

AURORA YOSHIKO SATO

**MICROPROPAGAÇÃO E PROTOCOLO PARA TRANSFORMAÇÃO  
DE MANDIOCA (*Manihot esculenta* Crantz) VIA  
*Agrobacterium rhizogenes***

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Curso de Fitotecnia, para obtenção do título de "*Doctor Scientiae*".

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
DEZEMBRO – 1999

A Deus.

Ao meu esposo *Herly Carlos*.

Ao meu filho *João Carlos Yuji*.

## **AGRADECIMENTO**

Aos meus pais e antepassados, pela educação e pelos ensinamentos, que permitiram a superação de diversos obstáculos.

À Universidade de Federal de Viçosa (UFV), especialmente ao seu Departamento de Fitotecnia, pela oportunidade de realização do curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa de estudos durante o período de quatro anos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pela bolsa de finalização de doutorado.

Ao professor José Maria, pela orientação, pela amizade e pelo apoio.

Aos professores Tocio Sedyama, Aluizio Borém de Oliveira e Paulo Roberto Cecon, pelas valiosas sugestões, pela dedicação, pela amizade e pelo profissionalismo.

Aos professores Marcos Paiva Del Giúdice e Francisco Affonso Ferreira, pelas preciosas sugestões e pela prestatividade.

Aos professores Eldo Antônio Monteiro da Siva, Carlos Roberto de Carvalho e Glauco Miranda, pelo auxílio técnico e pela amizade.

Ao professor José Eduardo Brasil Pereira Pinto e ao empresário Marcos Paiva, que me iniciaram na Cultura de Tecidos.

À Silvana, pela ajuda nas análises estatísticas e pela amizade.

Aos funcionários de Departamento de Fitotecnia da UFV, pela amizade e pela colaboração, em especial a Geraldo, Domingos e equipe, Ribeiro, Vicente e Mara.

À Cristina Salgado, pela amizade e ajuda na condução dos experimentos.

A Célia, Mariana, Cláudio, Marcelo, Philipe e todos os amigos do Laboratório de Testes de Progênie do Departamento de Fitotecnia.

Aos meus amigos e amigas, cujos laços se fortaleceram durante esse período.

Aos meus familiares distantes ou próximos, que sempre estiveram presentes em todos os momentos e que, de alguma forma, colaboraram para a realização deste trabalho.

À minha sogra em especial, que sempre ultrapassou os limites da bondade.

À Maria Francisca, que se ocupou dos deveres domésticos e, por vezes, de mãe, para que este trabalho pudesse ser realizado.

## **BIOGRAFIA**

AURORA YOSHIKO SATO, filha de Katsuhei Sato e Ruriko Sato, nasceu em Belém, Pará, em 5 de outubro de 1964.

Em dezembro de 1987, graduou-se em Engenharia Agrônômica pela Universidade Federal de Lavras (UFLA), em Lavras, Minas Gerais.

Iniciou sua carreira profissional na Bioplanta Tecnologia de Plantas Ltda., na cidade de Campinas, em 1988, e na Floralab, Rio Claro, SP, em 1991.

Em dezembro de 1994, recebeu o título de Mestre em Fitotecnia pela UFLA.

Em março de 1995, iniciou o Curso de Doutorado em Fitotecnia, na área de Biotecnologia, pela UFV.

## CONTEÚDO

	Página
EXTRATO .....	ix
ABSTRACT .....	xi
INTRODUÇÃO .....	1
<b>CAPÍTULO 1</b>	
MICROPROPAGAÇÃO DA MANDIOCA ( <i>Manihot esculenta</i> Crantz) .....	3
1. INTRODUÇÃO .....	3
1.1. Considerações gerais .....	3
1.2. Nitrato de amônio no meio de cultura .....	4
1.3. Fotoperíodo .....	4
1.4. Luz .....	5
1.5. ABA .....	6
1.6. Auxinas .....	7
1.7. Etileno .....	8

2. MATERIAL E MÉTODOS .....	10
2.1. Multiplicação de plântulas de mandioca sob efeito da concentração de nitrato de amônio com e sem BAP .....	11
2.2. Crescimento de plântulas de mandioca <i>in vitro</i> sob efeito de diversos fotoperíodos .....	12
2.3. Crescimento de plântulas de mandioca sob efeito de filtro de luz de diversas cores .....	13
2.4. Crescimento de plântulas de mandioca sob efeito do ABA .....	13
2.5. Crescimento de plântulas de mandioca sob efeito do 2,4-D e picloram no claro e no escuro .....	14
2.6. Crescimento de plântulas de mandioca sob efeito do STS e AgNO <sub>3</sub> .....	15
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	16
3.1. Multiplicação de plântulas de mandioca sob efeito da concentração de nitrato de amônio com e sem BAP .....	16
3.2. Crescimento de plântulas de mandioca <i>in vitro</i> sob efeito de diversos fotoperíodos.....	23
3.3. Crescimento de plântulas de mandioca sob efeito de filtro de luz de diversas cores.....	26
3.4. Crescimento de plântulas de mandioca sob efeito do ABA .....	29
3.5. Crescimento de plântulas de mandioca sob efeito do 2,4-D e picloram no claro e no escuro .....	33
3.6. Crescimento de plântulas de mandioca sob efeito do AgNO <sub>3</sub> e STS .....	40
3.6.1. AgNO <sub>3</sub> .....	40
3.6.2. STS .....	44
4. RESUMO E CONCLUSÕES .....	49
 <b>CAPÍTULO 2</b>	
TRANSFORMAÇÃO DA MANDIOCA VIA <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	52
1. INTRODUÇÃO .....	52
1.1. Considerações gerais .....	52
1.2. Utilização do <i>Agrobacterium rhizogenes</i> .....	53
1.3. Fatores que influenciam a infecção do <i>Agrobacterium</i> .....	55

1.4. Seleção de transformantes .....	57
1.5. Regeneração .....	58
1.6. Isozimas .....	59
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	62
2.1. Efeito da canamicina .....	63
2.2. Co-cultivo de discos foliares velhos e novos na presença e ausência de luz .....	64
2.3. Co-cultivo de discos foliares em meio MS mais <i>A. rhizogenes</i> em vários níveis de concentração de ANA .....	64
2.4. Calos supostamente transformados cultivados em vários níveis de BAP .....	65
2.5. Calos supostamente transformados cultivados em meio MS, GA <sub>3</sub> + BAP e picloram .....	66
2.6. Análise de isozimas .....	66
2.6.1. Preparo do gel .....	66
2.6.2. Coleta das amostras e extração das enzimas .....	67
2.6.3. Aplicação das amostras e corrida eletroforética .....	67
2.6.4. Revelação das bandas de isozimas .....	68
2.6.5. Confeção de zimogramas .....	69
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	70
3.1. Efeito da canamicina .....	70
3.2. Co-cultivo de discos foliares em meio MS com <i>Agrobacterium</i> <i>rhizogenes</i> na presença ou ausência de luz .....	73
3.3. Co-cultivo de discos foliares em meio MS mais <i>A.</i> <i>rhizogenes</i> em vários níveis de concentração de ANA .....	75
3.4. Calos de mandioca transformados em vários níveis de BAP .	76
3.5. Calos transformados em meio MS, MS + GA <sub>3</sub> + BAP e MS + picloram .....	76
3.6. Análise isozimática .....	78
4. RESUMO E CONCLUSÕES .....	80
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	82

## EXTRATO

SATO, Aurora Yoshiko, D.S., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 1999. **Micropropagação e protocolo para transformação de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) via *Agrobacterium rhizogenes***  
Orientador: José Maria. Conselheiros: Tocio Sedyama, Aluizio Borém de Oliveira e Paulo Roberto Cecon.

Foram realizados dois trabalhos no laboratório de testes de progênie do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa-MG. Um com a finalidade de desenvolver um protocolo de transformação de plantas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) via *Agrobacterium rhizogenes* resistente à canamicina, e o outro para avaliar o efeito de fotoperíodo, filtros coloridos, nitrato de amônio, 2,4-D, picloram, ABA, AgNO<sub>3</sub> e STS na micropropagação de plântulas de mandioca. Na transformação da mandioca foram testados: a) meio seletivo com canamicina (0,0; 100; 200; 300; 400; 500; 600; 700; 800; 900; e 1.000 mg/L), b) influência da idade e luz nos discos foliares co-cultivados com a bactéria, c) efeito do ANA (0,0; 0,1; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; e 5,0 mg/L) no co-cultivo, d) efeito de concentrações de BAP (1,0; 10,0; 50; e 100,0 mg/L), e) efeito do GA<sub>3</sub> (0,05) + BAP (2,0 mg/L) e picloram (8,0 mg/L). Foi também realizada a análise isozimática do material. Avaliaram-se: peso da matéria seca, número de folhas e raízes, comprimento da parte aérea, presença de

injúrias e coloração de folhas e caule. A partir de 100 mg/L de canamicina, as plântulas apresentaram fitotoxidez; folhas novas e no claro apresentam os melhores resultados; o melhor resultado com ANA foi obtido a 2,0 mg/L; calos transformados apresentaram maior peso de matéria seca com 10 mg/L de BAP e com picloram; na análise isozimática constatou-se diferença no padrão de bandas. Na micropropagação, avaliaram-se as mesmas características dos experimentos de transformação; nos experimentos com STS e AgNO<sub>3</sub> foram avaliados também o teor de clorofila, e nos de nitrato de amônio, fotoperíodo, filtros coloridos e ABA foi feita também uma análise mineral do material vegetal. Avaliou-se o efeito do nitrato de amônio (0; 1/8; 1/4; 1/2; 3/4; 1; e 2 da concentração original) com e sem BAP. Estudou-se o efeito dos fotoperíodos: 0; 8 e 16 h luz. Quanto ao efeito do STS e AgNO<sub>3</sub>, as concentrações utilizadas foram: de STS (0, 20, 30 e 50 µM) e de AgNO<sub>3</sub> (0, 10, 30 e 50 µM). Foram avaliados os efeitos de 2,4-D (0; 4,4; e 8,8 mg/L) e picloram (0; 4,8; e 9,6 mg/L) no claro e no escuro. Verificou-se também o efeito de 2,4-D (0; 2,2; 4,4; 6,6; e 8,8 mg/L) e ABA (0,0; 1,0 e 10 mg/L). Para avaliar o efeito da qualidade de luz, as plântulas foram colocadas sob filtros de acrílico vermelho, amarelo e azul. Os resultados obtidos indicaram que, com ou sem o BAP, pode-se usar uma concentração de nitrato de amônio abaixo da normalmente utilizada; o 2,4-D teve efeito melhor na concentração de 4,4 mg/L no escuro; e o picloram não induziu nenhum tipo de mudança morfogênica. O ABA impediu o crescimento da mandioca. O filtro amarelo foi o mais indicado para um estudo na área de enraizamento. O fotoperíodo age diferente conforme, o cultivar. Tanto para o AgNO<sub>3</sub> como para o STS a resposta da mandioca não foi benéfica.

## ABSTRACT

SATO, Aurora Yoshiko, D.S., Universidade Federal de Viçosa, December 1999. **Micropropagation and the protocol for cassava transformation (*Manihot esculenta* Crantz) by means of *Agrobacterium rhizogenes*.** Advisers: José Maria. Committee members: Tocio Sedyama, Aluizio Borém de Oliveira e Paulo Roberto Cecon.

There were two researches done in the progenie test laboratory at the Plant Technology Department at the Federal University of Viçosa, in Viçosa-MG. One of them had as its aim to develop a manioc plant transformation protocol (*Manihot esculenta* Crantz) by means of *Agrobacterium rhizogenes* which is resistant to kanamicine, and the other was to evaluate the effect of the photoperiod, colour filters, ammonium nitrate; 2,4-D, picloram, ABA, AgNO<sub>3</sub> and STS in the small plant of cassava. The following were tested during the cassava transformation: a) selective means with kanamicine (0,0; 100; 200; 300; 400; 500; 600; 700; 800; 900; and 1.000 mg/L), b) the influence of age and light over the leaf disks which were cultivated in bacteria, c) the effect of ANA (0,0; 0,1; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; and 5,0 mg/L) in the co-cultivate, d) the effect of the BAP (1,0; 10,0; 50; and 100,0 mg/L) concentrations, e) the effect of the GA3 (0,05) + BAP (2,0 mg/L) and picloram (8,0 mg/L). There was also a isozimatic analysis of the material. The following were evaluated: dry matter

weight, the number of leaves and roots, the length of the aerial part, the presence of damage and the coloring of the leaves and stem. With 100 mg/L of kanamicine, the small plants presented phytotoxicity; the new leaves and under light present better results; the best result with ANA was obtained with 2,0 mg/L; the calluses that were formed presented heavier weight, 10 mg/L of BAP, within the dry matter and with picloram; there was a difference with the band pattern in the isozimatic analysis. The same characteristics of the transformation experiments were evaluated; the chlorophyll content was evaluated in the experiments that had STS and  $\text{AgNO}_3$ , and there was also a mineral analysis of the vegetal material done for the photoperiod, colored filters and ABA. The effect of the ammonium nitrate (0; 1/8; 1/4; 1/2; 3/4; 1; and 2 from the original concentration) with and without BAP was evaluated. The effects of the photoperiods of light were studied : 0; 8 and 16 light hours. For the effect of the STS and the  $\text{AgNO}_3$ , the concentrations that were used were: STS (0, 20, 30 e 50  $\mu\text{M}$ ) and  $\text{AgNO}_3$  (0, 10, 30 and 50  $\mu\text{M}$ ). The effects of the 2,4-D (0; 4,4; and 8,8 mg/L) and picloram (0; 4,8; and 9,6 mg/L) in the light and in the dark were evaluated. The effect of 2,4-D (0; 2,2; 4,4; 6,6; and 8,8 mg/L) and ABA (0,0; 1,0 and 10 mg/L) was verified. To evaluate the light quality effect, the small plants were put under red, yellow and blue acrylic filter. The results that were obtained indicated that, with or without BAP, a ammonium nitrate concentration can be used below the usual amount that is used; the 2,4-D had a better effect in the concentration of 4,4 mg/L in the dark; and the picloram did not induce any type of morphogenic change. The ABA inhibited the growth of the manioc. The yellow filer was more indicated for a study in the rooting area. The photoperiod works differently according the cultivar. Either for the  $\text{AgNO}_3$  or for the STS the return from the cassava was not beneficial.

## INTRODUÇÃO

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é da família Euphorbiaceae, com origem no México, na Guatemala e no Brasil (ROGERS, 1963). Seu cultivo abrange de latitude 30°LN e S e altitudes até acima de 2.000 m. Suporta variações de temperatura de 10 a 40°C, precipitação de 50 a 4.000 mm e pH de 5 a 9. Ela é uma das 15 mais importantes culturas do mundo, sendo considerada cultura de subsistência para áreas tropicais (KARTHA e GAMBORG, 1979).

Dos alimentos produzidos nos trópicos, a mandioca é o quarto mais importante, sendo empregada como fonte energética humana e animal, além da utilização industrial (COCK, 1985). A mandioca de mesa, denominada também aipim ou macaxeira, já usada pelos índios na época do descobrimento do Brasil, é de grande importância na alimentação nacional, é utilizada como ingrediente ou acompanhante em pratos da culinária brasileira.

Da mandioca se obtêm farinha, com disponibilidade média de 41 kg/ha/ano (CONCEIÇÃO, 1986), tapioca ou farinha de goma, raspas e farinhas de raspa, *pellets* de mandioca, amido e derivados, álcool etílico e forragem.

Do período de 1985, em que a produção brasileira foi de 46.204 mil toneladas (PHILLIPS, 1974), para 1991, com 24.492 mil toneladas (UENO e SILVA, 1992), houve queda de 53% da produção nacional. Atualmente a

produção nacional de mandioca da safra 1998/99, segundo estimativa da Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, citado por SILVA (1999), é de 19,7 milhões de toneladas, podendo ter sido maior se não fosse a estiagem prolongada na região Nordeste, a incidência de bacteriose e a infestação de ervas daninhas, em face do excesso de chuva na região do Vale do Paranapanema.

Além dos fatores climáticos, os principais problemas no cultivo da mandioca são viroses, pragas, baixo conteúdo de proteínas nas raízes e presença de glucosídeos cianogênicos tóxicos (COCK, 1985).

Em razão de sua importância econômica e de alguns problemas encontrados no seu cultivo, foram feitos trabalhos na área de transformação e micropropagação, com os objetivos de propor um protocolo de transformação e estudar fatores que envolvem a micropropagação da mandioca.

## **CAPÍTULO 1**

### **MICROPROPAGAÇÃO DA MANDIOCA (*Manihot esculenta* Crantz)**

#### **1. INTRODUÇÃO**

##### **1.1. Considerações gerais**

A micropropagação é uma técnica desenvolvida há mais de 30 anos e tem sido amplamente usada em nível comercial por laboratórios, com a finalidade de multiplicação em larga escala de clones selecionados, utilizando técnicas de cultura *in vitro*, em menor espaço e tempo e a preços competitivos.

No que se refere à mandioca, a cultura de meristemas foi e é instrumento importante na erradicação de várias viroses que afetam sua produção. A infecção virótica severa afeta o crescimento e a produção das raízes tuberosas, causando perdas na produção que podem chegar a 96% (MUSSIO et al., 1998). O melhoramento genético via transformação também tem sido outro importante caminho na solução desses problemas; dessa maneira, essa aplicação requer o conhecimento do controle da regeneração na cultura de tecidos.

O objetivo do presente trabalho foi estudar: a influência do nitrato de amônio; o efeito dos reguladores de crescimento 2,4-D, picloram e ABA; o efeito de inibidores do etileno (STS e AgNO<sub>3</sub>); e o efeito do fotoperíodo e da qualidade da luz através de filtros na micropropagação da mandioca.

## 1.2. Nitrato de amônio no meio de cultura

O meio básico normalmente utilizado na fase de multiplicação na cultura de tecidos é o MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962); entretanto, vários trabalhos têm mostrado ser este um meio muito rico em sais, causando até toxidez e outros distúrbios fisiológicos. O nitrogênio é algumas vezes absorvido pelas plantas na forma orgânica, mas geralmente é suplementado na forma de íons  $\text{NH}_4^+$  e  $\text{NO}_3^-$ . Além da importância do nitrogênio nas formas  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4^+$  no crescimento das plântulas, muitos autores têm abordado o fenômeno de hiper-hidricidade ou vitrificação, que são desordens morfológicas e anatômicas. A maioria das plantas absorve preferencialmente  $\text{NO}_3^-$  ao  $\text{NH}_4^+$ , e em alguns casos ocorre o oposto; é necessário encontrar o balanço certo de  $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$  para um ótimo crescimento e desenvolvimento *in vitro*.

## 1.3. Fotoperíodo

Na Argentina, Arias et al. (1967), citados por BOLONHEZI (1991), em estudo desenvolvido *in vitro*, verificaram que existe inter-relação entre a temperatura e a iluminação no que se refere ao crescimento de raízes de estacas de caule e de ápices de ramos de mandioca cultivados em meio de cultura. Aos dois meses de idade das plantas, constataram que, sob luz contínua (24 horas), a temperatura foi mais importante, talvez por atuar na síntese de substâncias endógenas estimuladoras do crescimento da raiz. Por outro lado, concluíram que a luz contínua e a temperatura alta promoveram maior crescimento das raízes do que o fotoperíodo normal de 11 horas.

HUNT et al. (1977) reportaram que o ambiente pode provocar alterações no crescimento da planta de mandioca; desse modo, os dias longos podem induzir a redução da produção de raízes e as baixas temperaturas podem atrasar consideravelmente o enchimento das raízes tuberosas.

#### 1.4. Luz

A luz é um dos fatores físicos importantes no desenvolvimento das plantas, e sua qualidade, duração e intensidade influenciam diretamente este desenvolvimento.

POTTER e ROOD (1993) constataram que, com a diminuição da intensidade da luz, houve redução de folhas, raízes, peso de matéria seca, número de folhas e área foliar de *Brassica napus*; já em canola ocorreu o inverso. ROOD e ZANEWICH (1993) observaram o fotocontrole do metabolismo de giberelina em *Brassica*.

Quando uma planta é exposta à luz, a folha responde com produção de clorofila e conversão do precursor do plastídeo (etioplasto) em cloroplastos fotossinteticamente ativos (TAIZ e ZEIGER, 1991).

Altas irradiações inibem não só o enraizamento, como também o crescimento dos tecidos em geral, que requer uma irradiância de 35-70  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , enquanto no campo ela é de 140-320  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Isto se deve ao fato de a fotossíntese *in vitro* ser limitada, porquanto plantas nessas condições são consideradas heterotróficas (PIERIK, 1987).

