

## Rustificação *in vitro* de microplantas de mandioquinha-salsa

### *In vitro* rustification of mandioquinha-salsa microplants

Laura Abatti<sup>1</sup>, Bárbara Nicole Daboit<sup>2</sup>, Emanuelli Pereira<sup>3</sup>, Thiago de Oliveira Vargas<sup>4</sup>, Taciane Finatto<sup>5</sup>

#### RESUMO

A mandioquinha-salsa (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft) é uma espécie propagada vegetativamente. O cultivo *in vitro* é uma técnica que permite obter mudas de alta qualidade fitossanitária. O enraizamento e a aclimação das plantas micropropagadas constituem uma etapa limitante para obtenção de clones de qualidade, portanto, a rustificação pode auxiliar neste processo. O objetivo deste trabalho foi testar *in vitro* meios de cultura B5 e ½B5, com diferentes tipos de vedação: para-filme, gaze e PVC. As plantas foram introduzidas em 40mL do respectivo meio de cultura, sendo T1= B5+para-filme; T2= B5+gaze; T3= B5+PVC; T4= ½B5+para-filme; T5= ½B5+gaze; T6= ½B5+PVC. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com dez repetições. Após quatro semanas, foram avaliados comprimento da maior raiz (CR) e altura de planta (AP) com auxílio de uma régua. Os dados foram submetidos a análise de variância e comparação de médias pelo teste de Tukey ( $\alpha=5\%$ ). Houve diferença significativa entre os tratamentos. As maiores médias foram obtidas no T6 para CR de 10,16cm e 21,74cm para AP. Dessa maneira pode-se concluir que os meios B5 e ½B5, com o uso de PVC, promoveram maior comprimento de raiz e altura de planta *in vitro*, além de proporcionar melhor adequação para aclimação *ex vitro*.

**PALAVRAS-CHAVE:** aclimação; enraizamento; *Arracacia xanthorrhiza* Bancroft

#### ABSTRACT

*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft is a species propagated vegetatively. In vitro cultivation is a technique that allows for obtaining high-quality phytosanitary seedlings. Rooting and acclimatization of micropropagated plants constitute a limiting step in obtaining high-quality clones; therefore, hardening, which involves the gradual exposure of in vitro-cultivated plants to ex vitro growing conditions, can assist in this process. The aim of this study was to test the B5 and ½B5 culture media in vitro with different sealing materials: parafilm, gauze, and PVC. The plants were introduced into 40 mL of their respective culture medium, with the following treatments: T1= B5+parafilm; T2= B5+gauze; T3= B5+PVC; T4= ½B5+parafilm; T5= ½B5+gauze; T6= ½B5+PVC. The experimental design was completely randomized, with ten replicates. After four weeks, the length of the longest root (LR) and plant height (PH) were evaluated using a ruler. The data were subjected to analysis of variance, and mean comparisons were made using Tukey's test ( $\alpha=5\%$ ). There was a significant difference among the treatments in both variables. The highest means were obtained in T6, with an LR of 10.16 cm and a PH of 21.74 cm. Therefore, it can be concluded that the B5 and ½B5 media, when using PVC, promoted greater root length and in vitro plant height, as well as providing better suitability for ex vitro acclimatization.

**KEYWORDS:** Acclimatization; rooting; *Arracacia xanthorrhiza* Bancroft.

<sup>1</sup> Acadêmica do curso de Agronomia, bolsista do CNPq. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, Paraná, Brasil. E-mail: lauraabatti@alunos.utfpr.edu.br. ID Lattes: 3432161029085341.

<sup>2</sup> Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, Paraná, Brasil. E-mail: barbaradaboit@alunos.edu.br. ID Lattes: 1197571324506407.

<sup>3</sup> Bolsista da CAPES. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, Paraná, Brasil. E-mail: eps.emanuelli@gmail.com. ID Lattes: 8794484840939160.

<sup>4</sup> Docente nos cursos de Graduação e Pós-Graduação em Agronomia (PPGAG). Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, Paraná, Brasil. E-mail: thiagovargas@utfpr.edu.br. ID Lattes: 5187448260422379

<sup>5</sup> Docente nos cursos de Graduação e Pós-Graduação em Agronomia (PPGAG). Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, Paraná, Brasil. E-mail: tfinatto@utfpr.edu.br. ID Lattes: 0528448968496434.



