função de doses de AIB (ácido indól butírico) e com e sem adição de carvão ativado, em meios de cultura para cultivo *in vitro* de mandioquinha-salsa (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft) cultivar BRS Rubia 41

Fator de variação	Graus de liberdade	Quadrados médios	
		NR	CR
Dose	1	5,67*	43,94*
Carvão	4	4,66*	10,60*
Dose*Carvão	4	3,87*	2,86*
Resíduo	60	2,43	1,10
Coeficiente de variação (%)	-	28,06	27,11

Legenda: (*) significativo a 5% de probabilidade de erro pelo teste F. Fonte: Autoria própria (2022)

O primórdio radicular é resultado da ativação gênica resultante do AIA endógeno da planta. A ação das auxinas ocorre, inicialmente, em nível celular nos meristemas primário e secundário, estimulando a divisão celular e o subsequente alongamento das células, sendo que essa ação inicial das auxinas culmina com a formação das raízes (FORD *et al.*, 2001).

As auxinas sintéticas, favorecem a conjugação entre o AIA endógeno e aminoácidos que promovem a síntese de proteínas específicas necessárias para a formação de raízes iniciais (GASPAR; HOFINGER, 1988; ONO; RODRIGUES, 1996; ASSIS; TEIXEIRA, 1998; ALOUFA, 2003). Em geral, após aplicação da auxina sintética, ocorre um aumento imediato no nível endógeno de auxina natural e conseqüentemente há o início da formação de raízes primordiais (GASPAR; HOFINGER, 1988).

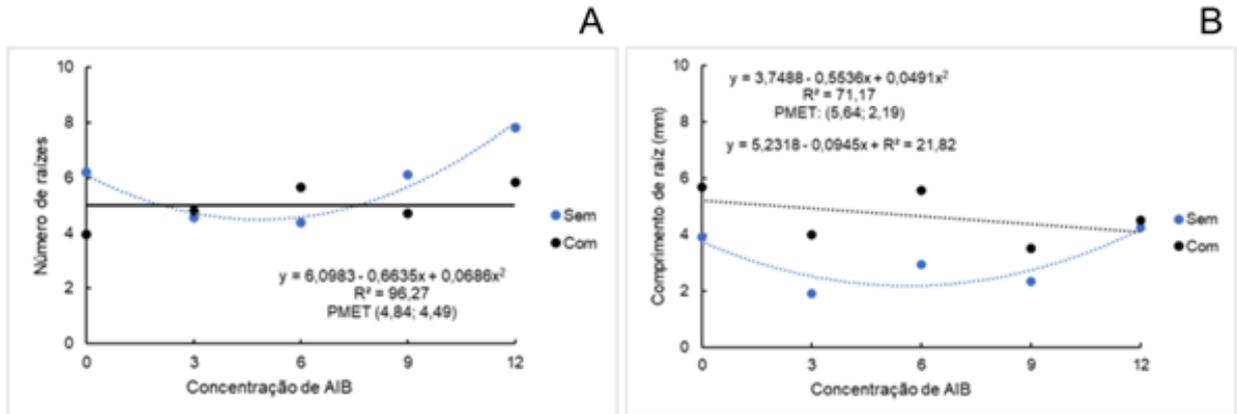
O AIB é uma das auxinas mais utilizadas como promotor da rizogênese *in vitro*. Normalmente, o número de raízes formadas aumenta com maiores concentrações desse fitorregulador, até o momento que sua concentração fica excessivamente elevada, ocorrendo a inibição da formação de raízes e conseqüentemente a formação de calo (ROGALSKI *et al.*, 2003). De acordo com Grattapaglia e Machado (1998) quando se utiliza uma concentração de auxina excessiva tem-se um comprometimento da rizogênese causado pela fitotoxidez. Entretanto a indisponibilidade desse fitoregulador compromete a rizogênese, pois segundo Campana *et al.* (1994) as auxinas são responsáveis pela indução dos primórdios radiculares.

O uso de carvão ativado, não alterou o número de raízes de microplantas de mandioquinha-salsa, independente da concentração de AIB (Figura 9A). Ao mesmo tempo em que esse composto adsorve compostos tóxicos ao crescimento vegetal ele também adsorve nutrientes fundamentais para o crescimento, fazendo com que a liberação desses seja mais lenta, ou até mesmo insatisfatória (GUSON; MORAES; RONCONI, 2012; VILLA; PASQUAL; SILVA, 2014). Resultados semelhantes foram encontrados por Schwalbert *et al.* (2015), onde os autores observaram efeito inibitório no número de raízes de *Desmodium incanum* (Sw.) DC. em presença de carvão ativado ao meio nutritivo.

Na ausência de carvão, a menor eficiência técnica foi na concentração de 4,84 mg L⁻¹ de AIB, que resultou no menor número de raízes (4,49 raízes plântula⁻¹) (Figura 8A). Desta forma, concentrações de AIB acima 4,84 mg L⁻¹, aumentam o número de raízes de mandioquinha-salsa. Para o comprimento de raízes (Figura 8B), o uso de carvão ativado proporciona uma redução de 0,0945 mm no comprimento de raízes, a cada aumento de 1,0 mg L⁻¹ de AIB. Mais uma vez, confirma-se que para a cultivar estudada, o carvão ativado propicia efeito antagônico para o desenvolvimento e

consequentemente o crescimento de raízes, provavelmente pela propriedade de adsorção dos compostos do meio de cultura.

Figura 8 - Concentrações de AIB em função do uso de carvão ativado (com e sem) no cultivo *in vitro* de mandioquinha-salsa (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft) cultivar BRS Rubia 41; A) número de raízes, e B) comprimento de raízes.



Fonte: Autoria própria (2022)

No cultivo *in vitro* da orquídea, Oliveira (2016), observou que doses de carvão ativado maiores que $0,14 \text{ g L}^{-1}$ inibiram o desenvolvimento de microplantas.

Essa diversidade de resultados é comumente observada na cultura de tecidos, pois está relacionada principalmente a interação entre o genótipo e demais fatores relacionados ao enraizamento de plantas cultivadas *in vitro* como: os níveis de auxina endógena, as condições inerentes à planta matriz como juvenilidade, o meio de cultura, a presença de demais reguladores de crescimento e carboidratos, a nutrição mineral, a presença de poliaminas e substâncias como carvão ativado e compostos fenólicos, além das condições ambientais de crescimento (SOUZA; PEREIRA, 2007).

Na ausência de carvão ativado, o menor crescimento de raízes (2,19 mm) é obtido na dose de $5,64 \text{ mg L}^{-1}$ de AIB. Logo estima-se que existe uma relação intrínseca entre os níveis de auxina endógena e exógena para iniciar a indução, iniciação e alongação do sistema radicular.

Foi possível observar a formação de calo somente nos tratamentos, ausência de carvão + AIB (9) e ausência de carvão + AIB (12) (Tabela 7). Percebe-se que a adição de carvão ativado não promoveu a formação de calo, justamente por sua característica citada acima. Na ausência do carvão ativado, concentrações de AIB maiores que 9 mg L^{-1} resultaram na formação de células não diferenciadas. O uso de

auxinas favorece a indução e a iniciação radicular e inibe o alongamento, porém concentrações elevadas podem levar à formação de calo (GUERRA *et al.*, 2016).

Tabela 7 – Porcentagem de presença de calo em relação a presença ou ausência de carvão ativado em função de diferentes doses de AIB no cultivo *in vitro* de mandioquinha-salsa (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft) cultivar BRS Rubia 41.