A radiação ultravioleta é dividida em três classes: UVC (espectro até 280 nm), UVB (280-320 nm) e UVA (320-390 nm). O bloqueio da luz abaixo de 450 nm com filtro amarelo pode prevenir mudanças fotoquímicas do meio (HANGARTER e STASINOPOULOS, 1991a; STASINOPOULOS e HANGARTER, 1990).

Estudando calos de *Lycopersicon esculentum* L, *Daucus carota* L. e *Arabidopsis thaliana* L., HANGARTER e STASINOPOULOS (1991b) concluíram que a redução no crescimento causado pela luz branca não-filtrada pode ser atribuída primariamente mais a alterações fotoquímicas no meio de cultura que a funções fotossensoriais do tecido de plantas.

O crescimento de tecido de plantas cultivadas *in vitro* é determinado não somente pelo nível inicial de substâncias de crescimento e nutrientes no meio de cultura, mas também pelo nível relativo de desaparecimento antes e durante o subcultivo. Por exemplo, o ácido indol acético é rapidamente metabolizado pelo tecido da planta e degradado pela fotossensibilidade do ferro (HANGARTER e STASINOPOULOS, 1991b).

Alguns tecidos são capazes de continuar a crescer depois de o AIA ter sido degradado, sugerindo que o AIA inicialmente presente no meio seja requerido para induzir o crescimento, mas não para mantê-lo (HANGARTER e GOOD, 1981). Entretanto, outros tecidos parecem necessitar da presença contínua da auxina. HANGARTER e STASINOPOULOS (1991a) constataram que o ferro no meio de cultura catalisa a fotoxidação do ácido etilendiaminotetracético (EDTA) para formaldeído, que é tóxico para planta. Com a fotoxidação do EDTA, há formação de óxidos de ferro, que não podem ser usados pelas plantas, causando deficiência de ferro. Para se evitar essa fotoxidação e degradação do AIA, têm sido feitos muitos trabalhos com a utilização de filtros, prevenindo esse efeito negativo da luz no meio de cultura (STASINOPOULOS e HANGARTER, 1990; SATO, 1994).

A absorção de luz pelo meio livre de hormônio fica entre 220 e 450 nm. Nenhuma absorção de luz foi detectada entre 450 e 700 nm. Esta absorção de luz pelo meio é alta para FeEDTA e sais de nitrato. O filtro amarelo bloqueia a faixa de 290 e 450 nm. O AIA absorve luz a 300 nm e sofre degradação, a qual pode ser prevenida com o uso de contêineres feitos de polipropileno, que bloqueiam a luz dessa faixa para baixo (STASINOPOULOS e HANGARTER, 1990).

### **1.5. ABA**

O ácido abscísico (ABA) é um regulador de crescimento de plantas que pode estar envolvido no controle de inúmeros processos fisiológicos, como: abertura de estômatos, síntese de proteínas de estoque de sementes, inibição da germinação precoce, estresse e tolerância. Enquanto algumas dessas respostas ao ABA podem ser rápidas, em questão de minutos, para fechamento de estômatos, outras podem ser bem demoradas e são conhecidas por requererem mudanças na expressão gênica. Entretanto, dos mecanismos de percepção de sinal do hormônio, a rota de transdução ainda permanece obscura. Muitos estudos têm sido realizados para tentar desvendar o seu funcionamento.

Segundo Ammirato, 1982, citado por JEAN e CAPPADOCIA (1992), ABA a 1  $\mu\text{M}$  tem induzido a tuberização de *Dioscorea bulbifera* e *D. alata* cultivadas sob luz contínua; em outras espécies, ABA a 0,4  $\mu\text{M}$  inibiu a formação de calo induzido pelo ANA enquanto ainda promovia a iniciação e o desenvolvimento de tubérculos. No trabalho de JEAN e CAPPADOCIA (1992), o ABA não induziu a tuberização na batata-doce, mas houve tendência de aumento no número de tubérculos com o aumento na concentração de ABA no meio de cultura.

Muitos estudos têm pontuado o ABA como um inibidor do crescimento da raiz (Pilet et al., 1987, citados por HOOKER e THORPE, 1998); entretanto, alguns estudos mostram aumento no crescimento da raiz em presença do ABA, especialmente em baixas concentrações (Collet, 1970, citado por HOOKER e THORPE, 1998; YAMAGUCHI e STREET, 1977).

## **1.6. Auxinas**

As auxinas estão envolvidas no processo de expansão celular, e a interação entre citocininas e auxinas suporta o desenvolvimento tuberoso. Auxinas podem ser sintetizadas nas regiões meristemáticas e translocadas no floema. É sugerido que o AIA pode ser transportado das brotações das plantas de mandioca sob condições de dia curto para sítios abaixo dessas brotações, onde suprime a lignificação e promove a diferenciação celular, resultando na produção de células de xilema parenquimatoso no lugar de células de xilema lignificadas antes do armazenamento de carboidratos (WILLIAMS, 1974).

Segundo JEAN e CAPPADOCIA (1992), ocorreu aumento de 10 vezes no número de microtubérculos de batata-doce produzidos em altas concentrações de AIA (27 e 54  $\mu\text{M}$ ).

## 1.7. Etileno

A condição de crescimento do material vegetal na cultura de tecidos normalmente em frascos ou tubos fechados, para evitar contaminações e retardar o ressecamento do meio, é conhecida como a principal causa da acumulação dos compostos liberados nos recipientes. Desses compostos voláteis, um dos mais importantes é o etileno. O etileno acumulado pode ser benéfico, mas em muitos casos pode ser prejudicial para o crescimento e desenvolvimento da cultura. Um efeito conhecido da acumulação do etileno é a promoção da senescência e abscisão em folhas de culturas (RIGHETTI et al., 1990).

O etileno exógeno inibe o alongamento das raízes tão efetivamente quanto na elongação dos caules, indicando ser um mecanismo que funciona de forma idêntica. Raízes também sintetizam etileno, e é possível que concentrações supra-ótimas de auxina inibam o alongamento radicular através do aumento da biossíntese de etileno dos tecidos das raízes (Wreing et al., 1981, citados por MARIA, 1987).

Pouco é conhecido sobre o papel do etileno in vitro, porém ele tem sido produzido em cultivo de células de plantas (MACKENZIE e STREET, 1970), calos (HUXTER et al., 1979) e em fragmentos de tecido (BENDER e NEUMANN, 1978).

Segundo MARIA (1987), as auxinas são conhecidas por estimular a produção de etileno em um grande número de espécies.

Parece que a auxina estimula tanto a produção do etileno quanto a conversão da metionina para etileno em tecidos vegetativos. Durante a rota biossintética da metionina para etileno, o S-adenosilmetionina (SAM) e o ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) são produzidos antes da conversão final para o etileno. A temperatura ótima para produção de etileno pelo tecido das plantas é por volta de 30°C.

A quantidade de etileno produzida por um tecido vegetal depende de algumas condições ambientais (HUXTER et al., 1979). Field (1985), citado por MAGDALITA et al. (1997), observou que, freqüentemente, em temperaturas elevadas há aumento na produção de etileno, em relação às

condições normais. Maiores quantidades de etileno foram produzidas na luz, por cultura de células, do que no escuro (LA RUE e GAMBORG, 1971).

O efeito do etileno na cultura de tecidos pode ser avaliado pela adição de produtos químicos, os quais são conhecidos por reduzir (aminoetoxivinilglicina, AVG) ou promover a biossíntese (ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico, ACC) ou inibir a ação fisiológica do etileno (tiosulfato de prata, STS, BEYER, 1976). O nitrato de prata também é comumente usado como inibidor da ação fisiológica do etileno pela ação dos íons prata (CHI e PUA, 1989). O STS também tem sido usado para aumentar a regeneração em *Brassica juncea* (EAPEN e GEORGE, 1997). O real mecanismo de ação do etileno na regeneração *in vitro* ainda não foi totalmente elucidado.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

No presente trabalho foram utilizados os cultivares de mandioca Urubu e Mantiqueira fornecidos pelo Laboratório de Cultura de Tecidos da UFLA (Universidade Federal de Lavras) - MG. O material vegetal foi estabelecido *in vitro* a partir de meristemas, que foram obtidos colhendo-se brotações de ramos de mandioca plantadas em caixotes com areia esterilizada e mantidas em casa de vegetação com pulverizações semanais de fungicidas. Essas brotações foram levadas para o laboratório, onde foram lavadas em água corrente por 30 minutos e depois agitadas por 20 minutos em solução com 2,5% (p/v) de hipoclorito de sódio contendo 0,01% (v/v) de Tween-20. Imediatamente, foram lavadas por seis vezes em água deionizada e esterilizada; com auxílio de lupa, pinças e bisturi, retiraram-se os meristemas, transferindo-os para tubos de ensaio contendo meio de MS.

Todas as plântulas utilizadas nos experimentos foram obtidas desse material micropropagado e multiplicado, ou seja, durante a condução dos experimentos, foi feito um trabalho paralelo de manutenção de material para montagem dos experimentos.

A manutenção foi feita com seguidas repicagens do material em meio MS, de quatro em quatro semanas, em câmara de fluxo laminar; o material foi mantido na sala de crescimento a  $26 \pm 2^\circ\text{C}$ , sob fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa mínima de  $2.000 \text{ lux}$  ( $36 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ).

## **2.1. Multiplicação de plântulas de mandioca sob efeito da concentração de nitrato de amônio com e sem BAP**

Foram utilizados explantes de 1 cm de comprimento, com uma gema da mandioca do cultivar Urubu já estabelecida *in vitro*, obtida conforme o item 2. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, com 14 tratamentos, dispostos no esquema fatorial  $2 \times 7$  (presença e ausência de BAP x sete concentrações de nitrato de amônio), e 20 repetições. Os tratamentos são apresentados no Quadro 1.

Foi feita análise mineral do material vegetal, no Departamento de Fitotecnia da UFV, com digestão nítrico-perclórica, para P, K, Ca, Mg, S, Zn, Cu, Mn e Fe, e digestão sulfúrica, para análise de N. Após a digestão nítrico-perclórica e a sulfúrica, a concentração de cada nutriente foi determinada, conforme metodologia específica: para o K e P, por BRAGA e DEFELIPO (1974); para o S, por CHESNIN e YIEN (1950); para o N-orgânico, por JACKSON (1958); e para o Ca, Mg, Cu, Zn, Mn e Fe, por espectrofotometria de absorção atômica.

Os dados do número de folhas, do comprimento da parte aérea, do peso da matéria seca da parte aérea, do peso de matéria seca de raízes e do número de brotações foram submetidos à análise de variância. Foram testados modelos de regressão dessas características, em função das concentrações de  $\text{NH}_4^+$ , cuja escolha baseou-se no coeficiente de determinação e na significância dos coeficientes de regressão por meio do teste t, a 1% de probabilidade.

Quadro 1 - Tratamentos utilizados em plântulas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), cultivar Urubu, em que variaram concentrações de nitrato de amônio em 0, 1/8, 1/4, 1/2, 3/4, 1 e 2 vezes a concentração original do MS com e sem BAP (2 mg/L) e suas respectivas concentrações de nitrato, amônio, nitrogênio total e relação nitrato/amônio no meio

Sem BAP	Com BAP	NO <sub>3</sub>	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	N total	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> /NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>
mM					
T1-0	T8-0	18,8	0	18,80	-
T2-1/8	T9-1/8	21,38	2,57	23,95	8,32
T3-1/4	T10-1/4	23,95	5,15	29,10	4,65
T4-1/2	T11-1/2	29,10	10,30	39,40	2,82
T5-3/4	T12-3/4	34,25	15,45	49,40	2,21
T6-1	T13-1	39,40	20,60	60,00	1,91
T7-2	T14-2	60,08	41,20	120,00	1,46

Fonte: VIÇOSA, MINAS GERAIS (1999).

## 2.2. Crescimento de plântulas de mandioca *in vitro* sob efeito de diversos fotoperíodos

Os cultivares utilizados para este experimento foram Urubu e Mantiqueira, já estabelecidos *in vitro* pela metodologia descrita no item 2. As plântulas foram repicadas no comprimento de 1 cm, contendo uma gema. Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado, no esquema fatorial 2 x 3 (dois cultivares x três fotoperíodos: 0, 8 e 16 horas), com 32 repetições. Após cinco semanas, foram avaliados o número de folhas, o comprimento da parte aérea e das raízes e o peso de matéria seca total, além da análise mineral, segundo o item 2.1. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias dos cultivares foram comparadas por meio do teste F ( $P < 0,05$ ). Os resultados foram interpretados por meio de análise descritiva.

### **2.3. Crescimento de plântulas de mandioca sob efeito de filtro de luz de diversas cores**

O cultivar testado foi o Urubu, pela metodologia citada no item 2. As plântulas foram colocadas sob filtros de acrílicos vermelho, amarelo e azul, de 2 mm de espessura, e, ainda, envolvidas com papel-celofane da mesma tonalidade. O material ficou nessas condições por um período de seis semanas. As plântulas foram inoculadas em tubos de ensaio de 20 x 150 mm.

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, com quatro tratamentos (sem filtro, filtro vermelho, filtro amarelo e filtro azul) e 10 repetições. As características avaliadas foram o número de folhas e de raízes, o comprimento da parte aérea e das raízes e o peso de matéria seca total, além da análise mineral, conforme o item 2.1. Os dados foram analisados por meio de análise de variância e as médias comparadas por meio do teste de Student-Newman-Keuls, a 5% de probabilidade.

### **2.4. Crescimento de plântulas de mandioca sob efeito do ABA**

Foram utilizadas plântulas do cultivar Mantiqueira obtidas conforme o item 2, com aproximadamente 1 cm de comprimento, contendo uma folha, que foram inoculadas em meio MS. O delineamento estatístico foi o inteiramente casualizado, com quatro tratamentos (0; 0,1; 1,0; e 10,0 mg/L de ABA) e 10 repetições. Além da análise mineral do material vegetal, conforme o item 2.1, foram avaliados o número de folhas e de raízes, o comprimento da parte aérea e das raízes e o peso da matéria seca total. Os dados dessas características foram submetidos a análise de variância e análise de regressão, em função das concentrações de ABA, na qual foram escolhidos modelos, com base no coeficiente de determinação e na significância dos coeficientes de regressão por meio do teste t de Student, a 1% de probabilidade. Nos casos em que não foram obtidos bons ajustes para as regressões, os dados foram discutidos com base em análise descritiva.

## **2.5. Crescimento de plântulas de mandioca sob efeito do 2,4-D e picloram no claro e no escuro**

Discos foliares e segmentos de caule com aproximadamente 1 cm, do cultivar Mantiqueira, obtidos conforme o item 2, foram colocados em placas de Petri contendo meio MS com diferentes concentrações de 2,4-D e de picloram, no claro e no escuro, durante uma semana.

No estudo do efeito do 2,4-D, utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado, no esquema fatorial 2 x 2 x 3 (dois explantes: folha e caule x duas luminosidades: claro e escuro x três concentrações de 2,4-D: 0, 4,4 e 8,8 mg/L), com seis repetições em duplicata. Foram avaliados o peso de matéria seca total e alguma mudança morfogênica (qualquer modificação diferente de calos). Os dados de peso de matéria seca foram submetidos à análise de variância e os efeitos de explante e de luminosidade foram testados por meio do teste F, a 5% de probabilidade. O efeito das concentrações de 2,4-D foi interpretado por meio de análise descritiva.

O efeito do picloram no cultivar Mantiqueira foi estudado utilizando-se o delineamento inteiramente casualizado, com três tratamentos (0, 4,8 e 9,6 mg/L de picloram) e seis repetições em duplicata. Neste estudo, foram avaliados os percentuais de mudanças morfogênicas e de discos foliares queimados na presença e na ausência de luz, por meio de análise descritiva.

Para o cultivar Urubu, foi utilizado também o delineamento inteiramente casualizado, com cinco tratamentos (0; 2,2; 4,4; 6,6 e 8,8 mg/L de 2,4-D) e seis repetições em duplicata. Neste estudo, foi avaliado o peso de matéria seca total, cujos dados foram submetidos à análise de variância, seguindo a técnica de polinômios ortogonais para escolha do modelo de regressão em função das concentrações de 2,4-D. O percentual de mudança morfogênica dos discos foliares foi interpretado por meio de análise descritiva.

## **2.6. Crescimento das plântulas de mandioca sob efeito do STS e AgNO<sub>3</sub>**

Foram utilizados para este experimento os cultivares Mantiqueira e Urubu, obtidos conforme o item 2, inoculando-se caules com uma gema sem a folha, em meio básico MS com diferentes concentrações de STS (tiosulfato de prata) e de AgNO<sub>3</sub> (inibidores do etileno). O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, no esquema fatorial 2 x 4 (dois cultivares x quatro concentrações de inibidores de etileno), com cinco repetições. As concentrações de STS utilizadas foram 0, 20, 30 e 50 µM, e as de AgNO<sub>3</sub>, 0, 10, 30 e 50 µM. As características avaliadas foram o teor de clorofila (Chlorophyll meter SPA-502, que determina a quantidade de clorofila presente nas folhas, em mg/cm<sup>2</sup>), o número de folhas, o número de raízes, o comprimento da parte aérea e raiz e o peso da matéria seca. Os dados foram interpretados por meio de análise descritiva.

### **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **3.1. Multiplicação de plântulas de mandioca sob efeito da concentração de nitrato de amônio com e sem BAP**

As plântulas de mandioca submetidas a várias concentrações de nitrato de amônio, e, conseqüentemente, a várias concentrações de  $\text{NH}_4^+$  com e sem BAP, apresentaram resultados que podem ser observados nos Quadro 2, 3 e 4 e nas Figuras 1 e 2. Estes resultados mostram que houve diferença entre as diferentes concentrações. Não foi feita análise do peso da matéria seca de raízes para com BAP, pois a presença deste BAP inibiu a formação de raízes. Para o número de brotações sem BAP, também não foi feita análise, pois não houve formação de brotações, ou seja, o BAP, quando utilizado, foi indutor de brotações, apesar de, para mandioca, ele não ser um fator determinante para sua propagação, que pode ser feita por gemas dos caules. Observou-se que a interação BAP x concentração (Quadro 2) foi significativa ( $P < 0,01$ ). Estes resultados mostram que houve diferença nos resultados entre as concentrações de  $\text{NH}_4^+$  com e sem BAP.

No Quadro 3 é apresentado o resumo da análise de variância, o qual foi significativo, do peso da matéria seca de raízes sem BAP ( $P < 0,01$ ) e do número de brotações com BAP ( $P < 0,05$ ) nas concentrações de  $\text{NH}_4^+$ .

Quadro 2 - Resumo da análise de variância do número de folhas (NF), comprimento (CPA) e peso de matéria seca da parte aérea (PPA) de plântulas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), cultivar Urubu, na presença ou ausência de BAP e em vários níveis de amônio

FV	GL	Quadrado médio		
		NF	CPA	PPA
BAP	1	579,2214**	17.326,7200**	221.582,5000**
Concentrações de NH <sub>4</sub>	6	44,3234**	137,6483**	2.045,4450**
BAP x Concentrações	6	39,6861**	158,5300**	1.364,3980**
Resíduo	266	5,2307	25,7564	286,4676
C.V. (%)		46,09	53,92	31,36

Fonte: VIÇOSA, MINAS GERAIS (1999).