## INTRODUÇÃO

A mandioquinha-salsa (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft) é originária da região andina da América do Sul (MADEIRA *et al.*, 2021), sendo o Brasil o maior produtor mundial, com 92 mil toneladas em 8.870 hectares plantados (Embrapa, 2018). O cultivo é realizado por pequenos e médios produtores, tendo destaque na agricultura familiar devido à mão de obra demandada nas práticas de propagação, plantio e colheita. A espécie tem potencial de adequação para o cultivo orgânico.

A produção de mudas é feita exclusivamente de forma vegetativa, através de rebentos ou mudas. Quando esta multiplicação é realizada utilizando plantas matrizes infestadas, pode ocorrer a disseminação de alguns patógenos, como vírus (CALVETE *et al.*, 2000). Nestes casos, a propagação vegetativa proporciona o acúmulo de viroses, resultando em significativa redução na produção. Sendo assim, a qualidade do material para o plantio pode afetar diretamente a velocidade de enraizamento, crescimento e desenvolvimento da planta. Uma das formas de realizar a limpeza clonal da espécie, é através da cultura de meristema. Esta técnica se destaca dos métodos convencionais por apresentar, como uma das suas aplicações primordiais, a produção e a manutenção de plantas isentas de viroses.

A micropropagação tem se mostrado com grande potencial na produção de mudas sadias em larga escala, em um espaço reduzido e sem estarem sujeitas às sazonalidades. Isto se deve ao fato, desta técnica apresentar diversas vantagens como alta taxa de multiplicação, uniformidade fisiológica, disponibilidade de propágulos livres de doenças, uniformidade de brotos, entre outras características (ARIAS, 1993). Ainda, a fase de enraizamento concomitante a aclimação é de grande importância, uma vez que são indispensáveis para a obtenção das novas plantas que serão multiplicadas a campo. A composição do meio de cultura tem importante função nas respostas de crescimento de células e tecidos, sendo que os meios de cultura podem ser modificados e reduzidos de acordo com a necessidade de cada tipo de explante e a espécie com a qual se esteja trabalhando (TORRES *et al.*, 2001).

Além disso, a condição de esterilização necessária ao cultivo *in vitro* e a manutenção do ambiente asséptico no interior dos frascos de cultivo impõe um selamento severo dos recipientes, impedindo trocas gasosas, que são necessárias para o desenvolvimento das plantas (JACKSON, 2003). Buscando minimizar a ausência total nas trocas gasosas, podem ser utilizadas diferentes formas de vedação dos frascos de cultivo. Sendo assim, a fase de transferência das plantas estabelecidas *in vitro*, visando a rustificação em condições *ex vitro*, constitui importante etapa na formação de mudas de qualidade. Esta, é a etapa mais crítica da micropropagação, podendo ser um fator limitante, pois as plantas são expostas a mudanças súbitas nas condições ambientais, uma vez que passam de uma condição heterotrófica para a autotrófica, sofrendo estresses fisiológicos, sendo a perda de água o principal problema (BANDEIRA *et al.*, 2007).

Devido a este fator, o uso da biotecnologia através do cultivo *in vitro* de meristemas, aliado ao enraizamento *in vitro* e rustificação das plantas, poderia ajudar significativamente nas condições de propagação e cultivo a campo da mandioquinha-salsa. Dessa forma, este experimento teve como objetivo, avaliar a combinação de meio de cultura B5 e B5 meia-força (½B5) com diferentes tipos de vedação dos frascos visando obter plantas de mandioquinha-salsa enraizadas e rustificadas para posterior aclimação *ex vitro* de plantas.



## MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório Biotecnologia Vegetal, Departamento Acadêmico de Ciências Agrárias, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná - UTFPR, *campus* Pato Branco, com a cultivar de mandioquinha-salsa (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft) Amarela de Senador Amaral, cujos propágulos foram fornecidos pela Embrapa Hortaliças.