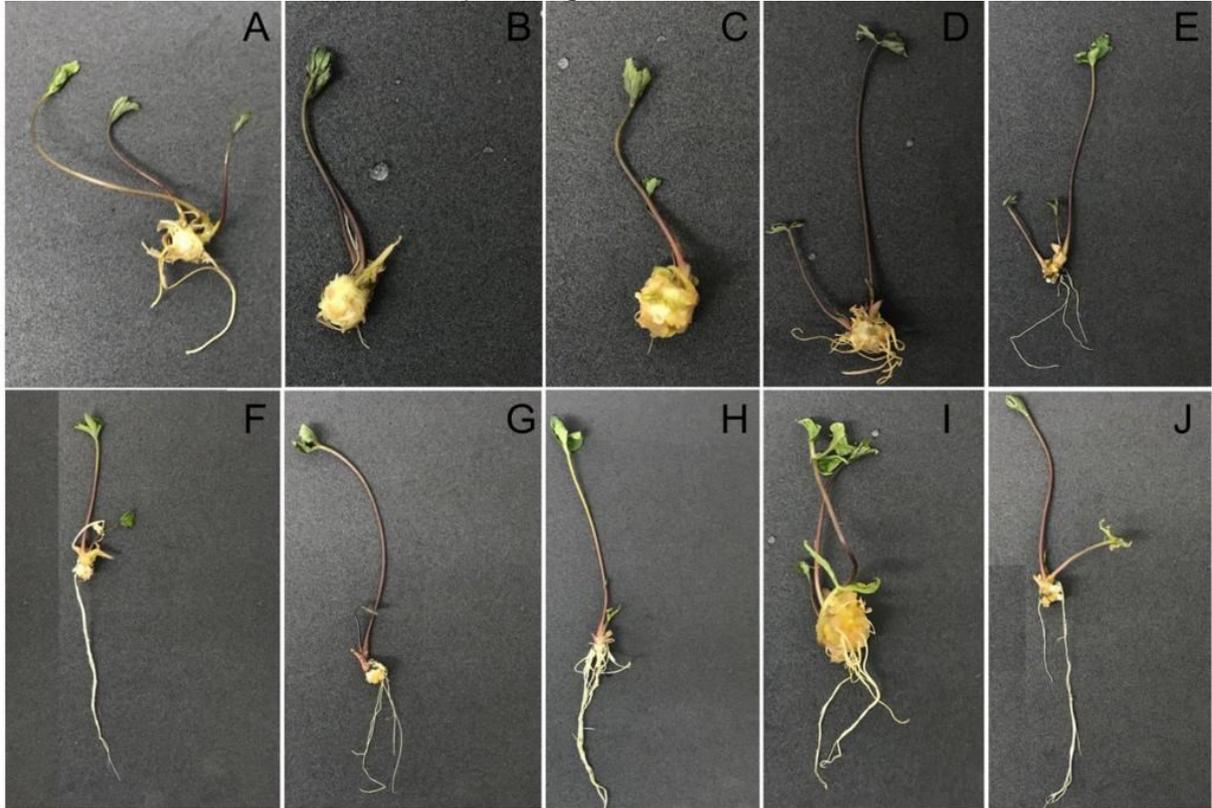
Tratamento	Presença de calo (%)
Ausência de carvão + 0 mL ⁻¹ de AIB	0 b
Ausência de carvão + 3 mL ⁻¹ de AIB	0 b
Ausência de carvão + 6 mL ⁻¹ de AIB	0 b
Ausência de carvão + 9 mL ⁻¹ de AIB	100 a
Ausência de carvão + 12 mL ⁻¹ de AIB	100 a
Presença de carvão + 0 mL ⁻¹ de AIB	0 b
Presença de carvão + 3 mL ⁻¹ de AIB	0 b
Presença de carvão + 6 mL ⁻¹ de AIB	0 b
Presença de carvão + 9 mL ⁻¹ de AIB	0 b
Presença de carvão + 12 mL ⁻¹ de AIB	0 b
Coefficiente de variação	21 %

Legenda: Médias seguidas por letras diferentes, ranqueadas pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade.

Fonte: A autoria Própria (2022)

Pelos resultados obtidos, verifica-se que para o enraizamento *in vitro* de microplantas de mandioquinha-salsa, a utilização do carvão ativado nas concentrações avaliadas no meio de cultura não favorece a formação de raízes, nem mesmo o seu crescimento (Figura 9). Entretanto, evita a formação de calo nas microplantas. Mas a presença de auxina estimula formação de raízes quando em baixas concentrações.

Figura 9 - Microplantas de mandioca-salsa (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft) cultivar BRS Rubia 41 cultivadas em meio B5 submetidas a diferentes concentrações de AIB com e sem carvão ativado (CA). A) 0,0 mg L⁻¹ de AIB com carvão ativado; B) 3,0 mg L⁻¹ de AIB com carvão ativado; C) 6,0 mg L⁻¹ de AIB com carvão ativado; D) 9,0 mg L⁻¹ de AIB com carvão ativado; E) 12,0 mg L⁻¹ de AIB com carvão ativado; F) 0,0 mg L⁻¹ de AIB sem carvão ativado; G) 3,0 mg L⁻¹ de AIB sem carvão ativado; H) 6,0 mg L⁻¹ de AIB sem carvão ativado; I) 9,0 mg L⁻¹ de AIB sem carvão ativado; J) 12,0 mg L⁻¹ de AIB sem carvão ativado



Fonte: A autoria própria (2022)

4.4 Ensaio 4 – Enraizamento *in vitro*

A análise de variância, apresentou efeitos significativos ($p < 0,05$) de tratamentos, para todos os caracteres avaliados, exceto para taxa de sobrevivência (Tabela 8).

Tabela 8 - Resumo da análise de variância para as variáveis número de raízes (NR), comprimento de raízes (CR), número de brotos (NB), número de folhas (FOL), comprimento de parte aérea (CPA) e taxa de sobrevivência (TXSO) em função de diferentes balanços hormonais AIB:BAP (0:0; 6:6; 12:0) no cultivo *in vitro* de mandiocinha-salsa (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft) cultivar BRS Rubia 41.

Fator de variação	GL	Quadrados médios					
		NR ¹	CR ²	NB ³	FOL ⁴	CPA	TXSO
Tratamento	2	42,38*	0,17*	2,01*	0,16*	33,15*	130,00 ⁿ _s
Resíduo	27	0,11	0,00	0,06	0,01	0,92	113,33
Coefficiente de variação (%)		11,13	8,41	28,89	22,34	19,09	12,38

Legenda: (*) significativo a 5% de probabilidade de erro pelo teste F. ns: não significativo; ¹: dados transformados por raiz quadrada; ²: dados transformados por Arcoseno raiz quadrada; ³dados transformados por ln; ⁴: dados transformados por 1/x.

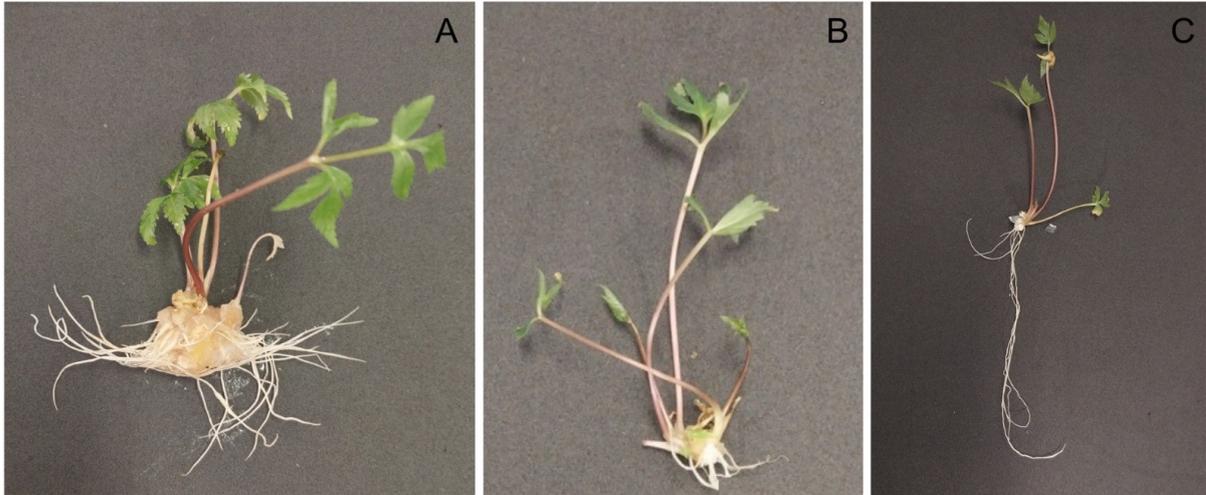
Fonte: Autoria própria (2022)

Para o número de raízes, o melhor tratamento foi a relação 12:0 (auxina:citonicina). Na cultura de tecidos, é habitualmente utilizado o meio de cultura acrescido de auxinas, como o Ácido Naftalenoacético (ANA), ácido indolacético (AIA), ácido Indolbutírico (AIB), entre outros para obter sucesso no enraizamento (ERIG; SCHUCH; HAVES, 2004).