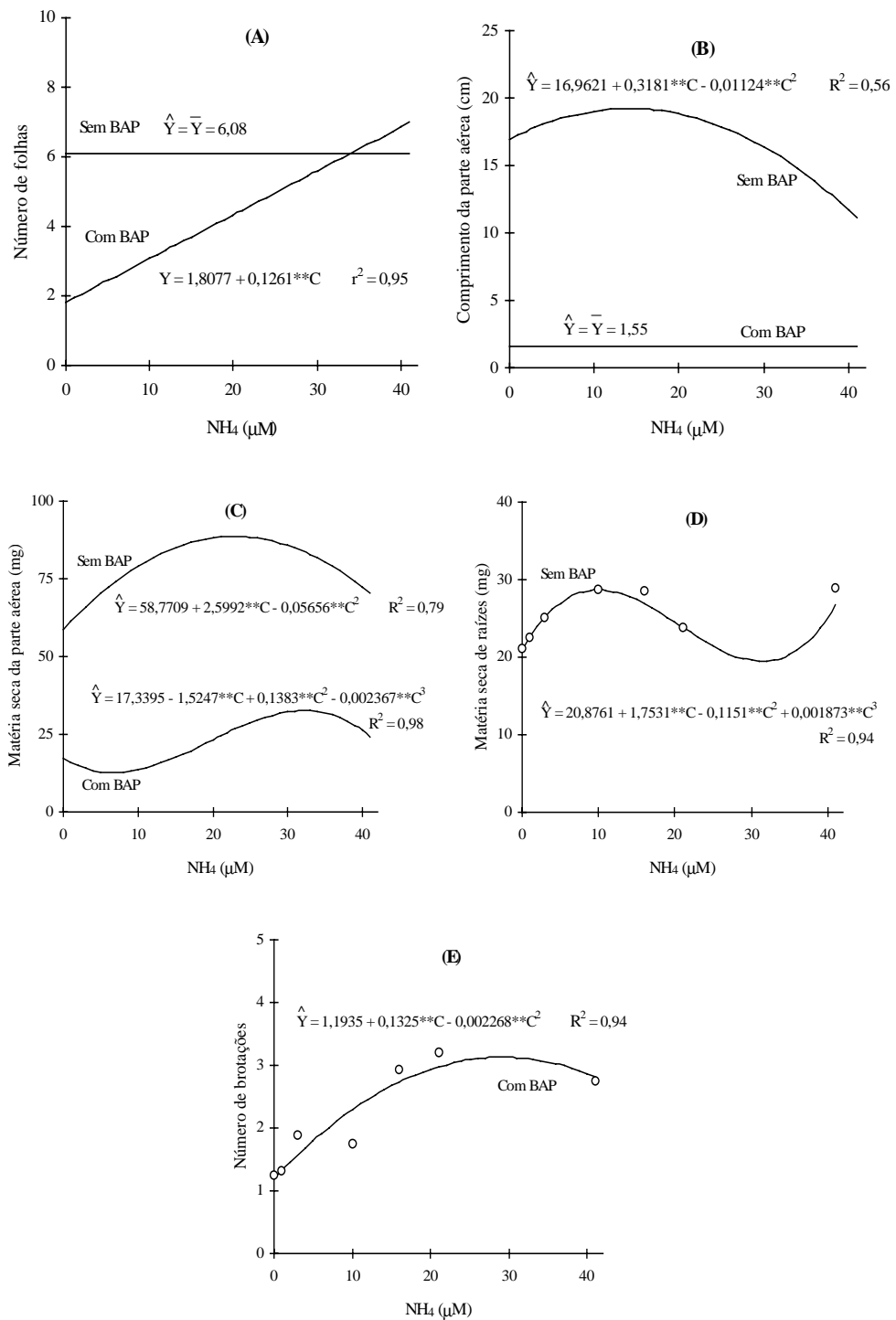
\*\* Significativo pelo teste F (P < 0,01). \* Significativo pelo teste F (P < 0,05).

Quadro 3 - Resumo da análise de variância do peso da matéria seca de raízes sem BAP (PR) e número de brotações, com BAP (NB) de plântulas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), cultivar Urubu, em vários níveis de amônio (Viçosa, Minas Gerais, 1999)

FV	GL	Quadrado médio	
		PR	NB
Concentrações de NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (µm)	6	174,2937*	11,6515**
Resíduo	133	66,5927	1,5793
C.V. (%)		31,36	57,45

Fonte: VIÇOSA, MINAS GERAIS (1999).

\*\* Significativo pelo teste F (P < 0,01).



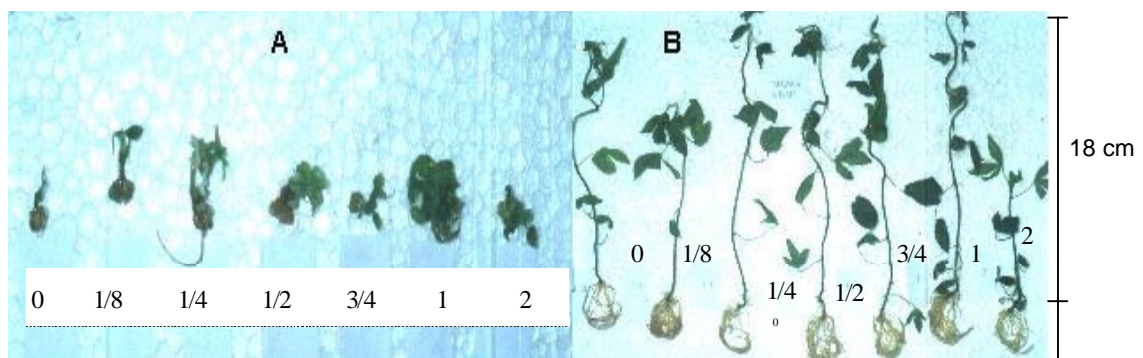
\*\* Significativo a 1% de probabilidade, pelo teste t.

Fonte: Viçosa, Minas Gerais (1999).

Figura 1 - Estimativa do número de folhas (A), do comprimento (B) e do peso da matéria seca da parte aérea (C), do peso da matéria seca de raízes (D) e do número de brotações (E) de plântulas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), cultivar Mantiqueira, em função de concentrações de  $\text{NH}_4^+$ , na presença e na ausência de BAP.

A análise de regressão para o número de folhas sem BAP nas diferentes concentrações de  $\text{NH}_4^+$  foi não-significativa, e a média foi de 6,08. Com BAP, o número de folhas aumentou com o aumento da concentração de nitrato de amônio; na concentração com 41,20 mM/L de  $\text{NH}_4^+$ , que equivale ao dobro da concentração inicial de nitrato de amônio utilizada pelo meio MS, o número de folhas foi de 7,00 (Figura 1 (A)).

Quanto ao comprimento da parte aérea, a concentração de amônio sem BAP que forneceu o valor máximo foi de 14,15 mM/L, com um comprimento da parte aérea de 19,11 cm. Com BAP, em qualquer concentração o valor do comprimento da parte aérea foi de 1,55 cm, que foi 91,9% inferior ao resultado obtido sem BAP (Figura 1 (B) e Figura 2). Observou-se que a presença do BAP induziu a formação de um calo na base, de onde emergiram as brotações de tamanho pequeno. Estes resultados foram semelhantes aos de SATO (1994), em que se testaram concentrações de  $\text{NH}_4^+$  com e sem BAP em gérbera.



Fonte: VIÇOSA, MINAS GERAIS (1999).

Figura 2 - Efeito das concentrações de nitrato de amônio de 0; 1/8; 1/4; 1/2; 3/4; 1; e 2 da concentração original com (A) e sem (B) BAP nas plântulas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), cultivar Urubu.

Para o peso da matéria seca da parte aérea sem BAP nas diferentes concentrações de amônio, a concentração que forneceu o maior peso foi a de 22,98 mM/L, com peso da matéria seca de 88,63 mg. Para peso da matéria seca da parte aérea com BAP, a concentração que forneceu o menor peso foi a de 6,64 mM/L, com 12,62 mg, e a concentração que forneceu o maior peso foi a de 36,30 mM/L, com 31,01 mg (Figura 1 (C)).

Para o peso da matéria seca de raízes sem BAP, a concentração em que se atingiu o menor peso foi a de 30,85 mM/L, com o peso de 20,41 mg, e a concentração em que ocorreu o peso máximo foi a de 10,11 mM/L, com o peso de 28,77 mg (Figura 1 (D)).

A concentração de amônio que produziu maior número de brotações foi a de 29,21 mM, com 3,12 brotações (Figura 1 (E)).

PODDAR et al. (1997) estudaram altas concentrações de nitrato de amônio como um substituto do ANA em *Eleusine coracana* (L.) e observaram que concentrações de nitrato de amônio de duas a seis vezes maiores do que a utilizada no meio MS podem favorecer a regeneração na ausência do regulador de crescimento. Em presença de altas concentrações de nitrato de amônio com o ANA, o meio de cultura tornou-se tóxico para cultura. Esses resultados coincidem com os deste trabalho quanto ao aspecto da grande interação entre o nitrato de amônio e o regulador de crescimento, seja ele uma auxina (ANA) ou citocinina (BAP).

Quanto à análise mineral sem BAP, o teor de nitrogênio cresceu; conforme se aumentou a concentração de nitrato de amônio no meio com BAP, foram observadas diminuição do teor de Ca, Mn e Cu e elevação nos valores de P e S. Por falta de material vegetal, não foi possível fazer a análise mineral de nitrogênio com BAP apenas para a testemunha; o interessante é que, com 0 de nitrato de amônio, a porcentagem de N foi de 6,2%, próxima do tratamento com dobro de nitrato de amônio, que foi de 6,3% (Quadro 4).

Segundo REUTER e ROBINSON (1988), os valores nutricionais adequados na mandioca cultivada no campo são: N 5,0-6,0%; P 0,3-0,5%; K 1,2-2,0%; S 0,3-0,4%; Ca 0,6-1,5%; Mg 0,25-0,5%; Cu 7-15 ppm; Zn 40-100 ppm; Mn 50 ppm (crítico); e Fe 60-200 ppm. Não se podem

comparar os resultados da análise mineral de plantas cultivadas no campo das cultivadas *in vitro*, mas podem ser feitas algumas inferências. Pelos resultados obtidos na análise mineral (Quadro 4), para o N, somente os tratamentos sem BAP e com 20,60 e 41,20 mM/L de  $\text{NH}_4^+$  estavam no nível adequado; para P, todos estavam no nível adequado; para o Ca, as concentrações de 5,15, 15,45 e 20,60 mM/L de amônio apresentaram resultados menores que o do trabalho desses autores citado; para o Mg nas concentrações de 5,15 e 20,60 mM/L, os valores apresentados do magnésio estavam menores do que o do trabalho; para o Cu, todas as concentrações apresentaram-se abaixo; para o Zn, todas as concentrações estavam acima e no nível tóxico; para o Fe, somente a concentração de 20,60 mM/L sem BAP foi tóxica; e para o Mn, somente as concentrações de 5,15 e 20,60 mM/L de  $\text{NH}_4^+$  não estavam no nível tóxico. Para os tratamentos com BAP, para o P, os tratamentos 0,0, 2,57 e 5,15 mM/L de amônio estavam acima do nível adequado; para o S, todos os tratamentos estavam abaixo do nível adequado; para o Ca, todos também estavam abaixo do nível adequado; para o Mg, todos os tratamentos estavam acima do nível adequado; para o Cu, todos os tratamentos estavam abaixo do nível adequado; em relação ao Zn, todos os tratamentos estavam acima do nível adequado e, ainda, segundo o autor, tóxicos; no Mn, apenas o tratamento com 0,0 mM/L de amônio estava tóxico; e para o Fe, apenas os tratamentos 0,0, 10,30 e 41,20 mM/L não eram tóxicos. Ao se compararem os resultados da análise mineral entre os valores encontrados neste trabalho e os de REUTER e ROBINSON (1988), esperava-se que os valores da análise mineral do material cultivado *in vitro* fossem bastante superiores, já que as plantas estão teoricamente em meio de cultura com todos os nutrientes em quantidades suficientes e muitas vezes considerado até acima do necessário. No entanto, apenas o resultado da análise mineral do Mn e do Zn do material *in vitro* foi muito acima em relação ao material de campo; estes resultados indicam que a planta possui mecanismos de absorção que a protegem de uma toxidez muito grande.

Quadro 4 - Análise mineral de plântulas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), cultivar Urubu, sob efeito de concentrações de amônio ( $\text{NH}_4^+$  mM/L) com e sem BAP

$\text{NH}_4^+$	N	P	K	Ca	Mg	S	Mn	Cu	Zn	Fe
	%						ppm			
<b>Sem BAP</b>										
0	2,01	0,44	3,30	0,77	0,36	0,55	406,8	3,5	158,8	106,5
2,57	2,40	0,39	3,18	0,66	0,29	0,48	335,0	1,9	140,5	128,8
5,15	2,76	0,33	2,13	0,43	0,20	0,44	209,5	1,3	141,3	240,6
10,30	3,52	0,31	3,18	0,59	0,24	0,51	315,5	1,7	147,8	202,0
15,45	4,18	0,31	2,86	0,50	0,24	0,42	255,5	1,5	150,5	212,3
20,60	4,99	0,39	2,36	0,35	0,16	0,48	159,3	2,2	144,8	267,5
41,20	6,32	0,35	3,24	0,72	0,28	0,50	331,0	1,5	157,0	167,4
<b>Com BAP</b>										
0	6,22	0,55	2,93	1,05	0,20	0,53	297,2	4,8	148,6	202,1
2,57	-	0,69	3,09	0,69	0,23	0,63	219,1	3,6	140,1	288,3
5,15	-	0,79	2,71	0,58	0,15	0,62	178,6	3,3	136,0	323,2
10,30	-	0,87	2,59	0,50	0,16	0,66	161,9	4,5	240,2	187,7
15,45	-	0,91	2,60	0,51	0,17	0,68	149,0	2,0	228,5	279,3
20,60	-	0,75	2,60	0,47	0,17	0,68	143,4	2,5	140,2	290,0
41,20	-	0,92	2,27	0,44	0,22	0,71	128,5	2,9	170,2	245,5

Fonte: VIÇOSA, MINAS GERAIS (1999).

### **3.2. Crescimento de plântulas de mandioca *in vitro* sob efeito de diversos fotoperíodos**

As plântulas de mandioca, cultivares Mantiqueira e Urubu, que foram submetidas a três fotoperíodos (0, 8 e 16 horas) mostraram resultados que podem ser observados nos Quadros 5, 6 e 7 e na Figura 3.

No Quadro 5, pode-se observar que houve interação significativa entre fotoperíodo e cultivar para o número de folhas, o comprimento da parte aérea e de raízes e o peso de matéria seca, ou seja, cada cultivar responde diferentemente ao fotoperíodo.

Para o número de folhas no fotoperíodo de 0 hora de luz, o cultivar Mantiqueira foi significativamente superior; no fotoperíodo de 8 horas, não houve diferença significativa entre os cultivares; e no fotoperíodo de 16 horas o cultivar Urubu foi superior. Pode-se inferir que o cultivar Mantiqueira responde melhor em situações de limite em relação ao fotoperíodo e que o cultivar Urubu tem aproveitamento melhor na presença de um fotoperíodo mais longo (Quadro 6). Quanto ao comprimento da parte aérea no fotoperíodo de 0 hora, o cultivar Urubu foi significativamente superior; não houve diferença com 8 horas de fotoperíodo entre os cultivares; e no fotoperíodo de 16 horas o cultivar Urubu foi superior. Em relação ao comprimento de raízes, no fotoperíodo de 0 hora o cultivar Urubu foi superior; no fotoperíodo de 8 horas o Mantiqueira foi superior; e no fotoperíodo de 16 horas não houve diferença significativa entre os cultivares. Para o peso da matéria seca, para todos os fotoperíodos o cultivar Urubu foi superior (Quadro 6).

Na Figura 3 (A) (número de folhas) e (B) (comprimento da parte aérea), pode-se observar que os cultivares Urubu e Mantiqueira se comportaram de maneira semelhante, apresentando as maiores médias no fotoperíodo de 8 horas. Já para o comprimento de raízes, o cultivar Mantiqueira obteve a maior média no fotoperíodo de 8 horas, enquanto o cultivar Urubu manteve-se estável nos três fotoperíodos (Figura 3 (C)); para o peso da matéria seca, o cultivar Mantiqueira também obteve o maior valor no fotoperíodo de 8 horas; para o cultivar Urubu, o peso da matéria

seca aumentou com o aumento do fotoperíodo (Figura 3 (D)). Esses resultados mostram uma certa tendência de o cultivar Urubu responder melhor com o aumento do fotoperíodo.

Quanto à análise mineral, para o cultivar Mantiqueira, os maiores valores para o P, Ca, Mn, Fe e Zn ocorreram no fotoperíodo de 16 horas. Apenas para o Mg o fotoperíodo de 8 horas forneceu o maior valor, e com fotoperíodo de 0 hora foi obtido o maior resultado quanto ao S e Cu (Quadro 7). Para o cultivar Urubu, apenas o Ca, Mg e Mn forneceram concentrações superiores no fotoperíodo de 16 horas. Quanto ao fotoperíodo de 8 horas, apenas o Fe apresentou o maior valor; os demais nutrientes (P, S, Cu e Zn) apresentaram valores elevados no fotoperíodo de 0 hora (Quadro 7). Esses resultados mostram, neste caso, que o teor de nutrientes não está relacionado com os maiores resultados obtidos quanto ao número de folhas, comprimento da parte aérea, comprimento de raízes e peso de matéria seca dos dois cultivares.

Quadro 5 - Resumo da análise de variância do número de folhas (NF), comprimento da parte aérea (CPA) e de raízes (CR) e peso de matéria seca (MS) de plântulas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), cultivares Mantiqueira e Urubu, em diferentes fotoperíodos

FV	GL	Quadrado médio			
		NF	CPA	CR	MS
Cultivar (C)	1	2,7435 <sup>ns</sup>	915,5635 <sup>**</sup>	0,0082 <sup>ns</sup>	0,062005 <sup>**</sup>
Fotoperíodo (F)	2	297,4798 <sup>**</sup>	1.019,9620 <sup>**</sup>	160,6856 <sup>**</sup>	0,029063 <sup>**</sup>
C x F	2	15,0450 <sup>**</sup>	100,4819 <sup>**</sup>	91,5958 <sup>**</sup>	0,020548 <sup>**</sup>
Resíduo	150	1,6932	20,4871	6,9172	0,000282
C.V. (%)		32,22	45,59	48,75	46,03

Fonte: VIÇOSA, MINAS GERAIS (1999).

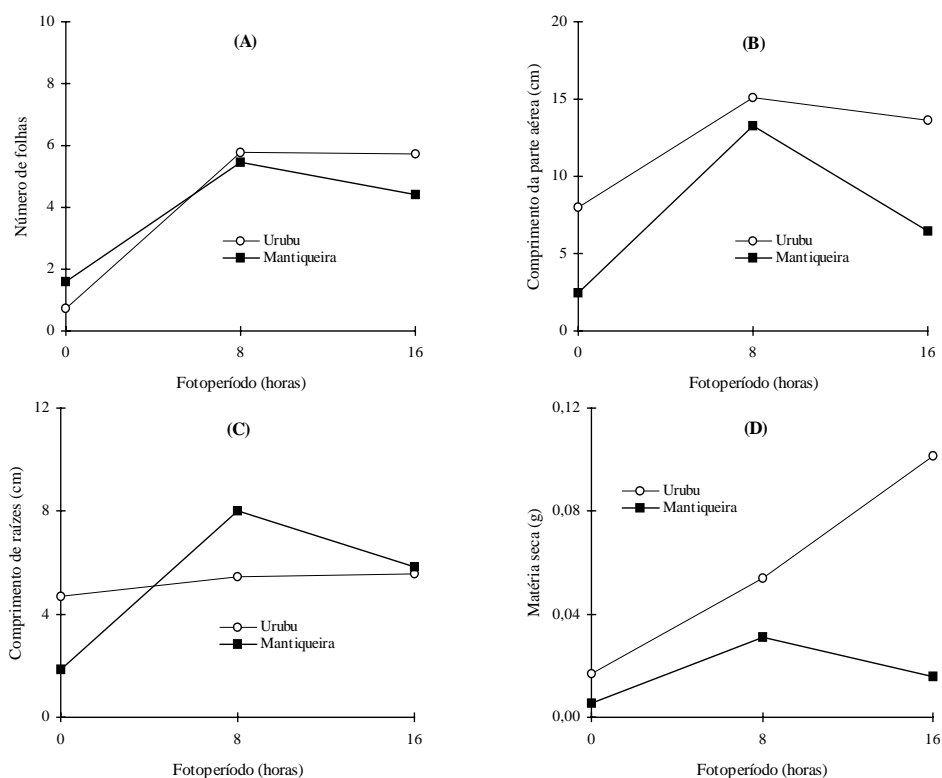
\*\* Significativo pelo teste F (P < 0,01). <sup>ns</sup> Não-significativo pelo teste F (P > 0,05).

Quadro 6 - Número médio de folhas (NF), comprimento da parte aérea (CPA) e de raízes (CR) e peso de matéria seca (MS) de plântulas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), cultivares Mantiqueira e Urubu, sob diferentes

Fotoperíodo	Cultivar	NF	CPA	CR	MS
horas			cm		g
0	Mantiqueira	1,58 a	2,50 b	1,88 b	0,0052 b
	Urubu	0,71 b	8,04 a	4,67 a	0,0168 a
8	Mantiqueira	5,44 a	13,27 a	8,03 a	0,0310 b
	Urubu	5,79 a	15,13 a	5,48 b	0,0538 a
16	Mantiqueira	4,43 b	6,45 b	5,83 a	0,0157 b
	Urubu	5,75 a	13,67 a	5,54 a	0,1017 a

Fonte: VIÇOSA, MINAS GERAIS (1999).