No experimento, foram testados meio de cultura acrescido de vitaminas B5 (GAMBORG; MILLER; OJIMA, 1968) e B5 meia-força ( $\frac{1}{2}$ B5), com a adição de 100 mg L<sup>-1</sup> dos reguladores de crescimento BAP (6-benzilaminopurina) e AIB (ácido indolbutírico) para o meio B5 e reduzido pela metade para  $\frac{1}{2}$ B5, em diferentes tipos de vedações dos frascos de cultivo, sendo eles película de polivinilcloro (PVC), gaze (Cicatrisan<sup>®</sup>) de 13 fios em quatro camadas e para-filme "M" (Bemis<sup>®</sup>). Para a realização do experimento, as plantas de mandioquinha-salsa, anteriormente repicadas 2 vezes, foram introduzidas em meio de cultura B5 ou  $\frac{1}{2}$ B5 x 3 tipos de vedação, totalizando 6 tratamentos, sendo eles, T1= B5+para-filme; T2= B5+gaze; T3= B5+PVC; T4=  $\frac{1}{2}$ B5+para-filme; T5=  $\frac{1}{2}$ B5+gaze; T6=  $\frac{1}{2}$ B5+PVC, com 10 frascos por tratamento. Foram utilizados frascos de 40mL do respectivo meio de cultura.

O meio de cultura basal foi composto pela formulação salina de vitaminas B5 ou  $\frac{1}{2}$ B5, acrescidos com 3% (p.v.) de sacarose, gelificado com 0,7% (p.v.) de ágar, e teve o pH ajustado para 5,8. Posteriormente, os meios de cultura foram autoclavados. As plantas foram introduzidas, em câmara de fluxo laminar (CFL), contendo o respectivo meio de cultura/tratamento, e foram mantidas em sala de crescimento com temperatura de 24 ± 2°C e fotoperíodo de 16 horas, onde permaneceram por quatro semanas. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com 10 repetições, e cada unidade experimental sendo composta por 4 plantas por frasco.

Após quatro semanas, as plantas foram transferidas para copos de plástico, contendo substrato comercial (Plantmax<sup>®</sup>) e fibra de coco esterilizados, na proporção de 1:1, os quais foram furados para a passagem de água na parte inferior. Estes, então foram fechados com outros copos de plástico maiores, para manter a umidade. Após este processo, as plantas permaneceram em câmara climática com temperatura de 24 ± 2°C e fotoperíodo de 16 horas, e umidade relativa do ar em 80% durante quatro semanas. Dois dias antes das avaliações, os copos de plástico da parte superior foram furados para permitir as trocas gasosas com o ambiente. Foram avaliadas as variáveis comprimento da maior raiz (CR) e altura de planta (AP) com auxílio de uma régua. Os dados foram submetidos à análise de variância com comparação de médias pelo teste de Tukey ( $\alpha=5\%$ ), em nível de 5% de significância, com auxílio do programa estatístico Genes (CRUZ, 2016).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na análise de variância foram observadas diferenças significativas ( $P<0,05$ ) para comprimento da maior raiz e altura de planta entre os meios de cultura com diferentes tipos de vedação. Na tabela 1 são apresentados os valores para a variável comprimento da maior raiz (CR), para o meio B5 e  $\frac{1}{2}$ B5, com diferentes tipos de vedação, para-filme, gaze e PVC.

**Tabela 1 – Médias para o comprimento da maior raiz de plantas de mandioquinha-salsa durante o processo de aclimatação *ex vitro* após cultivo *in vitro*, com os respectivos tratamentos.**

Tratamentos	Médias (cm)
T6= ½B5+PVC	10.16 a
T3= B5+PVC	8.66 ab
T2= B5+gaze	6.26 bc
T5= ½B5+gaze	6.04 bc
T4= ½B5+para-filme	5.41 c
T1= B5+para-filme	4.59 c

Fonte: autoria própria (2023).

\*Dados seguidos por mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey, em nível de 5% de probabilidade de erro.