Em geral, após aplicação da auxina sintética, ocorre um aumento imediato no nível endógeno de auxina natural e conseqüentemente há o início da formação de raízes primordiais (GASPAR; HOFINGER, 1988). Entretanto, esse mesmo tratamento não apresentou um maior número de raízes. O processo de formação de raiz ocorre de uma a três semanas e pode ser dividido em três fases: indução, iniciação e alongação. As fases de indução e iniciação, geralmente são dependentes de auxina, mas o crescimento (alongação) das raízes pode ser inibido pela presença da auxina (MCCOWN, 1988; ONO; RODRIGUES, 1996; GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Segundo Costa *et al.* (2008) uma possível alternativa seria submeter microplantas a uma fase de indução de raízes *in vitro* a partir de meios de cultura com adição de auxina exógena, seguida de uma etapa de alongamento por meio de cultura sem regulador de crescimento. Assim, um maior número de raízes mais curtas em fase de ativo crescimento, são mais adequadas ao transplante, por facilitar o desenvolvimento *ex vitro* das microplantas (Figura 10).

Figura 10 - Microplantas de mandioquinha-salsa (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft) cultivar BRS Rubia 41 submetidas a diferentes balanços hormonais AIB:BAP (mg L^{-1}). A) balanço hormonal 12:0 mg L^{-1} ; B) balanço hormonal 6:6 mg L^{-1} ; C) balanço hormonal 0:0 mg L^{-1}



Fonte: Autoria própria (2022)

A ausência de fitoregulador (0:0), promoveu um maior crescimento de raízes e de parte aérea (Tabela 9). Segundo Salisbury e Roos (1991), a presença de auxina é necessária na fase de indução do sistema radicular, conforme se aumenta a concentração da auxina, diminui o comprimento das raízes, podendo ocasionar a até uma inibição completa do crescimento da raiz.

Neste experimento, as microplantas foram cultivadas por 30 dias nos respectivos níveis de auxina (Figura 10). Altas concentrações de auxina, durante a fase de alongamento das raízes, podem impedir o crescimento das mesmas. Sendo assim, é recomendado utilizar auxina entre 7 e 15 dias, para que favoreça o processo de indução e iniciação radicular, e posteriormente a mesma seja transferida a um meio de cultura sem fitorreguladores (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1990).

Tabela 9 - Teste de comparação de médias para as variáveis número de raízes (NR), comprimento de raízes (CR), número de brotos (NB), número de folhas (FOL), comprimento de parte aérea (CPA) e taxa de sobrevivência (TXSO) em função de diferentes balanços hormonais AIB:BAP (0:0; 6:6; e 12:0) no cultivo *in vitro* de mandioquinha-salsa (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft) cultivar BRS Rubia 41

Tratamentos	NR	CR	NB	FOL	CPA	TXSO
6:6	1,26 ¹ c	0,86 c	3,66 a	4,66 a	4,40 b	90,00 a
12:0	26,90 a	2,15 b	2,35 b	2,31 b	3,60 b	83,00 a
0:0	7,72 b	12,89 a	1,45 c	2,27 b	7,08 a	85,00 a

Legenda: ¹médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem estatisticamente entre si, a 5% de probabilidade de erro pelo teste de Tukey.

Fonte: Autoria própria (2022)

Basicamente, o balanço entre as auxinas e as citocininas é que determinará a regulação do crescimento e da morfogênese de tecidos e órgãos vegetais. De forma geral uma alta razão estimula a formação de raízes, uma baixa razão leva a formação de parte aérea e em níveis intermediários, o tecido cresce como um calo indiferenciado (FIOR, 2007), o que explica o maior comprimento de parte aérea observado no tratamento sem hormônios (0:0) e maior comprimento de raízes. Já para maior número de raízes o balanço 12:0 obteve um melhor resultado.

A relação 6:6, apresentou as maiores médias para número de brotos e para número de folhas verdes (Tabela 9). Possivelmente esse efeito se deu em resposta à alta concentração de citocinina. Na cultura de tecidos, a citocinina é utilizada para crescimento de parte aérea, bem como a formação de novos brotos. Segundo Mercier (2004), balanços hormonais com elevadas concentrações de citocinina favorecem a diferenciação de gemas caulinares em detrimento da diferenciação de raízes.

A presença de calo foi observada em todos os tratamentos, entretanto essa condição não impossibilitou o crescimento e desenvolvimento das microplantas.

A taxa de sobrevivência observada após 30 dias de transplântio não apresentou diferença estatística entre os tratamentos, uma vez que todos os tratamentos apresentaram uma alta taxa de sobrevivência superior a 80%.

4.5 Ensaio 5 – Aclimação

A análise de variância, apresentou efeito não significativo da interação entre substratos (substrato Plantmax® + pó de fibra de coco (1:1) e substrato Plantmax® + casca de arroz carbonizada (1:1)) x relação hormonal AIB:BAP (0:0 e 6:6) para todas as variáveis avaliadas. A relação 12:0 não foi avaliada, uma vez que as plântulas na no substrato Plantmax® + casca de arroz carbonizada apresentaram mortalidade de 100% ainda na primeira semana (Figura 10 A). Para o efeito isolado de relação hormonal apenas as variáveis número de folhas verdes (NFV) e número de brotos (NB), foram significativas ($p < 0,05$). Efeito isolado de substrato para as variáveis comprimento de parte aérea (CPA), número de raízes (NR) e comprimento de raízes (CR), também foram significativos ($p < 0,05$). A variável número de folhas senescentes não apresentou resposta significativa para nenhum fator (Tabela 10).

Um grande número de plantas micropropagadas não sobrevive quando são transferidas das condições *in vitro* para o ambiente externo. Esta transferência crítica ocorre devido a fatores como o estresse hídrico, luminosidade, fotossíntese, absorção

de nutrientes, fitossanidade. Nesse sentido é fundamental a aclimação das plântulas para obter sucesso na cultura de tecidos vegetais (HARARIKA, 2003).

Tabela 10 - Resumo da análise de variância para as variáveis número de folhas verdes (NFV), comprimento de parte aérea (CPA), número de raízes (NR), comprimento de raízes (CR), número de brotos (NB) e número de folhas senescentes (NFS) em função de diferentes balanços hormonais AIB:BAP (6:6 e 0:0) e substratos (substrato Plantmax® + casca de arroz carbonizada e substrato Plantmax® + pó de fibra de coco) no cultivo *ex vitro* de mandiocinha-salsa cultivar BRS Rubia 41.