Em cada coluna e cada fotoperíodo, a difere de b pelo teste F ( $P < 0,05$ ).



Fonte: VIÇOSA, MINAS GERAIS (1999).

Figura 3 - Número médio de folhas (A), comprimento da parte aérea (B) e de raízes (C) e peso de matéria seca (D) de plântulas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), cultivares Mantiqueira e Urubu, em função do fotoperíodo.

Quadro 7 - Análise mineral de plântulas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), cultivares Mantiqueira e Urubu, sob efeito de três fotoperíodos (0, 8 e 16 horas)

Fotoperíodo	N	P	K	S	Ca	Mg	Mn	Fe	Cu	Zn
	%						ppm			
	Mantiqueira									
0	-	1,35	3,02	0,79	0,51	0,18	288,5	158,9	5,1	160,3
8	-	1,26	3,05	0,68	0,62	0,28	334,5	337,4	4,1	233,8
16	6,2	1,43	2,75	0,71	0,64	0,25	410,4	488,0	4,0	258,6
	Urubu									
0	-	1,47	2,49	0,69	0,49	0,22	184,1	184,6	8,5	388,3
8	6,0	0,74	2,48	0,65	0,56	0,24	240,8	220,2	3,2	218,0
16	4,6	0,43	2,48	0,54	0,60	0,25	297,8	176,2	2,4	178,5

Fonte: VIÇOSA, MINAS GERAIS (1999).

### 3.3. Crescimento de plântulas de mandioca sob efeito de filtro de luz de diversas cores

Houve diferença para o número e comprimento de raízes; para as demais características, número de folhas, comprimento da parte aérea e peso da matéria seca, não houve diferença significativa (Quadro 8). Pelo teste de médias, quanto ao número de raízes, os resultados dos tratamentos sem filtro e com filtro amarelo foram maiores; o tratamento com filtro azul apresentou resultado intermediário e o com filtro vermelho apresentou a menor média. Quanto ao comprimento das raízes, o tratamento sem filtro foi maior, aqueles com filtro amarelo e azul foram intermediários e o com filtro vermelho, novamente, foi menor (Quadro 9). Nos dois resultados, a testemunha apresentou a maior média, com diferença, para a média do resultado menor, de 97% quanto ao número de raízes e de 94% quanto ao comprimento de raízes. Sob o filtro amarelo, 50% das raízes apresentaram aspecto tuberoso, e no material sob filtro vermelho apenas 10% apresentaram aspecto tuberoso (Figura 4). Esses resultados mostram a influência dos filtros no processo de tuberização das raízes das plântulas de mandioca.

Quadro 8 - Resumo da análise de variância do número de folhas (NF) e de raízes (NR), comprimento da parte aérea (CPA) e de raízes (CR) e peso de matéria seca (MS) de plântulas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), cultivar Urubu, sob diferentes filtros (Viçosa, Minas Gerais, 1999)

FV	GL	Quadrado médio				
		NF	CPA	NR <sup>1/</sup>	CR	MS
Filtros	3	0,7583 <sup>ns</sup>	4,5976 <sup>ns</sup>	3,9086**	1,9087*	0,000391 <sup>ns</sup>
Resíduo	36	2,4083	3,1563	0,7520	0,4780	0,000137
C.V. (%)	.	52,16	70,57	101,49	131,48	47,74

Fonte: VIÇOSA, MINAS GERAIS (1999).

\*\* Significativo pelo teste F (P < 0,01). \* Significativo pelo teste F (P < 0,05). <sup>ns</sup> Não-significativo pelo teste F (P > 0,05).

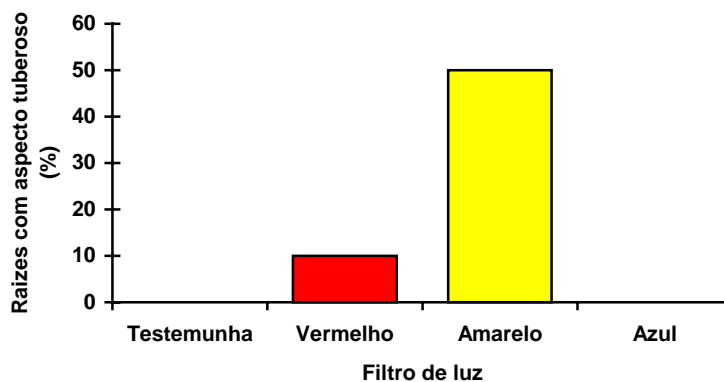
<sup>1/</sup> Valores transformados para  $\sqrt{x}$ .

Quadro 9 - Número médio de folhas (NF) e de raízes (NR), comprimento da parte aérea (CPA) e de raízes (CR) e peso de matéria seca (MS) de plântulas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), cultivar Urubu, sob diferentes filtros (Viçosa, Minas Gerais, 1999)

Filtro de luz	NF	CPA	NR	CR	MS
		cm		cm	g
Sem filtro	3,30 a	1,98 a	3,10 a	4,88 a	0,0322 a
Vermelho	2,80 a	3,24 a	0,10 b	0,10 b	0,0206 a
Amarelo	3,10 a	2,95 a	2,90 a	2,62 ab	0,0268 a
Azul	2,70 a	1,90 a	0,70 ab	0,28 ab	0,0183 a

Fonte: VIÇOSA, MINAS GERAIS (1999).

Em cada coluna, médias seguidas de pelo menos uma mesma letra não diferem entre si pelo teste de Student-Newman-Keuls (P > 0,05).



Fonte: VIÇOSA, MINAS GERAIS (1999).

Figura 4 - Porcentagem de raízes de plântulas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), cultivar Urubu, com aspecto tuberoso sob efeito dos filtros vermelho, amarelo e azul (Viçosa, Minas Gerais, 1999).

Para SATO (1994), o uso do filtro amarelo proporcionou maior crescimento das plântulas, maior concentração de nutrientes e menor porcentagem de plântulas vitrificadas. Quanto à análise mineral do material (Quadro 10), para cálcio e ferro, a testemunha apresentou os maiores resultados (0,86% e 572,79 ppm); para o cobre, o tratamento com filtro azul foi o maior resultado (11,72 ppm); e para zinco, o filtro vermelho apresentou a maior concentração (592,20 ppm). Em trabalho com gérbera (SATO, 1994), a testemunha sempre apresentou valores menores em relação ao tratamento com o filtro amarelo; no caso da mandioca, a testemunha (sem filtro), em alguns casos, apresentou valores maiores. Espécies diferentes respondem de maneira diferente quanto ao efeito dos filtros de luz.

Quadro 10 - Análise mineral de plântulas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), cultivar Urubu, sob efeito dos filtros vermelho, amarelo e azul

Filtro de luz	P	K	S	Ca	Mg	Mn	Fe	Cu	Zn
	%					ppm			
Sem filtro	0,88	2,24	0,40	0,86	0,22	283,12	572,79	4,10	240,54
Vermelho	1,21	2,99	0,50	0,61	0,19	219,67	392,90	5,55	592,20
Amarelo	1,10	2,35	0,40	0,62	0,19	292,09	178,06	5,36	354,59
Azul	0,93	2,81	0,53	0,68	0,16	218,75	246,09	11,72	158,20

Fonte: VIÇOSA, MINAS GERAIS (1999).

### 3.4. Crescimento de plântulas de mandioca sob efeito do ABA

Plântulas de mandioca que foram cultivadas sob diversas concentrações de ABA apresentaram resultados que podem ser observados nos Quadros 11, 12 e 13. O Quadro 11 apresenta o resumo da análise de variância, que indicou diferenças significativas ( $P < 0,01$ ), do número de folhas e de raízes, comprimento de parte aérea e raízes e peso de matéria seca de plântulas de mandioca, cultivar Mantiqueira, para todas as características avaliadas. Apesar de o ABA ter efeito significativo sobre as características, não foram obtidos bons ajustes quanto às equações de regressão; então, foi feita a análise descritiva dos resultados obtidos.

Pelo Quadro 12, pode-se observar que, para as características estudadas, o comportamento geral foi o mesmo; a partir da testemunha, houve decréscimo acentuado para os tratamentos onde se utilizaram concentrações de ABA, indicando o seu efeito inibitório. Da testemunha, para a concentração de 0,1 mg/L de ABA, por exemplo, houve diminuição bastante acentuada dos valores: 67% para o número de folhas, 70% para o número de raízes, 93% para o comprimento da parte aérea e 79% para o peso da matéria seca.

Quadro 11 - Resumo da análise de variância do número de folhas (NF) e de raízes (NR), comprimento da parte aérea (CPA) e de raízes (CR) e peso de matéria seca (MS) de plântulas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), cultivar Mantiqueira, sob diferentes concentrações de ABA

FV	GL	Quadrado médio				
		NF	CPA	NR <sup>1/</sup>	CR	MS
ABA	3	27,6583**	116,4696**	95,1157**	59,7018**	249.498,60**
Resíduo	36	1,3454	1,9283	2,7815	3,8275	6.505,67
CV (%)	.	49,53	51,34	32,18	49,25	45,67

Fonte: VIÇOSA, MINAS GERAIS (1999).

\*\* Significativo pelo teste F (P < 0,01).

Quadro 12 - Número médio de folhas (NF) e de raízes (NR), comprimento da parte aérea (CPA) e de raízes (CR) e peso de matéria seca (MS) de plântulas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), cultivar Mantiqueira, sob diferentes concentrações de ABA

Concentrações de ABA	NF	CPA	NR	CR	MS
mg/L		cm		cm	mg
0	4,50 ± 0,85	7,65 ± 1,93	9,30 ± 2,06	5,63 ± 2,14	403,30 ± 103,77
0,1	1,50 ± 1,08	0,53 ± 0,27	2,80 ± 1,23	5,44 ± 2,44	85,30 ± 24,89
1,0	2,70 ± 1,77	2,30 ± 1,97	5,80 ± 1,93	4,43 ± 2,18	163,50 ± 119,69
10,0l	0,67 ± 0,61	0,34 ± 0,11	2,83 ± 1,28	0,39 ± 0,17	54,33 ± 17,57

Fonte: VIÇOSA, MINAS GERAIS (1999).

Média ± desvio-padrão.

Todas as folhas deixadas antes da inoculação com ABA caíram em todos os tratamentos com ABA, indicando o efeito de abscisão do ABA. Apesar da elevação dos valores na concentração de 1,0 mg/L de ABA, todos os resultados, em todas as características avaliadas, foram inferiores em relação à testemunha, ou seja, o tratamento com ABA não foi benéfico para a mandioca do cultivar Mantiqueira.

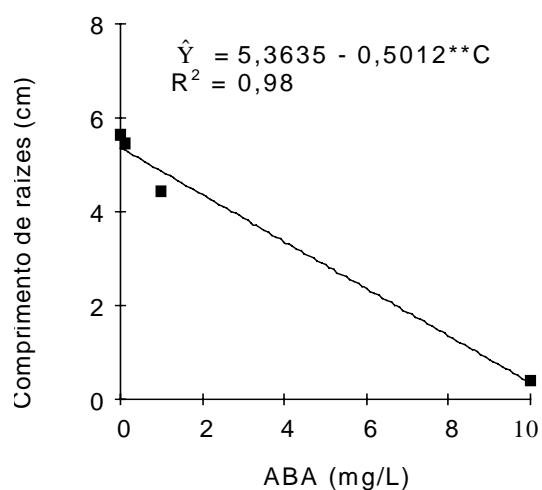
Na análise de regressão para comprimento de raízes da testemunha, para a maior concentração de ABA (10 mg/L), observou-se diminuição de 93% (403,30 mg da testemunha para 54,33 mg na concentração de 10,0 mg/L) (Figura 5).

Quanto à análise mineral para P, Ca, Mn e Fe, os valores tiveram uma queda a partir da testemunha até a concentração de 10 mg/L (Quadro 13). Para ferro na concentração de 0,1 mg/L (602,49 ppm), houve concentração bastante elevada em relação aos demais tratamentos (0-259,13 ppm, 1,0-185,87 ppm e 10-197,83 ppm de ferro); talvez esse dado tenha alguma relação com a queda brusca dos resultados das avaliações nesta concentração. Com o cobre, as maiores concentrações estiveram em torno da testemunha (5,07 ppm) e da concentração de 10 mg/L de ABA (4,35 ppm). Pôde-se observar, no geral, que houve tendência de diminuição da absorção dos nutrientes com o aumento da concentração de ABA. Esta tendência pode estar relacionada com o fechamento dos estômatos, em razão da presença do ABA, pois, diminuindo a transpiração, a absorção de água e, conseqüentemente, de nutrientes é interrompida, devido à falta de gradiente de pressão (TAIZ e ZEIGER, 1991). Para os demais minerais, não foi possível realizar as demais análises, por falta de material vegetal.

Quadro 13 - Análise mineral de plântulas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), cultivar Mantiqueira, sob efeito de diversas concentrações de ABA

ABA	P	K	Ca	Mg	S	Mn	Fe	Cu	Zn
mg/L	%				ppm				
0	0,86	2,51	0,46	0,25	0,61	349,99	259,13	5,07	227,2
0,1	0,63	2,48	0,35	0,22	-	202,10	602,49	2,08	222,9
1,0	0,63	2,38	0,47	0,19	0,35	258,69	185,87	2,60	210,9
10,0	0,37	2,44	0,33	-	0,40	206,50	198,83	4,35	97,8

Fonte: Viçosa, Minas Gerais (1999).



\*\* Significativo a 1% de probabilidade, pelo teste t.

Fonte: Viçosa, Minas Gerais (1999).

Figura 5 - Estimativa do comprimento de raízes de plântulas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), cultivar Mantiqueira, em função de concentrações de ABA.

### 3.5. Crescimento de plântulas de mandioca sob efeito do 2,4-D e picloram no claro e no escuro

O cultivar Urubu, nos tratamentos com 2,4-D (0; 2,2; 4,4; 6,6; e 8,8 mg/L), apresentou, na análise de variância, diferença significativa ( $P < 0,01$ ) quanto às diferentes concentrações (Quadro 14). Na concentração de 5,7 mg/L atingiu-se o maior peso de matéria seca da mandioca com 0,0371 g (Figura 6), sendo 24% superior em relação ao tratamento com 8,8 mg/L e 94% superior em relação à testemunha.

Com relação à modificação morfogênica, apenas na testemunha não houve modificação; nos demais, houve modificação morfogênica variando de 88,8% a 100% (Figura 7). As interações explante (folha/caule) x luminosidade (claro/escuro) x concentrações de 2,4-D foram significativas (Quadro 15). Sem o 2,4-D, no claro e no escuro, não houve diferença entre folha e caule quanto ao peso de matéria seca; na concentração de 4,4 mg/L, no claro, o caule apresentou peso maior do que o da folha, e no escuro não houve diferença significativa. Na concentração de 8,8 mg/L, somente no escuro houve diferença significativa, com o caule apresentando resultado maior em relação à folha. Apesar de ocorrer modificação morfogênica, não se observou embriogênese somática, como RAEMAKERS et al. (1993) obtiveram com meio MS suplementado com 4 mg/L de 2,4-D.

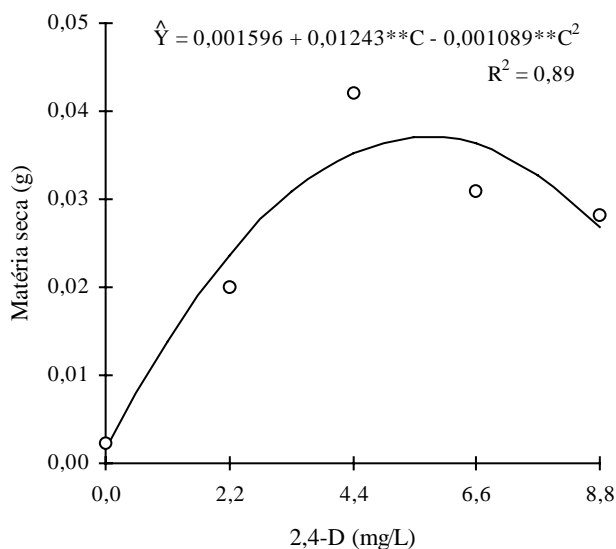
Na folha, em relação à testemunha, não houve diferença significativa entre o claro e o escuro; já a 4,4 mg/L, no escuro, o peso da matéria seca foi maior, e a 8,8 mg/L não houve diferença significativa entre o claro e o escuro (Quadro 16). A tendência da folha, no claro, foi aumentar o peso da matéria seca conforme aumentaram-se as concentrações de 2,4-D, e, no escuro, a partir da concentração de 4,4 mg/L, houve diminuição no peso da matéria seca (Figura 8 (A)). Pode-se observar que a presença de luz teve efeito no peso da matéria seca. LI et al. (1996) relataram a obtenção de embriões de plântulas de mandioca com 6 mg/L de 2,4-D no escuro. HANGARTER e STASINOPOULOS (1991b), estudando calos de *Lycopersicon esculentum* L., *Daucus carota* L. e *Arabidopsis thaliana* L., observaram redução no crescimento dos calos na presença de luz. Estes dois trabalhos também indicam a influência da luz no desenvolvimento de calos e formação de embriões ou modificação morfogênica, assim como foi observado nos resultados obtidos.

Quadro 14 - Resumo da análise de variância do peso da matéria seca de plântulas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), cultivar Urubu, sob diferentes concentrações de 2,4-D

FV	GL	Quadrado médio
Concentrações de 2,4-D	(4)	0,001311**
Linear	1	0,002350**
Quadrático	1	0,002333**
Cúbico	1	0,000011 <sup>ns</sup>
Falta de ajuste	1	0,000551 <sup>ns</sup>
Resíduo	25	0,000147
C.V. (%)	.	49,20

Fonte: Viçosa, Minas Gerais (1999).

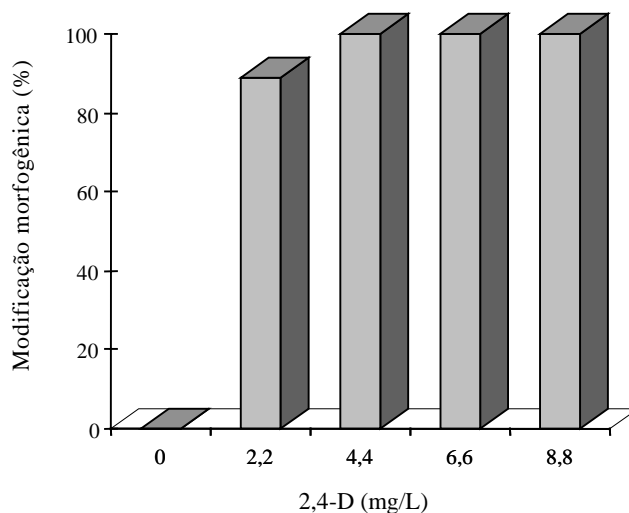
\*\* Significativo pelo teste F ( $P < 0,01$ ). <sup>ns</sup> Não-significativo pelo teste F ( $P > 0,05$ ).



\*\* Significativo a 1% de probabilidade, pelo teste t.

Fonte: Viçosa, Minas Gerais (1999).

Figura 6 - Estimativa do peso de matéria seca de plântulas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), cultivar Urubu, em função de concentrações de 2,4-D.



Fonte: Viçosa, Minas Gerais (1999).

Figura 7 - Percentual de modificação morfológica de discos foliares de plântulas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), cultivar Urubu, em função de concentrações de 2,4-D.

Quadro 15 - Resumo da análise de variância do peso da matéria seca de plântulas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), cultivar Mantiqueira, sob diferentes concentrações de 2,4-D, avaliada no claro e no escuro, em dois explantes (folha e caule)

FV	GL	Quadrado médio
Explantes (E)	1	0,000945**
Luz (L)	1	0,000080ns
Concentrações de 2,4-D	2	0,001472**
E x L	1	0,000063ns
E x C	2	0,000134*
L x C	2	0,000144*
E x L x C	2	0,000339**
Resíduo	60	0,000042
C.V. (%)	.	48,22

Fonte: Viçosa, Minas Gerais (1999).