Foi observada diferenças significativas em nível de 5% de significância pelo teste de Tukey, para os meios de cultura B5 e ½B5 em diferentes tipos de vedação, para a variável CR. O melhor tratamento foi o T6, pois apresentou maior média de CR, sendo 10,16cm, o qual não difere significativamente do T3 de média 8,66cm, ambos utilizando PVC, diferindo significativamente dos demais tratamentos. Ainda, o T3 não diferiu significativamente de T2 e T5, com médias respectivamente de 6,26cm e 6,04cm. Ambos não diferiram significativamente de T4 e T1 de média de 5,41cm e 4,59cm, respectivamente.

Estando em conformidade com Dantas *et al*, (2000), que avaliaram concentrações de sais no meio básico MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) reduzidas a 1/2, 1/3 ou 1/4 e que possibilitaram melhor enraizamento *in vitro* em amoreira-preta aclimatada *ex vitro*. Ainda, Lédo *et al*, (2006), trabalhando com mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes), observaram que o meio de cultura ½MS acrescido de 2,0 g L<sup>-1</sup> de carvão ativado proporcionou maior crescimento de raiz, tendo média de 2,72cm, quando comparado aos demais tratamentos.

De modo geral, o uso de meios menos concentrados tem permitido melhores resultados no enraizamento de plântulas *in vitro* (McCown, 1988; Grattapaglia & Machado, 1998; Pinto & Lameira, 2001; Pasqual, 2001; Aloufa, 2003; Souza et al., 2004; Lima, 2004). No meio de cultura MS, a alta concentração de sais que o compõem, mesmo com presença de auxinas, pode inibir o enraizamento *in vitro* (McCown, 1988). Diluições deste, para ½, e até ¼ de sais, tem possibilitado melhores resultados para muitas espécies de plantas.

Na tabela 2, são apresentados os valores para a variável altura de planta (AP), para o meio B5 e ½ B5, em três tipos de vedação, para-filme, gaze e PVC.

**Tabela 2 – Médias para a variável altura de planta de plantas de mandioquinha-salsa durante o processo de aclimatação *ex vitro* após cultivo *in vitro*, com os respectivos tratamentos**

Tratamentos	Médias (cm)
T6= ½B5+PVC	21.74 a
T3= B5+PVC	20.61 ab
T2= B5+gaze	14.16 abc
T5= ½B5+gaze	13.64 abc
T4= ½B5+para-filme	12.82 bc
T1= B5+para-filme	11.10 c

Fonte: autoria própria (2023).



\*Dados seguidos por mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey, em nível de 5% de probabilidade de erro.

Para a variável AP, foi observado que houve diferença significativa em nível de 5% de probabilidade para os meios de cultura B5 e ½B5, em diferentes tipos de vedação. Sendo que o T6 apresentou maior média para a variável altura de planta de 21,74cm não diferindo significativamente de T3, T2 e T5, de médias respectivamente de 20,61cm, 14,16cm e 13,64cm. Estes, não diferem significativamente entre si e não diferem do T4 que apresenta média de 12,82cm. Ainda, o T1 apresentou menor média para AP de 11,1cm, diferindo significativamente de T6 e T3.

Rodrigues *et al*, (2013), visando promover a indução de brotações *in vitro* em *Physalis peruviana* L., para a variável comprimento médio de brotos, observaram diferenças significativas entre 25, 75 e 100% do meio MS, sendo possível observar, um maior comprimento médio de brotos (15 cm) na ausência de BAP em 75% dos sais do meio MS. Ainda, para a variável altura de planta, pode-se citar a influência do substrato + pó de fibra de coco, induzindo o crescimento da plântula *ex vitro*. Estando em conformidade com estudos de Mafessoni (2023), onde observou-se que 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 no comprimento de parte aérea, número de raízes e comprimento de raiz.

## CONCLUSÃO

Sendo assim, pode-se concluir que o melhor tratamento visando enraizamento e rustificação *in vitro* e aclimação *ex vitro* de plantas de mandioquinha-salsa é o T6 (½B5+PVC) para ambas as variáveis analisadas, comprimento da maior raiz (CR) e altura de planta (AP).