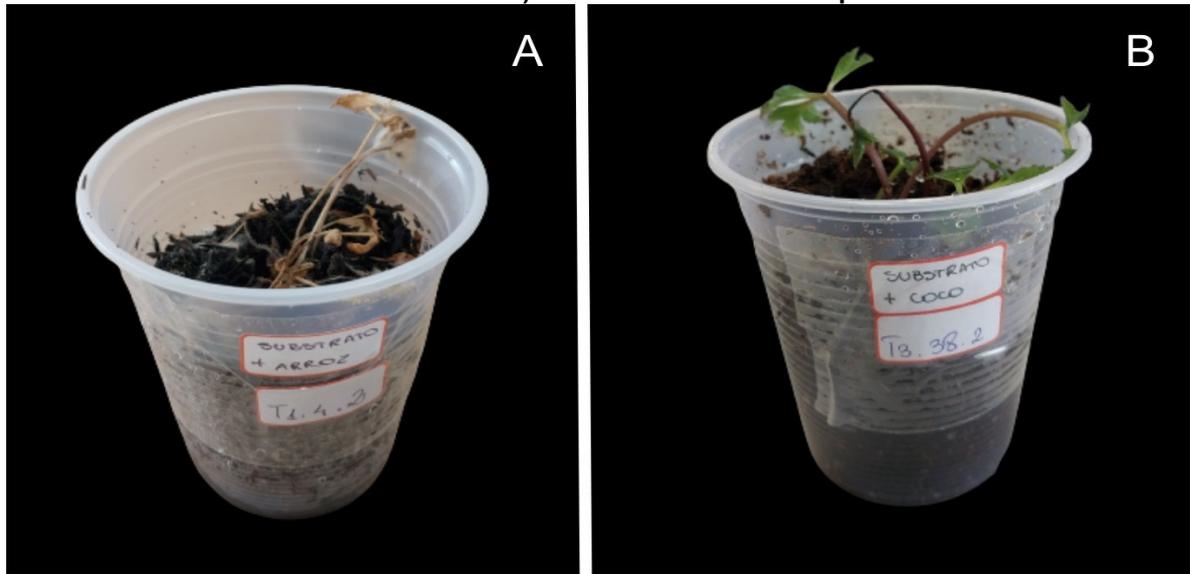
Fator de variação	NFV	CPA	NR	CR ¹	NB ²	NFS ¹
Substrato	0,001ns	28.38*	25.75*	0.87*	0.05*	0.06ns
AIB:BAP	7,70*	0.81ns	1.75ns	0.02ns	0.15*	0.02ns
Substrato x AIB:BAP	0,52ns	2.24ns	0.45ns	0.01ns	0.001ns	0.01ns
Residuo	1,06	3.50	3.85	0.03	0.01	0.07
Coefficiente de variação	39,14	31.26	28.97	10.39	8.85	22.67

Legenda: ¹ dados transformados via $\ln(x+1)$; ² dados transformados via raiz cúbica; *: significativo a 5% de probabilidade de erro pelo teste F; ns: não significativo. Fonte: Autoria própria (2022)

A aclimação é essencial para um sistema de micropropagação bem sucedido (HOFFMANN, 2002). Skrebsky, Nicoloso e Ferrão (2004), ressaltam que tal processo consiste de modificações morfoanatômico-fisiológicas necessárias às plantas para que possam sobreviver em um novo ambiente. Microplantas cultivadas possuem alterações anatômicas (formação de cera epicuticular e efetiva regulação estomatal), que promovem o enrijecimento das microplantas, fator limitante para a sobrevivência, ocasionado pelo decréscimo da concentração de sacarose (POSPÍŠILOVÁ *et al.*, 2007).

Sasamori, Endres Junior e Droste (2016) apontam que uma questão fundamental na fase de aclimação é a adaptação do genótipo ao substrato, sendo necessários substratos que mantenham maior umidade junto a elas e com características que permitam a sobrevivência e o desenvolvimento dos indivíduos. O substrato adequado para obtenção de bons índices de sobrevivência de plantas na fase de aclimação deve apresentar elevado espaço de aeração, mediana capacidade de retenção de água, baixo teor total de sais solúveis e, principalmente, isento de propágulos de microrganismos fitopatogênicos e plantas invasoras (FIOR, 2007).

Figura 10 - Microplantas de mandioca-salsa (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft) cultivar BRS Rubia 41 na fase de aclimação, submetidas a diferentes substratos. A) substrato Plantmax® + casca de arroz carbonizada. B) substrato Plantmax® + pó de fibra de coco



Fonte: Autoria própria (2022)

As microplantas cultivadas *in vitro* estão expostas a alta umidade do ar, baixa irradiância luminosa e limitação de troca de gases, além da alta disponibilidade de nutrientes e fonte de carbono (ZIV, 1994). Apesar do substrato Plantmax® com pó de fibra de coco apresentar o melhor resultado para a sobrevivência *ex vitro*, a taxa de sobrevivência não ultrapassou 50%, o que se considera um baixo desempenho de sobrevivência na micropropagação. Tais condições abióticas sofrem alterações de forma oposta durante a fase de aclimação, sendo fatores limitantes para sobrevivência das microplantas (LAKSO *et al.*, 1986).

Para as variáveis, comprimento de parte aérea, número de raízes e comprimento de raiz, o substrato Plantmax® com pó de fibra de coco apresentou as maiores médias, comparativamente ao substrato Plantmax® com casca de arroz carbonizada (Tabela 11). Segundo Schmitz, Souza e Kämpf (2002), o baixo desempenho da casca de arroz carbonizada pode ser justificado pelo baixo volume de água disponível para as microplantas.

Para o efeito de relação AIB:BAP, apenas as variáveis número de folhas verdes e número de brotos apresentaram diferença significativa, sendo que a relação 6:6, apresentou as maiores médias (Tabela 11).

Tabela 11 - Teste de comparação de médias para as variáveis número de folhas verdes (NFV), comprimento de parte aérea (CPA), número de raízes (NR), comprimento de raízes (CR), número de brotos (NB) e número de folhas senescentes (NFS) em função de diferentes balanços hormonais AIB:BAP (6:6 e 0:0) e substratos (substrato Plantmax® + casca de arroz carbonizada e substrato Plantmax® + pó de fibra de coco) no cultivo *ex vitro* de mandiocquinha-salsa (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft) cultivar BRS Rubia 41

Tratamento	NFV	CPA	NR	CR	NB
Casca de arroz carbonizada	2.63 ¹ a	4.65 b	5.50 b	3.84 b	0.97 a
Pó de fibra de coco	2.64 a	7.31 a	8.04 a	6.70 a	0.46 b
AIB:BAP (6:6)	3.32 a	5.75 a	7.10 a	5.06 a	1.12 a
AIB:BAP (0:0)	1.94 b	6.21 a	6.44 a	5.47 a	0.31 b

Legenda: ¹ médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem estatisticamente entre si, a 5% de probabilidade de erro pelo teste de Tukey. Fonte: Autoria própria (2022)

Já a fibra de coco, estudos sugerem um grande potencial em seu uso como substrato agrícola, destacando a alta capacidade de retenção de água, boa drenagem, acidez, alta salinidade, decorrente, sobretudo, dos altos teores de potássio e cloro, e variação nos teores de nutrientes (HANDRECK, 1993; EVANS; KONDURU; ROBERT, 1996; KONDURU; EVANS, 1999; ABAD *et al.*, 2002). Resultados semelhantes foram obtidos por Lacerda *et al.* (2006), que recomendam substratos à base de pó de coco ou sob mistura com argissolo, na aclimação de microplantas de sabiá (*Mimosa caesalpiniaefolia* Benth). Bezerra *et al.* (2001) e Silveira *et al.* (2002) também constataram que a fibra de coco constituiu um excelente substrato para o cultivo de tomateiro e na aclimação do crisântemo, respectivamente. Segundo Paiva e Paiva (2001), substrato mais poroso e melhor arejado, formam melhores raízes mais funcionais e eficientes na absorção de água e nutrientes. Isso aumenta o número de sobreviventes na aclimação.