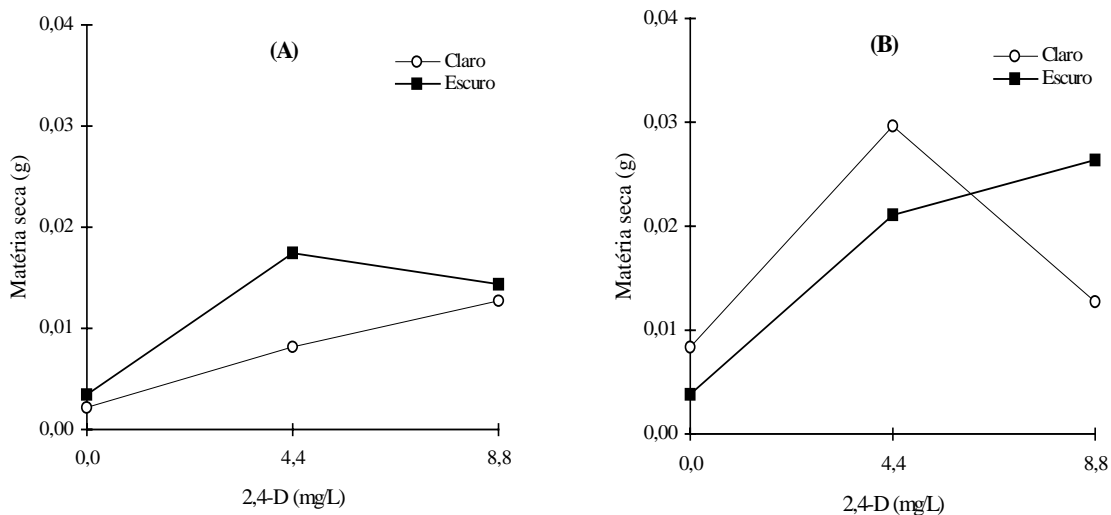
\*\* Significativo pelo teste F ( $P < 0,01$ ). \* Significativo pelo teste F ( $P < 0,05$ ). <sup>ns</sup> Não-significativo pelo teste F ( $P > 0,05$ ).

Quadro 16 - Peso da matéria seca média (g) de plântulas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), cultivar Mantiqueira, sob diferentes concentrações de 2,4-D, avaliada no claro e no escuro, em dois explantes (folha e caule)

Concentração de 2,4-D	Luz	Folha	Caule
mg/L			
0	claro	0,0022 Aa	0,0083 Aa
	escuro	0,0034 Aa	0,0038 Aa
4,4	claro	0,0082 Bb	0,0296 Aa
	escuro	0,0175 Aa	0,0211 Ab
8,8	claro	0,0128 Aa	0,0127 Ab
	escuro	0,0143 Ba	0,0264 Aa

Fonte: Viçosa, Minas Gerais (1999).

Em cada concentração de 2,4-D e cada luz, A difere de B pelo teste F ( $P < 0,05$ ). Em cada concentração de 2,4-D e cada explante, a difere de b pelo teste F ( $P < 0,05$ ).



Fonte: Viçosa, Minas Gerais (1999).

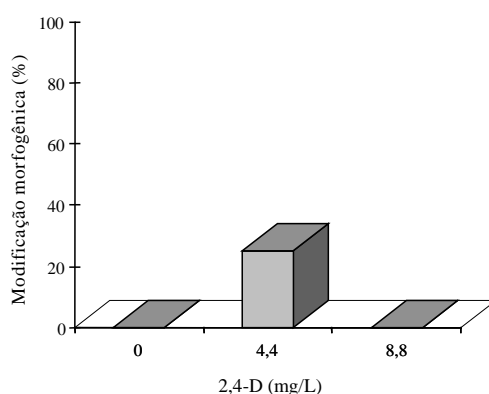
Figura 8 - Peso médio da matéria seca da folha (A) e do caule (B) de plântulas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), cultivar Mantiqueira, avaliada no claro e no escuro, em função de concentrações de 2,4-D.

No caule, na ausência de 2,4-D, não houve diferença entre o claro e o escuro; na concentração de 4,4 mg/L, no claro, o resultado foi significativamente maior, e na concentração de 8,8 mg/L o maior resultado foi para o escuro, ou seja, houve interação da concentração de 2,4-D e presença ou ausência de luz (Quadro 16). O peso da matéria seca do caule, no claro, diminuiu a partir da concentração de 4,4 mg/L, e no escuro o peso da matéria seca continuou a aumentar com o aumento da concentração de 2,4-D (Figura 8 (B)).

No cultivar Mantiqueira, folhas mantidas no claro não produziram mudança morfológica nos três tratamentos; no escuro, 25% de mudança morfológica ocorreu apenas na concentração de 4,4 mg/L; nas demais concentrações não houve nenhuma modificação (Figura 9). Quanto ao caule, em nenhum dos tratamentos houve resposta morfológica.

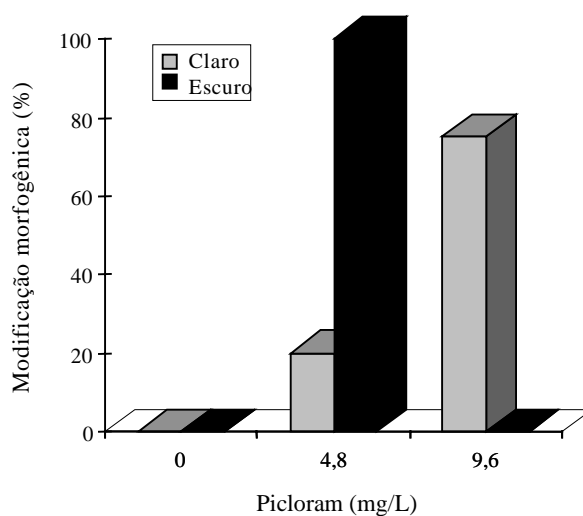
Quanto ao picloram, no cultivar Mantiqueira, nas concentrações de 0; 4,8; e 9,6 mg/L, as mudanças morfológicas das folhas, no claro, foram de 0%, 20% e 75%, respectivamente. No escuro, apenas a de 4,8 mg/L proporcionou mudança morfológica, que foi de 100% (Figuras 10 e 12). Para o uso do picloram, a presença da luz influenciou mais as mudanças morfológicas do que o escuro.

Ainda quanto ao picloram, com o cultivar Mantiqueira, em relação às folhas no claro a 0; 4,8; e 9,6 mg/L, observaram-se 100%, 46% e 25% de discos foliares queimados (Figuras 11 e 12).



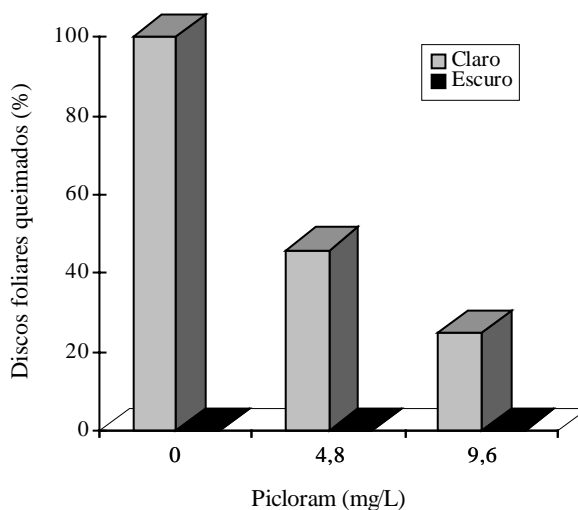
Fonte: Viçosa, Minas Gerais (1999).

Figura 9 - Percentual de modificação morfológica de discos foliares de plântulas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), cultivar Mantiqueira, em função de concentrações de 2,4-D, no claro e no escuro.



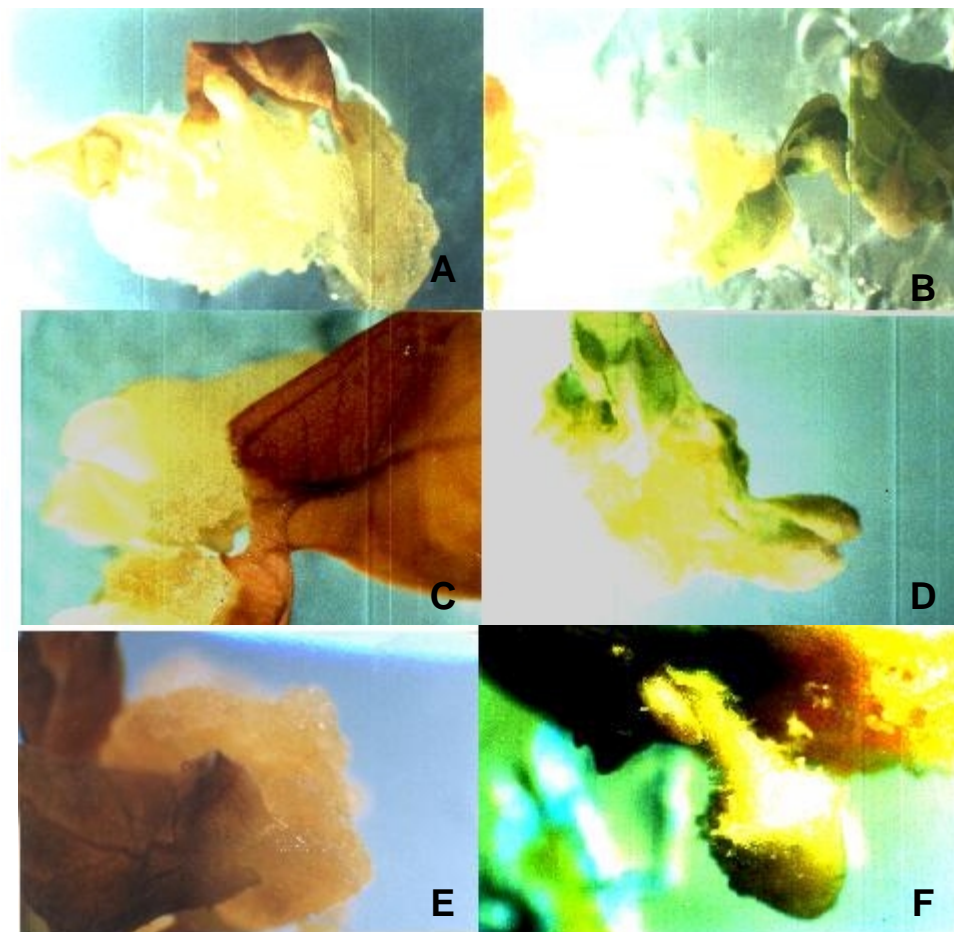
Fonte: Viçosa, Minas Gerais (1999).

Figura 10 - Percentual de modificação morfológica de discos foliares de plântulas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), cultivar Mantiqueira, em função de concentrações de picloram, no claro e no escuro.



Fonte: Viçosa, Minas Gerais (1999).

Figura 11 - Percentual de discos foliares queimados de plântulas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), cultivar Mantiqueira, em função de concentrações de picloram, no claro e no escuro.



Fonte: Viçosa, Minas Gerais (1999).

Figura 12 - Efeito do picloram (4,8 mg/L) no claro (A) e escuro (B); picloram (9,6 mg/L) no claro (C) e escuro (D); e 2,4-D (4,4 mg/L) no claro (E) e no escuro (F) em plântulas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), cultivar Mantiqueira.

### **3.6. Crescimento de plântulas de mandioca sob efeito do AgNO<sub>3</sub> e STS**

#### **3.6.1. AgNO<sub>3</sub>**

Para o teor médio de clorofila no caule de mandioca, os cultivares Mantiqueira e Urubu se comportaram de maneira diferente. No cultivar Mantiqueira, o teor de clorofila de 6,92 mg/cm<sup>2</sup>, na testemunha, decresceu para 3,29 mg/cm<sup>2</sup> na concentração de 10 µM/L de AgNO<sub>3</sub> e depois subiu para 8,51 mg/cm<sup>2</sup> a 30 µM/L de AgNO<sub>3</sub>, para depois novamente diminuir para 3,69 mg/cm<sup>2</sup> na concentração de 50 µM/L. O cultivar Urubu comportou-se de maneira diferente: de 1,30 mg/cm<sup>2</sup>, na testemunha, o teor de clorofila aumentou para 5,66 mg/cm<sup>2</sup> na concentração de 10 µM/L de AgNO<sub>3</sub> e decresceu para 2,62 mg/cm<sup>2</sup> na concentração de 30 µM/L de AgNO<sub>3</sub>, para depois aumentar para 9,88 mg/cm<sup>2</sup> na concentração de 50 µM/L, ou seja, o inverso do que ocorreu com o cultivar Mantiqueira (Quadro 17). Esses resultados foram muito contraditórios, sendo de difícil avaliação.

Quanto ao teor de clorofila nas folhas, os dois cultivares comportaram-se de maneira semelhante, com decréscimo acentuado da testemunha para as demais concentrações de AgNO<sub>3</sub>, indicando um efeito inibitório na produção de clorofila (Quadro 17).

Para o peso da matéria seca, assim como para o teor de clorofila, para os dois cultivares houve decréscimo da testemunha em todas as concentrações de AgNO<sub>3</sub> (Quadro 17).

Os dois cultivares também se comportaram semelhantemente em relação ao número de folhas, com decréscimo a partir da testemunha e leve aumento no número de folhas na concentração de 30 µM/L de AgNO<sub>3</sub>, para depois diminuir na concentração de 50 µM/L, resultados estes muito difíceis de serem avaliados.

O número médio de raízes foi diferente em cada cultivar; no Mantiqueira ele não se alterou, da testemunha à concentração superior. Já no cultivar Urubu houve diminuição do número médio de raízes da

testemunha para as demais concentrações, ou seja, para o cultivar Urubu o  $\text{AgNO}_3$  teve efeito inibitório quanto ao número de raízes.

O comprimento médio da parte aérea dos dois cultivares foi semelhante, com diminuição a partir da testemunha. Quanto ao comprimento médio de raízes, nos dois cultivares o comportamento foi semelhante: da testemunha para a concentração de  $10 \mu\text{M/L}$  de  $\text{AgNO}_3$  houve aumento, decrescendo até a concentração de  $50 \mu\text{M/L}$  (Quadro 18).

Com os resultados anteriormente descritos, podem-se observar diferenças no comportamento entre os cultivares, como em clorofila no caule e no número médio de raízes, que provavelmente se devem a diferenças entre os próprios cultivares.

Na maioria das características avaliadas, como teor médio de clorofila na folha, número médio de raízes, comprimento médio da parte aérea e peso de matéria seca, houve decréscimo a partir da testemunha para a concentração de  $10 \mu\text{M/L}$  de  $\text{AgNO}_3$ , que se manteve até  $50 \mu\text{M/L}$ , indicando certa fitotoxidez ao  $\text{AgNO}_3$  nessas concentrações; essa fitotoxidez pode ser notada visualmente ao se observarem as plântulas de cada tratamento (Figura 13). EAPEN e GEORGE (1997), em estudo de regeneração de segmentos de pedúnculo de *Brassica*, observaram que no meio com  $30 \mu\text{M}$  de  $\text{AgNO}_3$  houve aumento de frequência de regeneração com a utilização de BA ( $10 \mu\text{M}$ ) e ANA ( $0,5 \mu\text{M}$ ), ou seja, não houve sinal de fitotoxidez, resultado contrário ao obtido neste trabalho. Entretanto, algumas características avaliadas, como clorofila no caule, para Mantiqueira, e número médio de folhas, para os dois cultivares, nesta concentração de  $30 \mu\text{M}$   $\text{AgNO}_3$  apresentaram como resultados valores maiores que os da testemunha. Em termos gerais, o  $\text{AgNO}_3$  não teve efeito benéfico; pelo contrário, o efeito foi inibidor.

Quadro 17 - Teor médio de clorofila no caule e na folha e peso da matéria seca de plântulas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), cultivares Mantiqueira e Urubu, sob diferentes concentrações de AgNO<sub>3</sub>

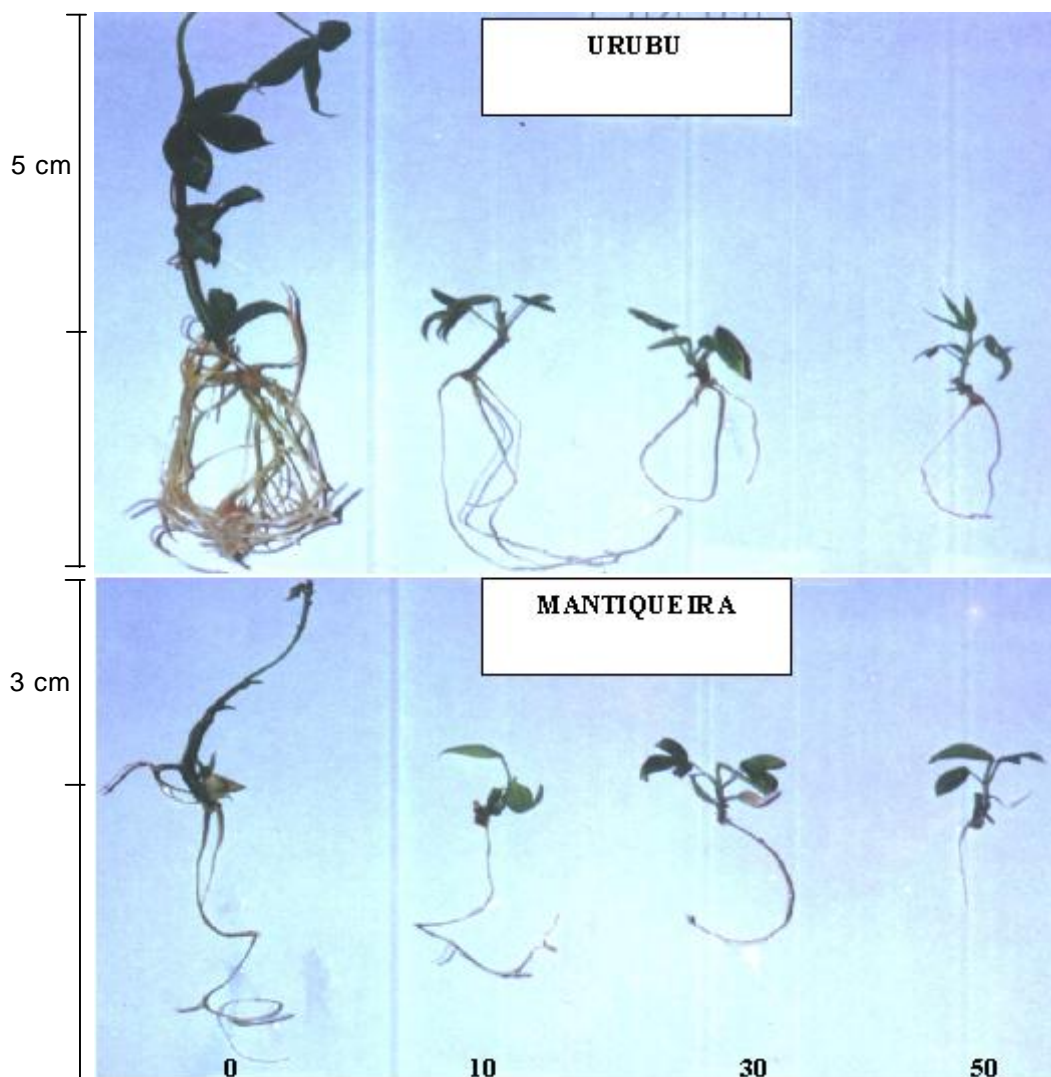
Concentrações de AgNO <sub>3</sub>	Cultivar	Clorofila no caule	Clorofila na folha	Matéria seca
μM		mg/cm <sup>2</sup>	mg/cm <sup>2</sup>	g
0	Mantiqueira	6,92 ± 3,75	28,82 ± 6,26	0,0498 ± 0,0870
	Urubu	1,30 ± 0,73	24,89 ± 11,59	0,0560 ± 0,0732
10	Mantiqueira	3,29 ± 1,24	16,01 ± 5,04	0,0104 ± 0,0079
	Urubu	5,66 ± 1,85	13,44 ± 5,92	0,0132 ± 0,0149
30	Mantiqueira	8,51 ± 2,51	10,82 ± 4,62	0,0153 ± 0,0091
	Urubu	2,62 ± 0,59	11,67 ± 3,63	0,0058 ± 0,0021
50	Mantiqueira	3,69 ± 1,64	18,55 ± 7,21	0,0070 ± 0,0027
	Urubu	9,88 ± 6,93	14,53 ± 6,74	0,0099 ± 0,0094

Fonte: Viçosa, Minas Gerais (1999).  
Média ± desvio-padrão.