## Agradecimentos

À UTFPR, à minha orientadora e aos meus colegas de pesquisa pelo apoio e auxílio prestado. À Embrapa Hortaliças pelo fornecimento dos propágulos e ao CNPq (processo nº 421821/2021-3) pelo auxílio financeiro e pela construção do conhecimento para a realização deste trabalho.

## Conflito de interesse

Não há conflito de interesse.

## REFERÊNCIAS

ARIAS, O. **Commercial migropagation of banana. In: International Network for the improvement banana and Plantain.** Montpellier, 1993(INIBAP biotechnology application for banana and plantain improvement).

BANDEIRA, F. S.; XAVIER, A.; OTONI, W. C.; LANI, E. R. G. Aclimatização *ex vitro* de plantas propagadas pela enxertia *in vitro* de clones de *Eucalyptus urophylla* X *E. grandis*. **Revista Árvore**, v. 31, n. 5, p. 773–781, 2007. Disponível em:



<https://www.scielo.br/j/rarv/a/4c5pzhvhbLVgxffgHLVPgNb/?format=pdf&lang=pt>. Acesso em: 30 abr. 2022.

CALVETE, E. O.; KÄMPF, A. N.; BERGAMASCHI, H.; DAUDT, R. H. S. Avaliação do crescimento de plantas de morangueiro, durante a aclimatização ex vitro. **Horticultura Brasileira**, v. 18, n. 3, p. 188–192, nov. 2000. DOI 10.1590/S0102-05362000000300009. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0102-05362000000300009&lng=pt&tIng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-05362000000300009&lng=pt&tIng=pt). Acesso em: 14 set. 2023.

DANTAS, M. C. A.; CERETTA, M.; COUTINHO, F. E.; FORTES, G. R. de L. Enraizamento in vitro da amoreira-preta (*Rubus sp.*), cultivar Caigangue. **Agropecuária de Clima Temperado**. Pelotas, v. 3, n. 2, p. 123-130, 2000.

GAMBORG, O. L.; MILLER, R. A.; OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. **Experimental Cell Research**, v. 50, n. 1, p. 151–158, 1968. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0014482768904035>. Acesso em: 27 abr. 2022.

JACKSON, M. B. Aeration stress in plant tissue cultures. **Bulgarian Journal of Plant Physiology**, Special issue, p. 96-109, 2003.

LÉDO, A. da S.; SECA, G. S. V.; BARBOZA, S. B. S. C.; JUNIOR, J. F. da S. Crescimento inicial de mangabeira (*hancornia speciosa gomes*) em diferentes meios de germinação in vitro. **Ciênc. agrotec.**, v. 31, n. 4, p. 989–993, ago. 2007. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/cagro/a/MKbGHPRrgRKTW5KgJD66vDx/?format=pdf&lang=pt>. Acesso em: 17 set. 2023.

MADEIRA, N.; CARVALHO, A. D. F. de; SILVA, G. O. da; BOTREL, N.; BORTOLETTO, A. S. **como plantar mandioquinha-salsa**. 2021. v. 1. Disponível em: <https://www.embrapa.br/en/hortalicas/mandioquinha-salsa/autores>. Acesso em: 15 ago. 2023.

MAFESSONI, L. I. W. **Enraizamento in vitro e aclimação de microplantas de mandioquinha-salsa (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft)**. 2023. 62 f. UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ, Pato Branco-PR, 2023. Disponível em: <https://repositorio.utfpr.edu.br/jspui/bitstream/1/32297/1/enraizamentoinvitroaclimatacaomandioquinhasalsa.pdf>.

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, 1988. v.2, p.289-302.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, p. 473- 497, 1962.

RODRIGUES, F. A.; SOARES, J. D. R.; PASQUAL, M. DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE SAIS DO MEIO MS E BAP NA MULTIPLICAÇÃO IN VITRO DE *Physalis peruviana* L. **Biosci. J.**, v. 29, n. 1, p. 77–82, 2013.

TORRES, A. C. et al. **Meio e condições de incubação para a cultura de tecidos de plantas: formulações de meios de cultura de tecidos de plantas**. Brasília: Embrapa Hortalças (C.Tecn. 24), 2001.