Se observarmos o ensaio 4 o balanço hormonal AIB:BAP 6:6 foi o que proporcionou também um maior número de folhas verdes e número de brotos. Possivelmente essa maior concentração de citocinina perdurou até a fase da aclimação resultando também em um maior número de folhas verdes e número de brotos. Para as demais variáveis, CPA, NR e CR, não houve diferenças significativas entre as relações 0:0 e 6:6.

O balanço hormonal 12:0 resultou em mortalidade de 100% ainda na primeira semana no substrato Plantmax® + casca de arroz carbonizada. Nesse caso, não foi possível avaliar seu desempenho comparativo entre os substratos. Entretanto observa-se que por mais que o balanço 12:0 tenha resultado um maior número de

raízes *in vitro*, a sua sobrevivência não foi eficiente quando propagada na casca de arroz carbonizada. Em alguns casos, a concentração de auxina que promove bom enraizamento não é a mesma que promove uma alta sobrevivência *ex vitro* (COSTA *et al.*, 2008).

Tabela 12 – Teste de comparação de médias para a variável taxa de sobrevivência (TXSO) diferentes balanços hormonais AIB:BAP (0:0, 6:6 e 12:0) e substratos (substrato Plantmax® + casca de arroz carbonizada e substrato Plantmax® + pó de fibra de coco) no cultivo *ex vitro* de mandiocinha-salsa (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft) cultivar BRS Rubia 41

Tratamento	TXSO
Substrato Plantmax® + Casca de Arroz Carbonizada (6:6)	20 ab
Substrato Plantmax® + Casca de Arroz Carbonizada (12:00)	5 b
Substrato Plantmax® + Casca de Arroz Carbonizada (00:00)	10 ab
Substrato Plantmax® + Pó de Fibra de Coco (6:6)	0 b
Substrato Plantmax® + Pó de Fibra de Coco (12:00)	50 a
Substrato Plantmax® + Pó de Fibra de Coco (00:00)	20 ab
Coeficiente de variação	105 %

Legenda: Médias seguidas por letras diferentes, ranqueadas pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade. Fonte: Autoria própria (2022)

Para a taxa de sobrevivência, a relação substrato e balanço hormonal o melhor tratamento se deu no substrato Plantmax® + pó de fibra de coco e balanço hormonal 12:0, o mesmo tratamento do ensaio anterior que propiciou um maior número de raízes (Tabela 12). Logo evidencia-se a importância da rizogênese *in vitro* e compreende-se que um maior número de raízes influencia em uma maior taxa de sobrevivência. Segundo Costa *et al.* (2008) as etapas de enraizamento/alongamento *in vitro* são fundamentais para a maioria das espécies, uma vez que a obtenção de um sistema radicular funcional e uniforme é requisito básico para que se alcancem elevadas taxas de sobrevivência na fase de aclimação.

Segundo Silva *et al.* (2011) o maior problema que restringe o uso da micropropagação é a baixa taxa de sobrevivência das microplantas durante a aclimação *ex vitro*, resultante de uma alta perda de água pela transpiração. Ou ainda, as raízes formadas *in vitro* nem sempre são eficientes na absorção de água e de nutrientes no momento da passagem das microplantas que estavam *in vitro* para o substrato. O estresse hídrico é causado pela transpiração excessiva de partes da microplanta, principalmente nas folhas, ou absorção inadequada de água pelas raízes

e, em geral, é o maior problema no processo de aclimação. Nas condições *in vitro*, as microplantas se desenvolvem com baixa luminosidade e elevada umidade (PAIVA; PAIVA, 2001).

Entretanto, a taxa de sobrevivência não diferenciou estatisticamente dos tratamentos, substrato Plantmax® + pó de fibra de coco e substrato Plantmax® + casca de arroz carbonizada sem regulador de crescimento.

5 CONCLUSÃO

A melhor concentração de AIB para o enraizamento de mandioquinha-salsa é 12 mg L⁻¹. A redução de 50% da concentração de sais do meio de cultura B5 não favorece o enraizamento. Deste modo, para a cultura da mandioquinha-salsa o melhor meio de cultura para o enraizamento *in vitro* é o B5 completo.

O carvão ativado não promoveu um maior número e comprimento de raízes, indiferentemente das combinações entre os tratamentos (meio de cultura e dose de AIB).

A combinação meio de cultura B5 completo e balanço hormonal 12:0 mg L⁻¹ propicia um maior número de raízes. Entretanto, para o comprimento de raízes o melhor resultado é o mesmo meio de cultura, porém na ausência de regulador de crescimento (0:0 mg L⁻¹).

A melhor composição de substrato para a sobrevivência das microplantas no ambiente *ex vitro* de mandioquinha-salsa é o substrato Plantmax® + pó de fibra de coco, onde apresenta melhor desempenho tanto na taxa de sobrevivência, bem como no comprimento de parte aérea, número de raízes e comprimento de raiz.

REFERÊNCIAS

- ABAD, M. NOGUERA, P.; PUCHADES R.; MAQUIEIRA A.; NOGUEIRA V. Physico-chemical and chemical Properties of some coconut coir dusts for use as peat substitute for containerized ornamental plants. **Biores. Tech.**, v. 82, n. 3, p. 241-245, 2002.
- ALENCAR, G. **Os cientistas desenvolveram variedades de mandioca-salsa que causaram até 80% mais que a cultivar tradicional**. EMBRAPA. 2018. Disponível em: <https://www.embrapa.br/en/busca-de-noticias/-/noticia/33407934/cientistas-desenvolvem-variedades-de-mandioca-salsa-que-produzem-ate-80-mais-que-a-cultivar-tradicional>. Acessado em: out/22.
- ALOUFA, M. A. I. Enraizamento in vitro de plantas lenhosas: dificuldades e soluções. *In*: Congresso brasileiro de floricultura e plantas ornamentais, 14. **Anais**: Congresso Brasileiro de cultura de tecidos de plantas, 1. p.3-5. 2003.
- ALVES, C.; OLIVEIRA, J. R.; REIS, E.S.; CORRÊA, R. M.; SOUZA, J.; SILVA, J. C. O.; PAULA, J. C. R.; RODRIGUES, L. H. F.; SOUZA, M. A.; MENDONÇA, M. R. A cultura de tecidos na agricultura. *In*: I Jornada Científica E Vi Fipa Do CEFET Bambuí, 2008, Bambuí. **Anais**: Bambuí: Instituto Federal de Minas Gerais, 2008.
- ANDRADE, S. R. M. **Princípios da cultura de tecidos vegetais**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2002. 16p. (Documentos 58, Embrapa Cerrados, ISSN 1517-5111).
- ARAÚJO, L. H. A.; CARVALHO, J. M. F. C. de. **Técnicas de cultivo in vitro**. Areia: UFPB/ Centro de Ciências Agrárias, 2005.
- ARDITTI, J.; ERNST, R. **Micropropagation of orchids**. New York: J. Wiley, 1993. 682p.
- ASSIS, T. F.; TEIXEIRA, S. L. Enraizamento de plantas lenhosas. *In*: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa- SPI/Embrapa-CNPH, 1998. p. 261-296. 1998.
- BEZERRA, F. C.; ROSA, M. F.; BRÍGIDO, A. K. L.; NORÕES, E. R. V. Utilização de pó de coco como substrato de enraizamento para estacas de crisântemo. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v. 7, n. 2, p. 129-134, 2001.
- CALVETE, E. O.; KÄMPF, A. N.; SUZIN, M. Concentração de sacarose no enraizamento in vitro de morangueiro. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 20, n. 2, p. 186-191. 2002.
- CAMPANA, B. M.; CASTAGNARI, F.; COVATTA, F.; HENNINGS, M.; POLERO, H. J. Enraizamento in vitro Del portainjerto Damas GF 1869 (Prunus insititia x Prunus spinosa). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 16, n. 3, p. 85-94, dez., 1994.
- CANDIDO, Danieli Ferneda. **Cultivo in vitro, diversidade genética e análise bibliométrica de mandioca-salsa**. 2022. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, 2022.