Quadro 18 - Número médio de folhas e de raízes e comprimento médio da parte aérea e de raízes de plântulas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), cultivares Mantiqueira e Urubu, sob diferentes concentrações de AgNO<sub>3</sub>

Concentrações de AgNO <sub>3</sub>	Cultivar	Número médio		Comprimento médio	
		Folhas	Raízes	Parte aérea	Raízes
μM		cm			
0	Mantiqueira	2,80 ± 2,59	1,60 ± 1,34	2,80 ± 2,59	5,37 ± 5,22
	Urubu	3,80 ± 2,28	30,00 ± 52,19	5,12 ± 4,53	2,11 ± 1,67
10	Mantiqueira	2,60 ± 1,14	1,20 ± 0,45	0,94 ± 0,31	8,36 ± 4,61
	Urubu	2,80 ± 2,17	5,00 ± 7,38	1,48 ± 1,01	3,47 ± 2,84
30	Mantiqueira	4,40 ± 2,19	1,60 ± 0,89	1,84 ± 1,23	5,84 ± 1,78
	Urubu	3,20 ± 0,84	1,00 ± 1,00	0,80 ± 0,12	1,89 ± 2,35
50	Mantiqueira	3,60 ± 0,55	1,40 ± 1,67	1,42 ± 0,30	1,45 ± 1,32
	Urubu	2,40 ± 2,30	2,00 ± 1,58	0,84 ± 0,38	1,79 ± 2,23

Fonte: Viçosa, Minas Gerais (1999).  
Média ± desvio-padrão.



Fonte: Viçosa, Minas Gerais (1999).

Figura 13 - Plântulas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), cultivares Urubu e Mantiqueira, sob efeito de várias concentrações de AgNO<sub>3</sub> (0, 10, 30 e 50 µM/L).

### 3.6.2. STS

Para o teor médio de clorofila no caule, de plântulas de mandioca, cultivar Mantiqueira, houve diminuição a partir da testemunha. No cultivar Urubu houve aumento de 2,13 mg/cm<sup>2</sup> para 13,64 mg/cm<sup>2</sup> na concentração de 20 µM/L de STS, decrescendo a partir deste valor até 30 µM/L, mantendo-se estável com 5,99 mg/L até 50 µM/L (Quadro 19). Estes resultados indicam que há diferença de comportamento entre os cultivares.

Quanto ao teor médio de clorofila na folha de mandioca, os dois cultivares apresentaram comportamento semelhante até a concentração de 30 µM/L, ou seja, a concentração, em ambas, diminuiu da testemunha (38,13 mg/cm<sup>2</sup>-Urubu e 22,75 mg/cm<sup>2</sup>-Mantiqueira) até a concentração de 20 µM/L (16,35 mg/cm<sup>2</sup>-Urubu e 8,59 mg/cm<sup>2</sup>-Mantiqueira), mantendo-se até a concentração de 30 µM/L (17,36 mg/cm<sup>2</sup>-Urubu e 10,48 mg/cm<sup>2</sup>-Mantiqueira); a partir deste valor o teor de clorofila da folha do cultivar Urubu aumentou (34,94 mg/cm<sup>2</sup>), e o do cultivar Mantiqueira se manteve abaixo do valor apresentado pela testemunha (11,16 mg/cm<sup>2</sup>) (Quadro 19). Pode-se concluir que o STS foi inibitório para os cultivares Mantiqueira e Urubu. Os resultados apresentados foram de difícil avaliação.

Para o peso da matéria seca, os dois cultivares comportaram-se de maneira semelhante, em relação à testemunha; em todas as concentrações, os resultados obtidos foram menores (Quadro 18). Esses resultados indicam que, assim como o AgNO<sub>3</sub>, o STS teve efeito inibitório para as plântulas de mandioca.

Quanto ao número de folhas, o cultivar Urubu se manteve estável, com pouca variação nas quatro concentrações (4,6; 3,6; 3,2 e 4 folhas); no cultivar Mantiqueira houve decréscimo da testemunha (sete folhas) em relação às demais concentrações. Os dois cultivares comportaram-se de maneira semelhante para o número de raízes: houve diminuição do número de raízes em todas as concentrações, em relação à testemunha. Quanto ao comprimento médio da parte aérea, o cultivar Mantiqueira apresentou resultados menores em todas as concentrações, em relação à testemunha, e no cultivar Urubu a concentração de 50 µM (8,90 cm) apresentou resultado superior ao da testemunha (4,68 cm) (Quadro 20).

Quadro 19 - Teor médio de clorofila no caule e na folha e peso da matéria seca de plântulas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), cultivares Mantiqueira e Urubu, sob diferentes concentrações de STS

Concentrações de STS	Cultivar	Clorofila no caule	Clorofila na folha	Matéria seca
		mg/cm <sup>2</sup>		g
μM				
0	Mantiqueira	8,06 ± 1,84	22,75 ± 12,27	0,0553 ± 0,0477
	Urubu	2,13 ± 1,70	38,13 ± 5,17	0,1001 ± 0,0592
20	Mantiqueira	7,64 ± 2,40	8,59 ± 2,02	0,0054 ± 0,0009
	Urubu	13,64 ± 12,49	16,35 ± 4,99	0,0134 ± 0,0105
30	Mantiqueira	4,03 ± 1,64	10,48 ± 2,30	0,0076 ± 0,0048
	Urubu	5,65 ± 1,69	17,36 ± 3,58	0,0121 ± 0,0059
50	Mantiqueira	4,36 ± 3,21	11,16 ± 5,39	0,0164 ± 0,0330
	Urubu	5,99 ± 4,36	34,94 ± 7,63	0,0489 ± 0,0270

Fonte: Viçosa, Minas Gerais (1999).  
Média ± desvio-padrão.

Quadro 20 - Número médio de folhas e de raízes e comprimento médio da parte aérea e de raízes de plântulas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), cultivares Mantiqueira e Urubu, sob diferentes concentrações de STS

Concentrações de STS	Cultivar	Número médio		Comprimento médio	
		Folhas	Raízes	Parte aérea	Raízes
μM		cm			
0	Mantiqueira	7,00 ± 3,46	5,80 ± 4,09	8,50 ± 6,80	1,87 ± 1,49
	Urubu	4,60 ± 1,14	13,40 ± 7,54	4,68 ± 3,16	4,20 ± 7,71
20	Mantiqueira	2,80 ± 0,45	0,80 ± 1,30	1,10 ± 0,22	0,80 ± 1,30
	Urubu	3,60 ± 1,95	1,60 ± 2,07	1,30 ± 0,67	1,88 ± 2,14
30	Mantiqueira	3,60 ± 0,89	1,00 ± 0,00	1,20 ± 0,45	3,80 ± 2,84
	Urubu	3,20 ± 1,48	2,40 ± 0,89	1,40 ± 0,55	2,20 ± 1,67
50	Mantiqueira	3,60 ± 3,91	2,60 ± 4,22	2,64 ± 4,71	2,16 ± 2,97
	Urubu	4,00 ± 1,00	8,00 ± 3,67	8,90 ± 5,57	1,12 ± 0,54

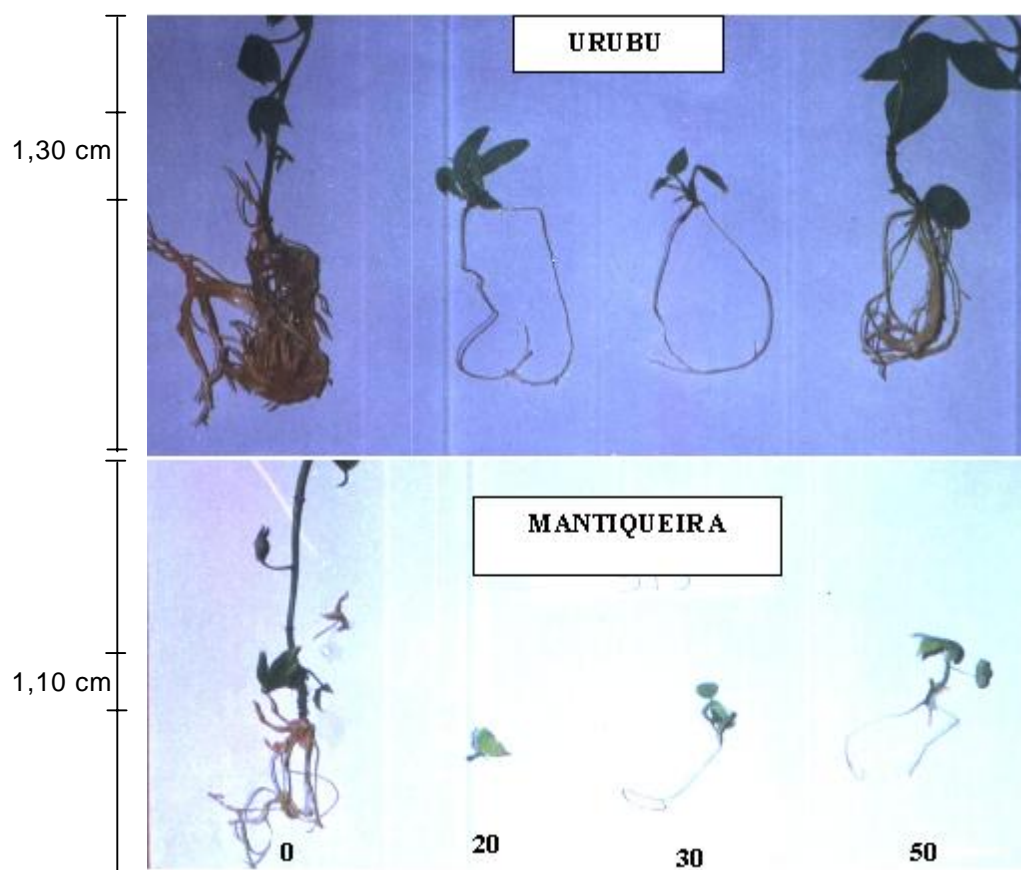
Fonte: Viçosa, Minas Gerais (1999).  
Média ± desvio-padrão.

No cultivar Mantiqueira, o comprimento das raízes da testemunha (1,87 cm) diminuiu na concentração de 20  $\mu\text{M/L}$  (0,80 cm) de STS, aumentando na concentração de 30  $\mu\text{M/L}$  (3,80 cm) e decrescendo novamente na concentração de 50  $\mu\text{M/L}$ ; no cultivar Urubu houve comportamento semelhante, apesar de o comprimento a 30  $\mu\text{M/L}$  não ultrapassar o da testemunha, como no Mantiqueira. Estes resultados também são de difícil análise, indicando, porém, que para o cultivar Urubu o STS teve efeito inibitório, já que os resultados das concentrações de STS foram inferiores aos da testemunha.

A partir da concentração de 20  $\mu\text{M/L}$ , as folhas do cultivar Mantiqueira apresentaram-se pequenas e cloróticas; na concentração de 50  $\mu\text{M/L}$ , algumas folhas eram grandes e com as bordas queimadas, mostrando certa toxidez, ocorrendo 50% de morte (Figura 14).

De maneira geral, pode-se observar que os dois cultivares comportaram-se de maneira semelhante, em relação a teor de clorofila no caule (menos na testemunha) e na folha, número de raízes, comprimento médio da parte aérea e peso da matéria seca.

O cultivar Urubu apresentou, a partir da concentração de 20  $\mu\text{M/L}$ , folhas miúdas e cloróticas; na concentração de 30  $\mu\text{M/L}$  observaram-se folhas secas e, na de 50  $\mu\text{M/L}$ , folhas rendilhadas e algumas folhas maiores, como no Mantiqueira (Figura 18). No trabalho de MAGDALITA et al. (1997) foram usadas, em plântulas de mamão, as concentrações de STS de 0,0; 0,3; 0,7; e 1,0  $\mu\text{M}$  e avaliaram-se crescimento em mg/semana, área foliar, senescência foliar e conteúdo de etileno. A 0,3  $\mu\text{M/L}$  de STS, houve acúmulo de peso seco e área foliar de 283 e 350%, respectivamente. Segundo esses autores, o efeito do STS foi um balanço do efeito tóxico e promotor sobre o desenvolvimento da cultura nodal. Para a mandioca, o STS não teve efeito tão positivo assim. Apenas para o cultivar Urubu a 50  $\mu\text{M/L}$  de STS o comprimento da parte aérea foi beneficiado, e suas folhas eram maiores, apesar de não terem sido feitas medições de área foliar. Talvez as concentrações utilizadas tenham sido muito altas para as plântulas de mandioca.



Fonte: Viçosa, Minas Gerais (1999).

Figura 14 - Efeito do STS (0, 20, 30 e 50  $\mu\text{M/L}$ ) em plântulas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), cultivares Mantiqueira e Urubu.

EAPEN e GEORGE (1997), em estudo de regeneração de segmentos de pedúnculo de *Brassica*, observaram que no meio com 30 µM/L de STS houve aumento de freqüência de regeneração com a utilização de BA (10 µM) e ANA (0,5 µM). Nos cultivares de mandioca, como foi estudado apenas o efeito no desenvolvimento *in vitro*, não se estudou seu efeito junto com outros reguladores, visando regeneração. Talvez futuros estudos nesse ramo elucidem questões que possam contribuir para a regeneração de material transformado de mandioca.

#### 4. RESUMO E CONCLUSÕES

O objetivo do presente trabalho foi estudar diversos aspectos na cultura de tecidos da mandioca, como: influência do nitrato de amônio; efeito dos reguladores 2,4-D, picloram e ABA; efeito de inibidores do etileno (STS e  $\text{AgNO}_3$ ); e efeito do fotoperíodo e da qualidade da luz através de filtros. Os trabalhos foram desenvolvidos no Laboratório de Testes de Progênie de Hortaliças da Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, Minas Gerais.

No estudo da influência do nitrato de amônio foram utilizados explantes de 1 cm de comprimento, com uma gema da mandioca do cultivar Mantiqueira já estabelecida *in vitro*. Foram avaliados 14 tratamentos, sete sem BAP variando a concentração de nitrato de amônio no meio de 0; 1/8; 1/4; 1/2; 3/4; 1; e 2 da concentração original e sete com BAP nas mesmas concentrações de nitrato de amônio no meio.

Na avaliação do efeito do fotoperíodo, os cultivares utilizados foram o Urubu e o Mantiqueira. O material foi submetido a três fotoperíodos: 0, 8 e 16 horas-luz; o meio de cultura utilizado foi o MS e a avaliação foi feita após um período de cinco semanas.

No estudo do ABA, foram utilizadas plântulas do cultivar Mantiqueira. Estas plântulas tinham por volta de 1 cm de comprimento e apresentavam

uma folha, que foram inoculadas em meio de cultura com meio base MS. Os tratamentos foram de 0; 0,1; 1,0; e 10 mg/L de ABA.

Para avaliar o efeito do 2,4-D e picloram, discos foliares e pedaços de caule com aproximadamente 1 cm de mandioca, cultivar Mantiqueira, foram colocados em placas de Petri contendo meio MS com concentrações de 2,4 D (0; 4,4; e 8,8 mg/L) e picloram (0; 4,8; e 9,6 mg/L), sendo uma parte no claro e outra no escuro, durante uma semana. Com o cultivar Urubu foram avaliadas apenas concentrações de 2,4-D (0; 2,2; 4,4; 6,6; e 8,8 mg/L) e somente com os discos foliares.

Para avaliar o efeito dos filtros de diversas cores, o cultivar testado foi o Urubu. As plântulas foram colocadas sob filtros vermelho, amarelo e azul, de 2 mm de espessura, e envolvidas com papel-celofane da mesma tonalidade. O material ficou nessas condições por um período de seis semanas. As plântulas foram inoculadas em tubos de ensaio de 20 x 150 mm, contendo 10 ml do meio MS.

Quanto ao efeito do STS e  $\text{AgNO}_3$ , foram utilizados os cultivares Mantiqueira e Urubu, sendo inoculados caules com uma gema sem a folha no meio básico MS com várias concentrações de STS (0, 20, 30 e 50  $\mu\text{M}$ ) e de  $\text{AgNO}_3$  (0, 10, 30 e 50  $\mu\text{M}$ ).

Nas condições em que os experimentos foram conduzidos, e pelos resultados obtidos, concluiu-se que:

- Com ou sem o BAP, com concentração abaixo da normalmente utilizada, com BAP a 1/2 (39,40 mM de N e relação  $\text{NO}_3^+/\text{NH}_4^-$  de 2,82) e sem BAP a partir de 1/4 (29,10 mM de N e relação  $\text{NO}_3^+/\text{NH}_4^-$  de 4,65), diminuem-se possíveis problemas de fitotoxidez.
- A concentração do 2,4-D de 4,4 mg/L e o tratamento no escuro favoreceram a maior indução de modificações morfogênicas; os discos foliares apresentaram respostas melhores que as dos caules. O picloram não seria recomendado, pois não apresentou nenhum tipo de modificação morfogênica.
- O ABA teve efeito inibitório nas plântulas de mandioca.

- O filtro amarelo pode ser o mais indicado para um estudo na área de enraizamento, por ter induzido um aspecto tuberoso.
- O fotoperíodo influenciou diferentemente, conforme o cultivar; para o Mantiqueira, ao se levar em conta o incremento de massa, o melhor fotoperíodo foi o de 8 h, enquanto para o Urubu o melhor foi o de 16 h.
- Tanto para o  $\text{AgNO}_3$  como para o STS, a resposta da mandioca não foi benéfica quanto ao desenvolvimento *in vitro*.

## **CAPÍTULO 2**

### **TRANSFORMAÇÃO DA MANDIOCA VIA *Agrobacterium rhizogenes***

#### **1. INTRODUÇÃO**

##### **1.1. Considerações gerais**

A mandioca é uma cultura de destaque na conjuntura socioeconômica mundial, em razão de sua importância como fonte de carboidrato e de sua elevada capacidade de adaptação. Esta cultura tem potencial de produção de 90 toneladas por hectare por ano (COCK, 1985), entretanto a produtividade média na África, na Indonésia e no Brasil é bem inferior (SOENARJO et al., 1987). Esta baixa produção tem sido atribuída à baixa fertilidade dos solos cultivados, deterioração das raízes e severa incidência de pragas e doenças. Em virtude de sua grande importância econômica e dos problemas encontrados no seu cultivo, vários programas de melhoramento tradicional em mandioca foram iniciados com sucesso (HERSHEY e JENNINGS, 1992). No entanto, o melhoramento genético clássico é dificultado por vários motivos, como: alta heterozigose, poliploidia, baixa fertilidade, baixa produção de sementes e baixo nível de germinação de sementes (CONCEIÇÃO, 1986). A engenharia genética pode complementar programas de melhoramento tradicionais em várias

áreas, como melhoramento para resistência a doenças virais (FAUQUET et al., 1992), alteração da qualidade do amido (SALEHUZZAMAN et al., 1993), redução do conteúdo de glucosídeos cianogênicos (KOCH et al., 1994) e aumento da vida pós-colheita (THRO et al., 1996). Um pré-requisito para engenharia genética da mandioca é a existência de um sistema de transformação viável. Existem diversos métodos de transformação, e a realizada por meio de *Agrobacterium* não requer equipamentos específicos, além de ter um custo menor. Tem-se enfatizado então a aplicação de modificação genética ou transformação para resolver alguns desses problemas (RAEMAKERS et al., 1993).

Tendo em vista a importância desta técnica, o presente trabalho objetivou a transformação da mandioca com o uso do *A. rhizogenes*, bem como sua regeneração e confirmação com análise isozimática.

## **1.2. Utilização do *Agrobacterium rhizogenes***

A biologia molecular permitiu a transferência via *Agrobacterium* de novos genes de origens distintas em diferentes espécies vegetais. A construção de vetores derivados do plasmídeo Ti ou Ri para introduzir genes exógenos em plantas foi possível graças a uma particularidade deste mecanismo de transferência genética natural: nenhum gene ou nenhuma seqüência de DNA presente no T-DNA, exceto suas bordas, são necessários ao seu processo de transferência e integração no genoma vegetal (HOOYKAAS e SCHILPEROORT, 1992). *A. tumefaciens* e *A. rhizogenes* são bactérias aeróbias gram-negativas, fitopatógenas do solo, pertencentes à família das Rhizobiaceae. *A. tumefaciens* é o agente causal da doença conhecida como galha-da-coroa (do inglês *crown gall*) e *A. rhizogenes* é o agente da síndrome da raiz-em-cabeleira (do inglês *hairy root*).

A faixa de hospedeiros de *Agrobacterium* é bastante ampla, abrangendo mais de 643 espécies vegetais, não incluindo a maioria das monocotiledôneas e gimnospermas. Além disso, existe grande diferença de susceptibilidade a *Agrobacterium* mesmo em variedades pertencentes a uma mesma espécie (BINNS, 1990). Portanto, a determinação da melhor

combinação patógeno-hospedeiro para uma dada espécie ou variedade é uma etapa inicial importante para o desenvolvimento de metodologias que visem à obtenção de plantas transgênicas através do sistema *Agrobacterium* (LACORTE e MANSUR, 1993).

A virulência das agrobactérias é causada pela presença, nas cepas patogênicas, de um plasmídio de alto peso molecular (150-250 Kd), chamado de Ti (para *Tumor-inducing*), em cepas de *A. tumefaciens*, e Ri (para *Root-inducing*), em cepas de *A. rhizogenes*. Na realidade, as agrobactérias são capazes de transferir parte deste plasmídio para o genoma das células da planta hospedeira, onde é integrado de forma estável. A parte transferida do plasmídio Ti ou Ri é chamada de T-DNA (do inglês *Transferred DNA*) e é delimitada por duas seqüências repetidas de 25 pb, conhecidas como bordas ou fronteiras direita e esquerda. A transferência e a integração do T-DNA são determinadas por, pelo menos, três elementos genéticos da bactéria: vários genes localizados no cromossoma bacteriano; o conjunto de genes de virulência (os genes *vir*) localizados no plasmídio Ti ou Ri; e as bordas que delimitam o T-DNA (HOOYKAAS e BEIJERSBERGEN, 1994). O sistema de infecção das agrobactérias representa, assim, uma situação única e nova na natureza: um elemento genético contendo informações complexas que permite a transferência de genes de um organismo procariota para um organismo eucariota superior.

Na síndrome da raiz-em-cabeleira obtida após infecção por *A. rhizogenes*, a expressão de vários oncogenes induz a produção de raízes secundárias no local da inoculação, provavelmente devido a um aumento da sensibilidade à auxina nas células transformadas (TEPFER, 1990). Entretanto, até hoje, o mecanismo de indução de raízes por *A. rhizogenes* ainda não foi completamente elucidado.

O T-DNA também possui genes que codificam enzimas responsáveis pela síntese de opinas, que são moléculas simples resultantes da condensação de um aminoácido com um carboidrato. As opinas produzidas pelas células transformadas servirão como fonte de energia (carbono e nitrogênio) exclusivamente para a agrobactéria parasita. O tipo de opina produzido e excretado pelas células do tumor é determinado pela bactéria

indutora do tumor (WINNANS, 1992). Assim, as cepas de *Agrobacterium* sp. são classificadas de acordo com o tipo de opina presente no tumor, como, por exemplo, cepas do tipo octopina, nopalina, agropina ou succinamopina.

ROCA et al. (1993) utilizaram para mandioca o sistema com *Agrobacterium* e biolística, sendo a atividade GUS detectada em embriões somáticos diferenciados de explantes selecionados por resistência à fosfinotricina depois do cocultivo com *A. tumefaciens*, carregando o plasmídeo pG1040. A expressão do gene uid A foi detectada no embrião primário somático 60 e 90 dias após o bombardeio com o mesmo plasmídeo construído. CABRAL et al. (1993) observaram a suscetibilidade de duas variedades de mandioca, MCol 22 e Mantiqueira, a 10 cepas selvagens de *A. tumefaciens*, indicando a potencialidade da utilização de vetores no sistema *Agrobacterium* para introduzir genes em mandioca. CAETANO (1993) utilizou o sistema *A. rhizogenes* e *A. tumefaciens* para estudo de metabólitos secundários, em que as culturas de órgãos transformados apresentam praticamente o mesmo comportamento de biossíntese em relação ao tecido da planta intacta, podendo produzir e acumular, na maioria das vezes, metabólitos secundários em até 25 vezes, comparando com a planta intacta.

O sistema *Agrobacterium* tem sido empregado com sucesso em espécies florestais como *Populus* sp. (BRASILEIRO et al., 1993) e *Eucaliptus* (MACHADO et al., 1993), bem como em espécies agrônômicas como *Nicotiana tabacum* (MARCELLINO et al., 1993; BORGES et al., 1993; MARTINEZ et al., 1992), *Arachis hypogaea* L. (FREITAS et al., 1993), *Ipomoea* sp. (GAMA et al., 1993) *Glycine max* (L.) Merr. (DROSTE et al., 1993), *Hordeum vulgare* L (ASSMANN et al., 1993) e *Solanum tuberosum* (FARINELLI et al., 1993; CHAND et al., 1989).

### **1.3. Fatores que influenciam a infecção do *Agrobacterium***

Alguns fatores interferem na infecção por *Agrobacterium*, como, por exemplo, o meio de cultura, devido a diferenças nos valores de pH e concentração salina. Quando a planta sofre alguma injúria, libera

compostos fenólicos que servirão como sinalizadores químicos. Estes compostos ativam a proteína transmembrana Vir A, uma histidina quinase, que autofosforila e transfere o grupamento fosfato para a Vir G. Esta irá ativar os genes da região Vir, liberando proteínas do tipo SSB (*single strand binding proteins*), endonucleases, polimerases e topoisomerases, as quais irão promover a duplicação, estabilização e transferência deste segmento do plasmídeo denominado T-DNA, que será incorporado ao genoma da planta (BRASILEIRO et al., 1993). Como a capacidade infectiva do *Agrobacterium* se restringe basicamente às dicotiledôneas e a algumas monocotiledôneas, a relação patógeno/hospedeiro também influencia o sucesso da transformação (CARDARELLI et al., 1987). Devido ao fato de o cultivo de células em suspensão ser muito difícil, foi desenvolvido um sistema de transformação baseado no cocultivo de *Agrobacterium* e discos foliares.

A idade do disco foliar também influencia a infecção, pois a infecção pela bactéria na indução de enraizamento é função do genótipo da planta, bem como do seu estado fisiológico. Além desses fatores, a auxina parece influenciar a indução de enraizamento, ou o aumento da sensibilidade das células transformadas a este regulador de crescimento (SPENA et al., 1987; MAUREL et al., 1994). A luz apresenta efeitos sobre órgãos e células que influenciam a taxa e duração da divisão celular, além do tamanho final das células (GABA et al., 1983). O aumento da radiação luminosa incrementa a atividade fotossintética, aumentando também a produção de hidratos de carbono e o teor de matéria seca, enquanto a deficiência luminosa proporciona alongamento celular, causando estiolamento sem alteração do teor de matéria seca (PANDURO, 1986); dessa maneira, o cocultivo no escuro pode favorecer uma maior infecção por parte das bactérias. LI et al. (1996) induziram a formação de brotações no escuro por 20 dias, e a indução de raiz foi na luz. Na indução de regeneração de gemas de mandioca, também utiliza-se um pré-tratamento no escuro (MUSSIO et al., 1998).

A seqüência de escuro e luz contínua também tem sido relatada como reguladora da embriogênese somática (KOTT e KASHA, 1984; PÉLISSIER et al., 1990). Em culturas de células de cevada (KOTT e KASHA, 1984), 41,9% dos embriões formados foram obtidos no escuro, enquanto na presença de luz somente 19,6% foram obtidos. Em girassol, a

exposição à luz no início do cultivo inibiu totalmente a embriogênese somática. Quando utilizada após cinco dias, a luz favoreceu a formação de pequenos pontos verdes, gemas túrgidas e alguns embriões. O efeito da luz pode ser interpretado como uma ação sobre o metabolismo de proteínas reservas, como mostrado em cotilédones de melão, onde ocorre a síntese de um polipeptídeo de 20-25 Kd no escuro e não ocorre na presença de luz (LESHEM et al., 1995). A luz ainda pode atuar sobre o metabolismo e a disponibilidade de açúcar dependente de energia, como foi observado em fumo, em que a diferenciação floral foi influenciada pela quantidade de luz e pelo suprimento de açúcar (COUSSON e TRAN THANH VAN, 1983). Outro exemplo da interação entre luz e açúcar foi encontrado em *Digitaria*, onde embriões somáticos diminuíram pela metade quando expostos à luz e à alta concentração de açúcar (9 %) (LE et al., 1997).

Em *Brassica napus*, o tratamento com luz também diminuiu a indução da embriogênese secundária em embriões derivados de micrósporo. Condições de escuro foram comparadas com baixa intensidade de luz ( $15-20 \text{ mm}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , 16 h de fotoperíodo) e com luz de alta intensidade e contínua ( $150-200 \text{ mm}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ). Foi verificado que 50%-60% dos embriões passaram para a segunda fase de embriogênese no escuro, e, na luz contínua, apenas 19-23% (NEHLIN et al., 1995).

#### **1.4. Seleção de transformantes**

Após a transformação, a viabilidade do sistema depende de uma boa seleção dos transformantes, de células ou tecidos transgênicos. É necessária, dessa maneira, a presença de um marcador genético que permita a seleção. Diversos são os genes utilizados para esta finalidade, os quais são chamados de “genes repórter”. Dentre estes, destacam-se o gene *nptII*, que confere resistência à canamicina; *Luc*, que produz luminescência na presença de oxiluciferina; e *GUS*, que pode ser analisado por métodos colorimétricos, bem como por métodos de fluorescência.

A canamicina inibe quase que completamente a organogênese de *Rubus*, causando branqueamento das folhas a 50 mg/L, apesar de não ter sido usado o gene *nptII* como marcador genético (GRAHAM et al., 1990).

### 1.5. Regeneração

A expressão da morfogênese por células totipotentes ou competentes pode ocorrer através de dois padrões básicos: organogênese e embriogênese somática. O primeiro padrão manifesta-se pela formação de uma estrutura unipolar ligada ao tecido matriz, ao passo que no segundo forma-se uma estrutura bipolar integrada em um único eixo (KOHLENBACH, 1976). Enquanto uma planta pode desenvolver-se diretamente a partir de um embrião somático, a regeneração via organogênese requer que um eixo caulinar desenvolvido a partir de uma gema forme raízes adventícias ou seja enraizado após sua separação e transferência para novo meio.

As seqüências organogenéticas em sistemas experimentais *in vitro* podem ocorrer direta ou indiretamente. No primeiro caso, a partir de um explante primário há a formação de órgão; no outro esquema, pode ocorrer a partir do explante primário com a formação de um meristemóide e posteriormente um sistema de órgãos, como um ramo ou uma flor (HICKS, 1980). No modelo indireto existem seqüências envolvendo um estágio intermediário de calo entre o explante primário e o meristemóide.

A obtenção de plantas inteiras através de embriões somáticos induzidos *in vitro* é mais uma demonstração da persistência da totipotência nas células de plantas superiores. De maneira geral, a formação de estruturas embrionárias bipolares inicia-se com a dediferenciação dos tecidos do explante e progride através de seqüências idênticas àquelas verificadas para a organogênese (REINERT et al., 1977).

Há pelo menos duas categorias distintas de embriogênese que ocorrem *in vitro*. A primeira corresponde ao modelo direto, no qual embriões somáticos originam-se dos tecidos sem a formação de calos. A segunda categoria relaciona-se com um modelo de desenvolvimento em que há um estágio intermediário de calo e é chamada de embriogênese indireta.

A morfogênese, na maior parte dos sistemas experimentais *in vitro*, é dependente da utilização de fitorreguladores. Certos reguladores de crescimento são fatores importantes para expressão da citodiferenciação e da morfogênese em sistemas *in vitro*.

Uma vez transformada, é necessária uma eficiente regeneração, que pode ser obtida através da embriogênese somática (RAEMAKERS et al., 1993). A embriogênese somática foi obtida através de inoculação de folhas de explantes de mandioca cultivados *in vitro*, sendo os melhores resultados obtidos quando se utilizou o meio MS suplementado com 4 mg/L de 2,4-D, na proporção de 20 mL/embrião (RAEMAKERS et al., 1993). Estes autores observaram também que embriões fragmentados produzem mais; do 1º para o 2º ciclo são necessários 21 dias, e do 2º para o 3º ciclo, sete dias, para a produção dobrar. A regeneração foi automática, com 0,1 mg/L de BAP no MS. ESKES et al. (1994) e PARKE (1978) mostraram que açúcar, auxinas e citocininas são fatores importantes na formação e no crescimento do calos.

A partir da raiz da mandioca, PRABHUDESAI e NARAYANASWAMY (1975) obtiveram formação de calos sem teor de HCN, usando 5 ppm de 2,4-D; apesar de não regenerar plantas, este autor cita a possibilidade de obtenção de plantas livres de HCN. LI et al. (1996) obtiveram embriões de plântulas de mandioca transformada utilizando 6 mg/L de 2,4-D no escuro. SHAHIN e SHEPARD (1980), na multiplicação de calos, obtiveram melhor resultado com 0,5 mg/L de BAP, 0,1 mg/L de ANA, 0,25% de sacarose e 2,46% de manitol; para regeneração dos calos, o meio utilizado foi 0,04 mg/L de BAP, 0,25 mg/L de AIA e 0,014 mg/L de GA<sub>3</sub>, depois de passar oito dias no meio com 10 mg/l de 2,4-D e 1 µM de kinetina.

## **1.6. Isozimas**

Os primeiros marcadores genéticos utilizados foram características morfológicas. Entretanto, os marcadores morfológicos freqüentemente são controlados por genes dominantes, não permitindo distinguir plantas heterozigotas. Marcadores morfológicos, como a presença de pigmentos

nas flores ou características de frutos e sementes, são expressos somente na planta adulta, não sendo práticos quando se trabalha com espécies de ciclo de vida longo. Marcadores genéticos bioquímicos e moleculares, além de serem identificáveis em qualquer fase do desenvolvimento da planta, não interferem no processo biológico que se deseja estudar. Por definição, marcadores bioquímicos são produtos da expressão de genes (proteínas ou compostos secundários). Marcadores moleculares derivam da análise do polimorfismo presente no próprio DNA.

As isozimas são diferentes formas moleculares de uma enzima catalisando a mesma reação na célula. Quando as isozimas são controladas por alelos de um único *loco*, elas são chamadas de aloenzimas. Estas representam a conseqüência bioquímica da substituição, deleção ou adição de um ou mais aminoácidos no polipeptídeo, afetando a sua carga elétrica e, conseqüentemente, a sua mobilidade durante a eletroforese. A mobilidade da molécula através do gel depende também do seu peso molecular e da sua conformação. Após a separação das isozimas por eletroforese, elas são identificadas por meio de reações químicas baseadas em suas atividades catalíticas específicas. Nesse processo, são fornecidos os substratos e os co-fatores necessários à reação da enzima *in vitro*, além de compostos que, por meio de uma reação secundária, formam produtos coloridos e insolúveis que permitem identificar exatamente a sua posição no gel. O conjunto de bandas coloridas que uma enzima forma no gel é denominado zimograma. Quando se deseja apenas distinguir indivíduos ou clones entre si, o conjunto de bandas produzido no zimograma pode ser suficientemente informativo. Nesse caso, o conjunto de isozimas representa um fenótipo particular (ALFENAS e BRUNE, 1998).

A análise isozimática tem auxiliado o estudo dos sistemas de transformação, a exemplo da caracterização de raízes transformadas de leguminosas forrageiras por *A. rhizogenes*; raízes, explantes e protoplastos de *Pisum sativum* transformados por linhagens de *A. tumefaciens* e *A. rhizogenes*; e fragmentos de caule de batata doce transformado por *A. rhizogenes* (DOBIGNY et al., 1996), em análises de uniformidade das plantas regeneradas via embriogênese somática de mandioca (MUSSIO et al., 1998), gengibre (ARIMURA, 1997), batata-doce (ALVES et al., 1994).

Em mandioca, a análise de isozimas é muito útil para caracterização de cultivares (SALES FILHO, 1991), para verificação da ocorrência de mutações somáticas e divergência genética (BORSOI FILHO, 1995).

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

No presente trabalho foram utilizados dois cultivares de mandioca (Urubu e Mantiqueira) fornecidos pelo Laboratório de Cultura de Tecidos da UFLA (Universidade Federal de Lavras) - MG.

O material vegetal foi estabelecido *in vitro* a partir de meristemas, que foram obtidos colhendo-se brotações de ramos de mandioca plantadas em caixotes com areia esterilizada e mantidas em casa de vegetação com pulverizações semanais de fungicidas. Essas brotações foram levadas para o laboratório, onde foram lavadas em água corrente por 30 minutos e depois agitadas por 20 minutos em solução com 2,5% (p/v) de hipoclorito de sódio contendo 0,01% (v/v) de Tween-20. Imediatamente, foram lavadas seis vezes em água deionizada e esterilizada e, com auxílio de lupa, pinças e bisturi, retiraram-se os meristemas, e transferindo-os para tubos de ensaio contendo meio MS.

A bactéria *A. rhizogenes* R1601 foi cedida pelo Department of Plant and Life Science da Universidade de Nottingham-UK, na Inglaterra.

A bactéria utilizada pertence a uma linhagem do tipo agropina, originária de *A. rhizogenes* A4, contendo o plasmídio pRiA4b. Este plasmídio possui o gene quimérico *nptII* (Neomicina fosfotransferase), que confere resistência à canamicina, co-integrado ao fragmento 21 de HindIII e pTVYK291 em trans, conferindo um fenótipo de supervirulência (PYTHOUD et al., 1987).

As plântulas de mandioca já estabelecidas *in vitro* foram mantidas em manutenção em meio MS em uma sala de crescimento a  $\pm 26^{\circ}\text{C}$ , sob fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa mínima de 2.000 lux ( $36 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ).

As bactérias foram cultivadas em meio APM (PYTHOUD et al., 1987). Para inoculação, elas foram ativadas em meio líquido APM sob agitação de 150 rpm, a  $28^{\circ}\text{C}$ , por 12 horas, até atingirem uma concentração celular de aproximadamente  $5 \times 10^8$  células/mL. Daí, foram centrifugadas e ressuspendidas em meio MS líquido e utilizadas para o cocultivo com os discos foliares de mandioca.

### **2.1. Efeito da canamicina**

Este experimento foi realizado com o objetivo de se determinar um meio seletivo para obtenção de transformantes quiméricos. Neste trabalho, utilizou-se o cultivar Urubu, obtido conforme o item 2 e com, em média, quatro semanas de idade. Essas plântulas foram repicadas em pequenos toletes sem folhas com aproximadamente 1 cm e contendo uma gema lateral. Esses toletes foram transferidos para os tratamentos com 11 níveis de canamicina (0,0; 100; 200; 300; 400; 500; 600; 700; 800; 900; e 1.000 mg/L), com meio básico sólido MS. Eles foram mantidos em sala de crescimento à temperatura de  $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , com fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa média de  $24 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ .

Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado, com 11 níveis de canamicina (0,0; 100; 200; 300; 400; 500; 600; 700; 800; 900; e 1.000 mg/L), com 14 repetições. As características avaliadas após 30 dias foram o número de folhas, o comprimento da parte aérea, o número e o comprimento de raízes, o peso de matéria seca e os aspectos visuais (cor da folha do caule).

Os dados de número de folhas, comprimento da parte aérea e peso da matéria seca foram submetidos à análise de variância e testados modelos de regressão, em função dos níveis de canamicina. A escolha do melhor modelo de regressão baseou-se no maior coeficiente de determinação ( $R^2$ ) e na significância dos coeficientes de regressão por meio do teste t de Student em nível de 1% de probabilidade.

## **2.2. Co-cultivo de discos foliares velhos e novos na presença e ausência de luz**

Discos foliares do cultivar Urubu, obtidos conforme item 2, foram testados com o objetivo de avaliar o efeito da presença ou ausência da luz no período de cocultivo de discos foliares velhos e novos em meio MS líquido com *A. rhizogenes*, para uma melhor condição de infecção, visando à produção de transformantes.

Os discos foliares de folhas velhas (com oito semanas) e novas (com quatro semanas) foram removidos assepticamente e colocados em placas de Petri contendo 10 ml de meio MS líquido, com a face abaxial voltada para cima. Esta face foi ferida com um bisturi cirúrgico antes do cocultivo com a bactéria. Após uma semana, as folhas foram transferidas para um outro meio MS sólido contendo 50 mg/L de canamicina, 500 mg/L de claforam e 10 mg/L de BAP, para eliminar as bactérias e permitir o desenvolvimento de calos de células supostamente transformadas pela bactéria.

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, com quatro tratamentos (folhas velhas no escuro (VE), folhas velhas no claro (VC), folhas novas no escuro (NE) e folhas novas no claro (NC)) e sete repetições.

Após um período de seis semanas, avaliou-se o percentual de folhas que sofreram injúria ou não na presença ou ausência da luz. Os dados foram analisados por meio de estatística descritiva.