- CARVALHO, A. D. F.; MADEIRA, N. R.; SILVA, G. O. Adaptability and stability of commercial yield of arracacha in southern region of Minas Gerais State. **Horticultura Brasileira**, v. 36, p. 100-105, 2018.
- CASTANHA, N.; VILLAR, J.; MATTA JUNIOR, M. D.; ANJOS, C. B. P.; AUGUSTO, P. E. D. Structure and properties of starches from Arracacha (*Arracacia xanthorrhiza*) roots. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 117, p. 1029-1038, 2018.
- CHAPLA, P. I.; BESSON, J. C. F.; OLIVEIRA, L. K.; SILVA, J. M.; ROCHA, A. C. S.; STEFANELLO, S. P. H. Carvão ativado e agentes geleificantes do meio de cultura no crescimento *in vitro* de *Miltonia flavescens* Lindl. **Plant Cell Culture e Micropopagation**, v.5, n.2, p.87-93, 2009.
- CHUIZA-ROJAS, M. R. RODRÍGUEZ-BASANTES, A. I.; BRITO-MOÍNA, H. L. Producción de láminas de plástico biodegradables a partir del almidón de *Arracacia xanthorrhiza*. **Dom. Cien.**, Vol. 6, núm. 2, Especial. p. 981-994. 2020.
- CLASSIC MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiol. Plant**, 1962, 15: 473-497.
- CONCEIÇÃO, I. S. C.; CARMO, L. P.; LIMA-BRITO, A. Cost reduction in the micropropagation of *Solanum lycopersicum* L. var. cerasiforme. **Colloquium Agrariae**, v. 17 n. 3, p. 12-20, 2021.
- CORPES, R. S.; SANTOS, A. S. Influência dos reguladores de crescimento 2,4-D e BAP associados aos solidificantes Agar e Phytigel na indução de calos de *Crinum americanum* L. (Amaryllidaceae). **Investigação, Sociedade e Desenvolvimento**, v. 10, n. 12, 2021.
- COSTA, F. H. S.; PASQUAL, M.; PEREIRA, J. E. S.; RODRIGUES, F. A.; MIYATA, L. Y. Relação entre o tempo de enraizamento *in vitro* e o crescimento de plantas de bananeira na aclimatização. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.30, n.1, p.31-37, 2008.
- D'ARTH, S. M.; SIMPSON, S. I.; SEELYE, J. F.; JAMESON, P. E. **Bushiness and cytokinin sensitivity in micro-propagated Zantedeschia**. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Amsterdam, v. 70, n. 1, p. 113-118, 2002.
- DRUART, P. H.; WULF, O. de. Activated charcoal catalyses sucrose hydrolysis during autoclaving. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.32, p.97-99, 1993.
- EMBRAPA. BRS Rúbia e BRS Catarina Novas cultivares de mandioquinha-salsa ampliam as opções de cultivo da hortalça. **Hortalças em revista**. Embrapa Hortalças Ano IV - Número 16 abril - p. 6-9. junho de 2015.
- EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa e Tecnologia. Embrapa Recursos Genéticos E Biotecnologia. **Cultura de Tecidos**, A Importância desta Técnica para a Biotecnologia e o Agronegócio. Brasília, DF, 2006. Disponível em: https://www.embrapa.br/documents/1355163/1994475/2006_culturadetecidos.pdf/d7a0cde8-622b-487d-b415-a24a87ebae52.
- EMBRAPA. **Mandioquinha-salsa *Arracacia xanthorrhiza* Bancroft**. Embrapa Hortalças. Brasília DF. 2021.

EPAGRI. Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina. 2018. **Sistema de Plantio Direto de Hortaliças (SPDH) O cultivo da Mandioquinha-salsa**. Boletim Didático 147

ERIG, A. C.; SCHUCH, M. W.; HAVES, A. C. Enraizamento *in vitro* e aclimatização de mudas de marmeleiro Cvs. Mc e Adams, utilizadas como porta-enxerto para a pereira. **Scientia Agraria**, Curitiba, v. 5, n.1-2, p.61-68, 2004.

EVANS, M.R.; KONDURU S.; DE ROBERT H. S. Source variation in physical and chemical properties of coconut coir dust. **Hortsci.**, Alexandria, v. 31, n. 6, p. 965-967, 1996.

FAYAD, J. A.; COMIN, J. J.; KURTZ, C.; MAFRA, A.; MADEIRA, N. R. **Sistema de plantio direto de hortaliças (SPDH): o cultivo da mandioquinha-salsa**. Florianópolis: Epagri, 2018. 58 p. (Epagri. Boletim didático, 147).

FERREIRA, E. B.; CAVALCANTI, P. P.; NOGUEIRA, D. A.; **Package ‘ExpDes.pt’**. Cran. 2018.

FIOR, C. S. **Propagação de plantas in vitro: teoria à prática**. DHS - Faculdade de Agronomia UFRGS. 2007.

FORD, Y. Y.; BONHAM, E.C.; CAMERON, R. W. F.; BLAKE P. S.; JUDD H. L.; R. S. HARRISON-MURRAY. Adventitious rooting: examining the role of auxin in easy and a difficult-to-root plant. **Plant Growth Regulation**, v.10, p.1-11, 2001.

GAMBORG, O.; MILLER, R.; OJIMA, K. Nutrient requirement suspensions cultures of soybean root cells. **Experimental Cell Research**, v. 50, n. 1, p. 151-158, 1968.

GASPAR, T.; HOFINGER, M. Auxin metabolism during adventitious rooting. In: DAVIS, T.D.; HAISSIG, B.E.; SANKHLA, N. (Eds.). **Adventitious root formation in cuttings**. Portland: Dioscorides Press. v.2, p.117-31. 1988.

GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; DE KLERK, G. J. **Plant propagation by tissue culture**. Volume 1: The background. 3rd edition. Dordrecht: Springer Science e Business Media, 2008.

GOMES, G. A. C.; PAIVA, R.; HERRERA, R. C.; PAIVA, P. D. O. Micropropagation of *Maclura tinctoria* L.: an endangered woody species. **Revista Árvore**. v.34, n.1, 2010.

GONÇALVES, T. R. J. **Estabelecimento in vitro de genótipos de mandioquinha-salsa (*Arracacia xanthorrhiza* bancroft)**. Trabalho de Conclusão de Curso, Agronomia, UTFPR. 2019.

GONÇALVES, W.; DE ALMEIDA, J. A. S.; SALOMOM, M. V.; FILHO, O. G. Aclimatização e aclimatação de mudas micropropagadas de híbrido f1 de *Coffea arabica* L. **Anais: X Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil – ISSN: 1984-9249**. 2019.

GOSS, J. **Package ‘nortest’**. Cran. 2015.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI. p. 183-260. 1998.

- GUERRA, M. P.; NODARI, R. O.; FRAGA, H. P. F.; VIEIRA, L. N.; FRITSCHÉ, Y. **Apostila Biotecnologia**. Universidade Federal de Santa Catarina centro de ciências agrárias, departamento de fitotecnia. 2016.
- GÜNTHER, K. **Organogênese direta in vitro em Eucalyptus dunnii maiden: multiplicação e enraizamento**. Universidade Federal de Santa Catarina. Curitiba, 2017.
- GUSON, R. R.; MORAES, C. P.; RONCONI, C. C. Influência de diferentes concentrações de carvão ativado no crescimento e enraizamento in vitro de *Cattleya pumila* HOOK. **Agronegócio e Meio Ambiente**, Maringá, v.5, n.3, p. 551-563, 2012.
- HANDRECK, K. A. Properties of coir dust, and its use in the formulation of soilless potting media. **Communic. Soil Sci. Plant Analysis**, Beltsville, v. 24, n. 3/4, p. 349-363, 1993.
- HARARIKA, B.N. Acclimatization of tissue-cultured plants. **Current Science**, v.85, n.12, p.1704-12, 2003.
- HERMANN, M. Arracacha (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft). *In*: HERMANN, M.; HELLER, J. (eds). **Andean roots and tubers: ahipa, arracacha, maca and yacon. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops**. Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Gatersleben/International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy, v. 21, 1997.
- HERNÁNDEZ, B. G. D. **Diversidade genética e desenvolvimento de protocolo de regeneração in vitro em *Jatropha curcas***. 2014. 65 f. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical) - Instituto Agrônomo de Campinas, Campinas, 2014.
- HOFFMANN, A. **Aclimação de mudas produzidas in vitro e in vivo**. Informe Agropecuário, v.23, n.216, p.21-4, 2002.
- KONDURU, S.; EVANS, M. R. Coconut husk and processing effects on chemical and physical properties of coconut coir dust. **Hortsci.**, Alexandria, v. 34, n. 1, p. 88-90, 1999.
- LACERDA, M. R. B.; PASSOS, M. A. A.; RODRIGUES, J. J. V.; BARRETO, L. P. Características físicas e químicas de substratos a base de pó de coco e resíduo de sisal para produção de mudas de sabiá (*Mimosa caesalpiniaefolia* Benth). **Revista Árvore**, Viçosa, v. 30, n. 2, p. 163-170, 2006.
- LAKSO, A. N.; REISH, B. I.; MONTENSEN, J.; ROBERTS, M. H. Carbon dioxide enrichment for stimulation of growth of in vitro-propagated grapevines after transfer from culture. **Journal of the American Society for Horticultural Science** 111: 634-638. 1986.
- LEBLANC, R. E. G.; PUIATTI, M.; SEDIYAMA, M. A. N., FINGER, F. L.; MIRANDA, G. V. Influência do pré-enraizamento e de tipos de mudas sobre a população, crescimento e produção da mandioquinha-salsa "Roxa de Viçosa". **Revista Ceres**, v. 55, n. 1, p. 74-82, 2008.
- LEONEL, M.; CARMO, E. L.; FRANCO, C. M. L.; GARCIA, E. L.; SANTOS, T. P. R. DOS. Cenoura peruana (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft) como matéria-prima para

produção de amidos especiais nativos. **Australian Journal of Crop Science**, vol.10, nº 8, 1151-1157. 2016.

LONDOÑO-RESTREPO, S. M.; RINCÓN-LONDOÑO, N.; CONTRERAS-PADILLA, M.; MILLAN-MALO, B. M.; RODRIGUEZ-GARCIA, M. E. Caracterização morfológica, estrutural, térmica, composicional, vibracional e pastosa de amidos e farinhas Legolike de Arracacha branca, amarela e roxa (*Arracacia xanthorrhiza*). **Jornal Internacional de Macromoléculas Biológicas**. Volume 113, páginas 1188-1197, 2018.

LONE, A. B.; BARBOSA, C. M.; TAKAHASHI, L. S. A.; FARIA, R. T. DE. Acclimatização de *Cattleya* (Orchidaceae), em substratos alternativos ao xaxim e ao esfagno. **Acta Sci. Agron.** Maringá, v. 30, p. 465-469, 2008.

LOPES, F. S. **Morfogênese in vitro como auxílio ao melhoramento da mandioquinha-salsa (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft)**. 2009. 102 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Espírito Santo, Espírito Santo, 2009.

MACEDO, A. **Mandioquinha-salsa: Embrapa multiplica ações em novas áreas de cultivo no Paraná**. EMBRAPA, 2019. Disponível em: <https://www.embrapa.br/en/busca-de-noticias/-/noticia/41711247/mandioquinha-salsa-embrapa-multiplica-acoes-em-novas-areas-de-cultivo-no-parana>. Acessado em: out/22.

MADEIRA, N. **Cientistas desenvolvem variedades de mandioquinha-salsa que produzem até 80% mais que a cultivar tradicional**. Portal Campo Vivo, 2018. Disponível em: <https://campovivo.com.br/economia/cientistas-desenvolvem-variedades-de-mandioquinha-salsa-que-produzem-ate-80-mais-que-a-cultivar-tradicional/> Acesso em maio de 2023.

MADEIRA, N. R. **Micropropagação e indexação de mandioquinha-salsa**. 2004. 141 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2004.

MADEIRA, N. R.; CARVALHO, A. D. F.; SILVA, G. O.; BROTEL, N.; BORTOLETTO, A. C. **Mandioquinha-Salsa *Arracacia xanthorrhiza* Bancroft**. Brasília: Embrapa, 2021.

MADEIRA, N. R.; TEIXEIRA, J. B. T.; ARIMURA, C. T.; JUNQUEIRA, C. S. Influência da concentração de BAP e GA₃ no desenvolvimento *in vitro* de mandioquinha-salsa. **Horticultura Brasileira**, v. 23, p. 982-985, 2005.

MATOS, E.; MARCANO, M.; AZÓCAR, C. J.; MORA, A. Establecimiento y multiplicación in vitro de cinco cultivares de apio (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft) colectados en Venezuela. **Bioagro**, v. 27, n. 2, p. 121-130, ISSN 1316-3361. 2015.

McCOWN, B.H. Adventitious rooting of tissue cultured plants. In: DAVIS, T.D.; HAISSIG, B.E.; SANKHLA, N. **Adventitious root formation in cuttings**, Portland: Dioscorides Press. v.2, p.289-302. 1988.

MCCOWN, B. H. Woody Plant Medium (WPM)-a mineral nutrient formulation for microculture for woody plant species. **Hort. Sci.**, v. 16, p. 453, 1981.

- MERCIER, H. Auxinas, In: KERBAUY, G. B. (ed.) **Fisiologia Vegetal**. São Paulo: Editora Guanabara Koogan S. A. p. 217-249. 2004.
- MORAES, L. M. DE; CAVALCANTE, L. C. D.; FARIA, R. T. Substratos para aclimatização de plântulas de *Dendrobium nobile* Lindl. (Orchidaceae) propagadas in vitro. **Acta Scientiarum**. Maringá, v. 24, p. 1397-1400, 2002.
- NAMASIVAYAM, P. Acquisition of embryogenic competence during somatic embryogenesis. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v. 90, p. 1-8, 2007.
- NUNES, E. D.; ZANELLA, M.; KOERICH, C. A. INCA e COQUEIRAL: primeiros cultivares catarinenses de mandiocinha-salsa. **Agropecuária Catarinense**, Florianópolis, v.36, n.1, 2023.
- OLIVEIRA, R. V. **Ambiente e condições de cultivo na rustificação e crescimento de plantas micropropagadas de plátano, CV. D'Angola (AAB)**. Rio Branco, 2016. 103 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Programa de Pós-graduação em Agronomia. Universidade Federal do Acre, 2016.
- ONO, E.O.; RODRIGUES, J.D. **Aspectos da fisiologia do enraizamento de estacas caulinares**. Jaboticabal: FUNEP. 83p. 1996.
- PACEK-BIENIEK, A.; DYDUCH-SIEMIŃSKA, M.; RUDAŚ, M. Influence of activated charcoal on seed germination and seedling development by the asymbiotic method in *Zygostates grandiflora* (Lindl.) Mansf. (Orchidaceae). **Folia Horticulturae**, v.22, n.2, p.45-50, 2010.
- PAIVA, R.; PAIVA, P. D. O. **Cultura de tecidos**, Lavras: UFLA/FAEPA. 2001.
- PÉREZ, J. B. P. **Obtención de biofilm a partir del almidón de zanahoria blanca (*Arracacia xanthorrhiza*) y de camote (*Ipomoea batatas*) como alternativa al uso de material plástico derivado de petróleo**. Riobamba - Ecuador 2019.
- PIERIK, R.L.M. **Cultivo in vitro de las plantas superiores**. Madrid: Mundi-Prensa, 1990. 326p.
- PINTO, A. N.C. **Cultivo in vitro de Meristemas de Batata Doce**. Trabalho de Conclusão de Curso, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, 2021.
- POSPÍŠILOVÁ, J.; SYNKOVÁ, H.; HASEL, D.; SEMORÁDOVÁ, Š. Acclimation of Plantlets to Ex Vitro Conditions: Effects of Air Humidity, Irradiance, CO₂ Concentration and Abscisic Acid (a Review). **Acta Horticulturae**. 748,p. 29-38. 2007.
- RADMANN, E. B.; FACHINELLO, J. C.; PETERS, J. A. Efeito de auxinas e condições de cultivo no enraizamento in vitro de porta-enxertos de macieira 'M-9'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 24, p. 624-628, 2002.
- RAI, M. K.; JAISWAL, V. S.; JAISWAL, U. Shoot multiplication and plant regeneration of guava (*Psidium guajava* L.) from nodal explants of in vitro raised plantlets. **Journal of Fruit and Ornamental Plant Research**, v. 17, n. 1, p. 29-38, 2009.
- ROCHA, M. A. C.; COSTA; M. A. P. C.; SILVA, S. A.; LEDO, C. A. S.; MOREIRA, M. J. S.; BASTOS, L. P. **Enraizamento in vitro e aclimatização de genótipos de**

jenipapeiro (*Genipa americana* L.). Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal, v. 30, n. 3, p. 760-774, 2008.

ROGALSKI, M.; MORAES, L. K. A.; FELISBINO, C.; CRESTANI, L.; GUERRA, M. P.; SILVA, A. L. Enraizamento in vitro de porta-enxertos de *Prunus*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 25, n. 2, p. 293-296, ago., 2003.

ROSSATO, M. **Propagação in vitro e aspectos anatômicos e ultraestruturais da calogênese em *Campomanesia adamantium***. Dissertação: Programa de pós Graduação em Agronomia. Jataí, Goiás. 64p. 2015.

SALISBURY, F. B.; ROOS, C. W. **Plant Physiology**. Wadsworth, California. cap.17, p.357-378. 1991.

SANTOS, F. F.; MADEIRA, N. R. **Mandioquinha-salsa (*Arracacia xanthorrhiza*), produção de mudas**. Embrapa Hortaliças Sistemas de Produção, 4 ISSN 1678-880X. 2008.

SASAMORI, M.H.; ENDRES JUNIOR, D. DROSTE, A. Sobrevivência e desenvolvimento de plântulas de *Cattleya intermedia* Graham (Orchidaceae) micropropagadas e aclimatadas em substrato com fibra de coco. **Revista Pesquisas**, Botânica 65: 293-303. 2014.

SCHENK, Roy U.; HILDEBRANDT, A. C. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. **Canadian journal of botany**, v. 50, n. 1, p. 199-204, 1972.

SCHMITZ, J. A. K.; DE SOUZA, P. V. D.; KÄMPF, A. N. Propriedades químicas e físicas de substratos de origem mineral e orgânica para o cultivo de mudas em recipientes. **Cienc. Rural**, Santa Maria, v. 32, n. 6, p. 937-944, 2002.

SCHWALBERT, R.; MALDANER, J.; AMARAL, G. A.; AITA, M. F.; TAROUÇO, A. K. Multiplicação in vitro de *Desmodium incanum* em presença de carvão ativado. **ENCICLOPÉDIA BIOSFERA**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.11 n.21; p. 1365 . 2015.

SILVA, A. L. L. OLIVEIRA, Y.; COSTA, J.; SCHEIDT, G. N. **Pré-aclimatização e aclimatização em cultivo hidropônico de plantas micropropagadas de *Eucalyptus saligna* Sm**. Revista Acadêmica: Ciências Agrárias e Ambientais, Curitiba, v. 9, n. 2, p. 179-184, abr./jun. 2011.

SILVA, L. R. da; JORGE, R. P. G.; TORALES, E. P.; VIEIRA, M. C.; ZÁRATE, N. A. H.; ARGANDOÑA, E. S. A. Potential of non-commercial parts of *Arracacia xanthorrhiza* Bancroft. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, ISSN 1981-8203, Vol. 16, Nº. 4, págs. 401-407, 2021.

SILVEIRA, D. G.; VIDAL, A. M.; LEDO, C. A. S.; SANTANA, J. R. F.; SOUZA, F. V. D. Aspectos morfofisiológicos na pré-aclimatização in vitro e aclimatização de plantas de caroá. **Revista Ciência Agrônômica**, v. 44, n. 3, p. 544-553, jul-set, 2013.

SILVEIRA, E.B. RODRIGUES V. J. L. B.; GOMES, A. M. A. MARIANO, R. L. R.; MESQUITA, J. C. P. Pó de coco como substrato para produção de mudas de tomateiro. **Hort. Bras.** Brasília, v. 20, n. 2, p. 211-216, 2002.

- SKREBSKY, E. C.; NICOLOSO, F. T.; FERRÃO, G. E. Sacarose e período de cultivo in vitro na aclimatização ex vitro de ginseng-brasileiro (*Pfaffia glomerata* Spreng. Pedersen). **Ciência Rural** 35(5): 1471-1477. 2004.
- SOLANO, L. M. A.; CARVAJAL, J. H. V.; MONTAÑA, J. P. G.; REINA, A. M. M. **Análise de alternativas para a produção de sementes vegetativas de *Arracacia xanthorrhiza* Bancroft em Tolima, Colômbia.** Vol 5, Edição 2, 2022.
- SOUZA, A. V.; PEREIRA, A. M. S. Enraizamento de plantas cultivadas in vitro. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.9, n. 4, p. 103-117, 2007.
- SOUZA, E.L. dos; SOUZA, J.de A. Produção de plantas de batata livres de vírus. **Anais: do 1º Simpósio Nacional de Cultura de Tecidos Vegetais.** Brasília: CNPH Embrapa, p.21-24, 1986.
- TAIZ, L. et al. **Fisiologia e Desenvolvimento Vegetal.** Artmed Editora, Porto Alegre. 2017.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal.** 4.ed. Porto Alegre: Artmed, 2009.
- TORRES, A. C; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas.** Brasília: CBAB/CNPH, v. 1, 1998. 864 p.
- VILLA, F. PASQUAL, M.; DE ASSIS, F. A.; PIO, L. A. S.; DE ASSIS, G. A. Crescimento in vitro de amoreira-preta: efeito de reguladores de crescimento e da cultivar. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 06, p. 1754-1759, 2008.
- VILLA, F.; PASQUAL, M.; SILVA, E. F. Micropropagação de híbridos de orquídea em meio knudson com adição de vitaminas do meio ms, benzilaminopurina e carvão ativado. **Ciências Agrárias**, v. 35, n. 2, p. 683-694, 2014.
- VITAMVAS, J.; VIEHMANNNOVA, I.; CEPKOVA, P. H.; MRHALOVA, H.; ELIASOVA, K. **Assessment of somaclonal variation in indirect morphogenesis-derived plants of *Arracacia xanthorrhiza*.** Pesquisa Agropecuária Brasileira, v.54, 2019.
- WELANDER, M.; SNYGG, O. Effect of applied and endogenous auxin on callus and root formation of in vitro shoots of the apple rootstocks M26 and A2. **Annals of Botany**, London, v. 59, n. 4, p. 439-443, 1987.
- ZIV, M. In vitro Acclimatization. In: AITKEN-CHRISTIE, J.; KOZAI, T. SMITH, M.A.L. (Ed.). 1994. Automation and environmental control in plant tissue culture. **Kluwer Academic Publisher.** 493p. 1994.