## **2.3. Co-cultivo de discos foliares em meio MS mais *A. rhizogenes* em vários níveis de concentração de ANA**

Os discos foliares foram retirados do cultivar Mantiqueira, obtido conforme item 2; as plântulas estavam com aproximadamente quatro semanas de idade. Os tratamentos utilizados foram as seguintes concentrações de ANA: 0,0; 0,1; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; e 5,0 mg/L em meio MS líquido mais 100 mm das bactérias por frascos do tipo magenta com 20 mL

do meio. Os discos foliares foram feridos previamente e transferidos para o meio com os diferentes tratamentos, onde foram mantidos durante um período de quatro dias no escuro. Após este período, os discos foram transferidos para um meio MS sólido acrescido de 50 mg/L de canamicina, 500 mg/L de claforam e 10 mg/L de BAP, onde permaneceram durante um período de seis semanas, para posterior avaliação. Os calos foram contados, e o comprimento da raiz foi estimado utilizando-se um papel-vegetal, onde foram copiadas as raízes desenvolvidas; depois, com uma linha, contornaram-se os riscos, para uma posterior medição.

O delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casualizado, com cinco tratamentos (0,0; 0,1; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; e 5,0 mg/L de ANA) e cinco repetições, em duplicata. As características avaliadas foram o número de raiz e o comprimento de raiz, cujos dados foram submetidos à análise de variância e interpretados por meio de análise descritiva.

#### **2.4. Calos supostamente transformados cultivados em vários níveis de BAP**

Os calos supostamente transformados foram coletados dos discos foliares do cultivar Urubu, o qual foi co-cultivado com a bactéria e transferido para o meio com canamicina, claforam e BAP, pela metodologia citada no item 2.2. Esses calos foram multiplicados em meio com os antibióticos mais a citocinina, até atingirem quantidade suficiente para elaborar outros experimentos. Nesse meio previamente multiplicado, esse material se desenvolveu bem, porém foram testadas outras concentrações para avaliar o comportamento dos calos. O material foi dividido em pedaços de aproximadamente 0,5 cm e colocados em meio MS sólido com BAP (1,0; 10,0; 50,0; e 100 mg/L).

Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado, com quatro concentrações de BAP (1, 10, 50 e 100 mg/L) e 14 repetições. Depois de dois meses, foi feita avaliação do material após atingir peso estável em estufa, quando foi pesado em balança de precisão, obtendo-se o peso de matéria seca dos calos. Os dados de peso de matéria seca foram submetidos à análise de variância e interpretados por meio de análise descritiva.

## **2.5. Calos supostamente transformados cultivados em meio MS, GA<sub>3</sub> + BAP e picloram**

Os calos supostamente transformados obtidos a partir do item 2.2 foram divididos em pedaços de aproximadamente 0,5 cm, transferidos para os tratamentos e avaliados após um período de dois meses. Foram avaliados o peso da matéria seca dos calos e o aspecto visual do material.

O delineamento estatístico foi o inteiramente casualizado, com três tratamentos (MS sem nenhum regulador de crescimento, MS + GA<sub>3</sub> (0,05 mg/L) + BAP (2 mg/L) e MS + picloram (8 mg/L)) e 14 repetições.

Os dados de peso de matéria seca dos calos foram submetidos à análise de variância, e as médias dos tratamentos foram comparadas por meio do teste de Student-Newman-Keuls, em nível de 5% de probabilidade.

## **2.6. Análise de isozimas**

Foi feita uma análise isozimática para averiguar o material supostamente transformado, em relação ao material não-transformado. Coletou-se material da plântula da mandioca não-transformada, dos calos da mandioca não-transformada e dos calos de mandioca do material transformado.

### **2.6.1. Preparo do gel**

Os sistemas isozimáticos foram caracterizados pela técnica de eletroforese horizontal em géis de amido de milho (maisena) a 12%, utilizando-se 42 g de amido de milho em 350 ml de solução-tampão (CONKLE et al., 1982).

No preparo do gel de amido, foram empregados 350 ml de solução-tampão, dos quais 80 ml foram vertidos em um balão volumétrico de 1.000 mL e levados à fervura em fogo brando. Imediatamente, após a fervura, o conteúdo do balão volumétrico foi vertido no erlenmeyer, e este retornado à chama, para o cozimento do amido durante 3,5 minutos, no

caso do sistema-tampão tris-citrato (SHAW et al., 1970), e três minutos, no caso do sistema-tampão borato (BROWN, 1978). Em seguida, o conteúdo do erlenmeyer foi vertido em uma forma de acrílico de dimensões de 17,0 x 14,0 x 1,0 cm, sobre a qual se colocou uma placa de vidro pré-aquecida a 60°C, com a finalidade de se uniformizar a superfície do gel. Os géis foram preparados, à tarde, e deixados à temperatura ambiente até a manhã do dia seguinte. Em seguida, foram resfriados a 4°C por uma hora em câmara fria, antes da condução da eletroforese.

### **2.6.2. Coleta das amostras e extração das enzimas**

Para extração das enzimas, foram amostrados tecidos foliares de uma planta não-transformada, de um calo de uma plântula de mandioca não-transformada e de um calo supostamente transformado. A extração foi realizada utilizando-se almofariz e pistilo previamente congelados e mantidos sobre barras de gelo. Triturou-se cerca de 1 g de tecido/mL de solução-tampão, previamente gelada (ARIMURA, 1997).

### **2.6.3. Aplicação das amostras e corrida eletroforética**

O tecido vegetal foi triturado e aplicado em uma tira de papel cromatográfico Whatman 3 MM (12 x 5 mm), com auxílio de uma pinça, para absorção do filtrado.

O gel preparado como se segue. Retirou-se a placa de vidro e a cerca de 2,5 cm da extremidade fez-se um corte perpendicular, afastando a menor porção do gel, para facilitar a aplicação das amostras. As amostras absorvidas pelas tiras de papel foram colocadas ao longo da face cortada do gel maior, cobrindo completamente a espessura do gel. Aplicou-se a solução de azul-de-bromofenol em tira própria, para monitorar a migração. Em seguida, foi apoiado o suporte do gel sobre as cubas e conectado o gel às cubas dos eletrodos, mediante uma ponte de pano tipo Perfex previamente embebida na solução-tampão, para cada sistema enzimático.

Fez-se uma pré-corrída eletroforética durante 15 minutos de 150 volts, a fim de que as proteínas fossem liberadas das tiras de papel Whatman 3 MM para o gel. Desligou-se o aparelho, desconectou-se o gel das cubas e foram removidas as tiras com auxílio de pinça cirúrgica. Conectou-se o gel às cubas e ligou-se o aparelho novamente a 200 volts, segundo metodologia utilizada por ARIMURA (1997).

#### **2.6.4. Revelação das bandas de isozimas**

Após a corrida eletroforética, o gel foi cortado em fatias com auxílio de guias e, mediante o uso de um fio de náilon, em quatro fatias horizontalmente, aproveitando três fatias por gel. As fatias dos géis foram então colocadas sobre bandejas refratárias tipo Pyrex e sobre elas foram vertidas as soluções com os substratos específicos para cada sistema enzimático, conforme BORSOI FILHO (1995).

Para o sistema peroxidase (PO), as bandejas refratárias foram colocadas em câmara fria a 4°C, até o aparecimento das bandas isozimáticas. Já para os sistemas isozimáticos esterase, glutamato oxaloacetato transaminase, malato desidrogenase e isocitrato desidrogenase, as bandejas refratárias foram colocadas em estufa à temperatura de 37°C, no escuro até o aparecimento das bandas isozimáticas. Em seguida, as soluções reveladoras foram descartadas pela passagem de água corrente, e os padrões nos géis foram fixados, durante 12 horas em câmara fria a 4°C, com uma solução com 10% de glicerina. Após este período, a solução de glicerina foi removida e substituída por uma solução com 65% de álcool etílico, 30% de água e 5% de glicerina, durante cinco minutos, com o objetivo de se desidratarem os géis. Imediatamente após, os géis foram secados pelo método do bastidor e armazenados em papel-toalha.

### **2.6.5. Confeção de zimogramas**

Para a identificação das bandas, os géis foram dispostos na superfície de um diafanoscópio e, através do uso de uma régua milimetrada, as migrações das bandas foram medidas e transferidas para um papel milimetrado. Em seguida, calculou-se a mobilidade relativa ( $M_r$ ) das bandas isozimáticas, pela razão entre as distâncias percorridas por banda particular, presente nas plantas. Ao conjunto de bandas de diferentes mobilidades eletroforéticas, em suas respectivas posições em cada planta, designou-se padrão (PEREIRA, 1986).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. Efeito da canamicina

O Quadro 1 apresenta o resumo da análise de variância do número de folhas, comprimento da parte aérea e peso da matéria seca de mandioca.

Verificou-se que o antibiótico promove inibição no desenvolvimento dos explantes, apesar de não provocar a morte. Em todas as concentrações, com exceção da testemunha, houve o desenvolvimento da gema, que, logo após a emissão, paralisou o crescimento. Com relação à coloração dos folíolos desenvolvidos, em todos os tratamentos, com exceção da testemunha, eles eram de coloração branca. Se o material fosse deixado por um período maior, talvez tivesse ocorrido a morte. Para as raízes, a canamicina inibiu o seu desenvolvimento, ou seja, apenas a testemunha apresentou raízes (Quadro 2). Os resultados da análise de regressão do número de folhas, comprimento da parte aérea e peso da matéria seca (Figura 1) indicam toxidez a partir da concentração de 100 mg/L. O número de folhas teve diminuição de 74,57%, se comparado ao número de folhas da testemunha (4,09), com relação ao número de folhas na concentração de 1.000 mg/L (1,04); quanto ao comprimento da parte aérea, a diminuição foi de 44,82% da testemunha (3,77 cm), para a concentração de 1.000 mg/L (1,69 cm); e, com relação ao peso da matéria seca, a diminuição foi de 72,47% da testemunha (0,0247 g), para a concentração de 1.000 mg/L (0,0068 g).

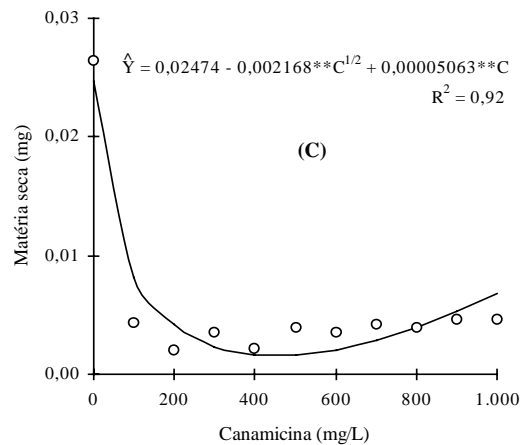
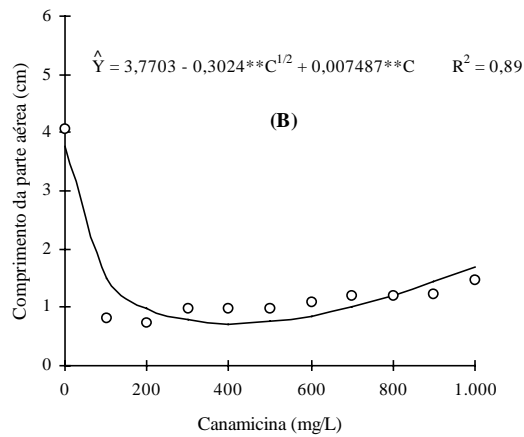
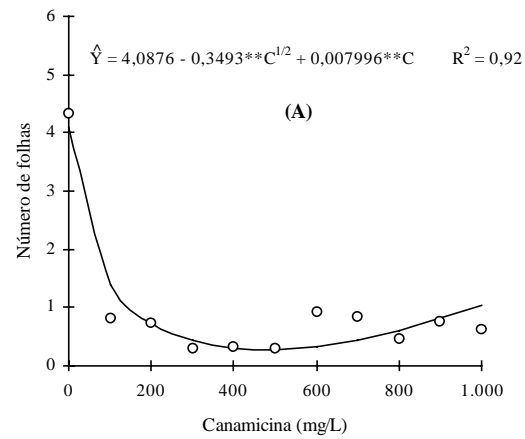
Quadro 1 - Número de folhas (NF), comprimento da parte aérea (CPA), número de raízes (NR), comprimento de raízes (CR) e peso da matéria seca (MS) de mandioca, cultivar Urubu, submetida a diferentes doses de canamicina

Canamicina	NF	CPA	NR	CR	MS
mg/L		cm		cm	g
0	4,33	4,06	7,67	7,34	0,0265
100	0,83	0,81	0,00	0,00	0,0044
200	0,75	0,74	0,00	0,00	0,0021
300	0,29	0,98	0,00	0,00	0,0036
400	0,33	0,98	0,00	0,00	0,0022
500	0,30	0,99	0,00	0,00	0,0039
600	0,93	1,08	0,00	0,00	0,0036
700	0,85	1,19	0,00	0,00	0,0042
800	0,46	1,21	0,00	0,00	0,0039
900	0,77	1,23	0,00	0,00	0,0046
1.000	0,62	1,46	0,00	0,00	0,0047

Quadro 2 - Resumo da análise de variância do número de folhas (NF), comprimento da parte aérea (CPA) e peso da matéria seca de mandioca, cultivar Urubu

FV	GL	Quadrado médio		
		NF	CPA	MS
Canamicina	10	16,0958**	10,3745**	0,000576**
Resíduo	143	0,3349	0,2647	0,000012
C.V. (%)		63,57	38,99	59,66

\*\* Significativo pelo teste F (P < 0,01).



\*\* Significativo a 1% de probabilidade, pelo teste t.

Figura 1 - Estimativa do número de folhas (A), do comprimento da parte aérea (B) e do peso da matéria seca (C) de plântulas de mandioca, cultivar Urubu, em função de doses de canamicina.

Em experimento realizado com eucaliptus (SANTOS, 1996), este apresentou inibição a 50 e 100 mg/L de canamicina; as brotações não se desenvolveram; e suas folhas ficaram amarelas, apresentando-se pouco clorofiladas e menores que as do grupo controle, semelhante aos resultados deste trabalho. A diferença é que, após sete dias, as plantas de eucaliptus já começaram a senescer; na mandioca, isto não ocorreu. Provavelmente, a mandioca é menos sensível ao antibiótico que o eucaliptus (*E. grandis* e *E. citriodora*).

Em *Rubus articus* L., ao testar o potencial seletivo da canamicina, KOKKO e KARENLAMPI (1998) constataram que plântulas micropropagadas e não-transformadas não sofreram efeito inibitório a 40 mg/L. Já a 50, 75, 100 e 200 mg/L de canamicina obteve-se uma porcentagem de sobrevivência de 68, 35, 10 e 0%, respectivamente, e as plântulas transformadas se desenvolveram normalmente a 100 mg/L de canamicina.

### **3.2. Co-cultivo de discos foliares em meio MS com *Agrobacterium rhizogenes* na presença ou ausência de luz**

Os discos foliares obtidos a partir de folhas novas, cocultivadas no escuro, não sofreram injúrias; contudo, quando colocados na luz, 85,7% sofreram intensa oxidação, com apenas 12,5% permanecendo intactos (Figura 2). Os discos foliares de folhas velhas, cocultivadas no escuro, também não sofreram nenhuma injúria; todavia, aqueles colocados no claro foram afetados, indicando que idade e luz são fatores críticos, uma vez que o melhor tratamento tanto para folhas velhas ou novas foi o escuro, e as mais novas apresentaram tendência a resistir melhor na presença da luz (Figura 2). Estes resultados confirmam o efeito da luz não só na indução da embriogênese, mas também como fator determinante no sucesso da infecção e, conseqüentemente, da transformação.

A idade das folhas também mostra o efeito do estágio de desenvolvimento também como fator determinante da transformação, haja vista conforme a Figura 3, o fato de que somente folhas novas e no escuro formaram calos transformados, de onde foi retirado material para posteriores experimentos de tentativa de regeneração.

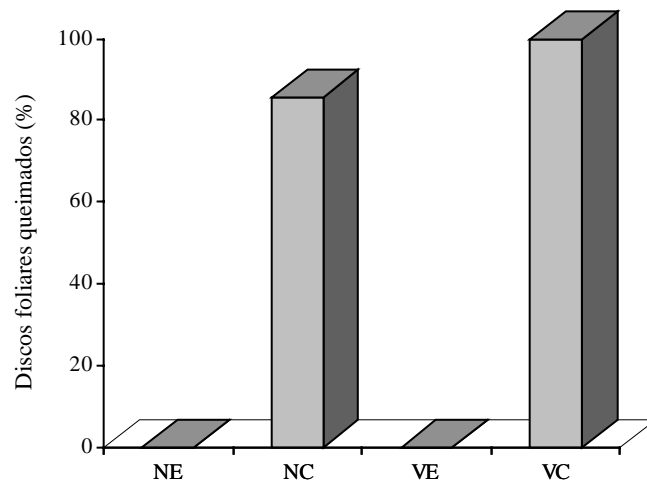


Figura 2 - Percentual médio de discos foliares novos (N) e velhos (V) de plântulas de mandioca, cultivar Urubu, queimados na presença (C) e na ausência (E) de luz.

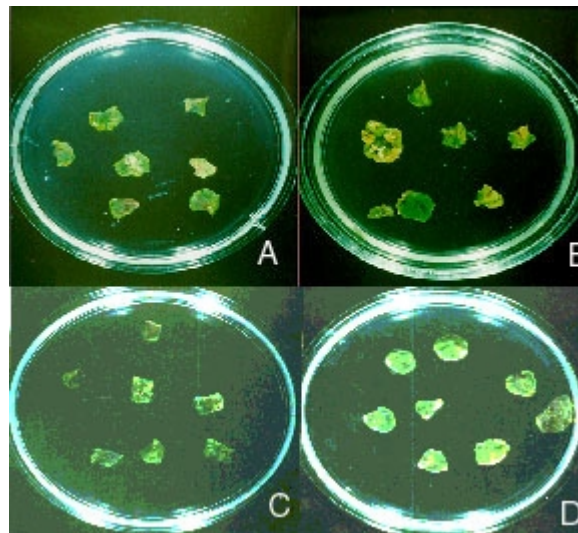


Figura 3 - Efeito da presença ou ausência de luz no cocultivo de discos foliares de plântulas de mandioca, cultivar Urubu, em placas de Petri: A – folhas novas e presença de luz; B - folhas novas e ausência de luz; C – folhas velhas e ausência de luz; D – folhas velhas e presença de luz (Viçosa, Minas Gerais, 1999).

### 3.3. Co-cultivo de discos foliares em meio MS mais *A. rhizogenes* em vários níveis de concentração de ANA

A análise de variância do número de calos e do comprimento de raízes foi não-significativa. Pelo Quadro 3 pode-se observar que as concentrações onde foram encontrados o maior número de calos foram as de 0, 2 e 3 mg/L de ANA, com número médio de 2,30 e 2,50, respectivamente. DOBIGNY et al. (1996), com o objetivo de induzir a regeneração direta de plantas transformadas de segmentos de caule de batata inoculada com *A. rhizogenes* fizeram um pré-tratamento com ANA, por uma noite, com 0,0, 5,3 e 26,5  $\mu$ M de ANA adicionado ao meio. Como resultado, constataram inibição da formação de brotações semelhante aos resultados deste trabalho, em que também não houve formação de brotações. Quanto ao comprimento de raízes, a maior média foi observada na concentração de 2 mg/L de ANA com média de 20,36 cm (Quadro 3).

Quadro 3 - Número médio de calos e comprimento médio de raízes de mandioca, cultivar Mantiqueira, em vários níveis de ANA

ANA	Número de calos	Comprimento de raízes
mg/L		cm
0	2,30 $\pm$ 2,16	8,40 $\pm$ 25,86
0,1	1,10 $\pm$ 2,42	3,31 $\pm$ 7,87
1	0,10 $\pm$ 0,32	0
2	1,70 $\pm$ 2,36	20,36 $\pm$ 61,60
3	2,50 $\pm$ 4,09	11,02 $\pm$ 23,24
4	1,20 $\pm$ 1,93	2,07 $\pm$ 3,85
5	0,80 $\pm$ 1,75	0,25 $\pm$ 0,54

Média  $\pm$  desvio-padrão.

### 3.4. Calos de mandioca transformados em vários níveis de BAP

A análise de variância foi não-significativa para peso de matéria seca. A concentração onde ocorreu a maior média de peso de matéria seca de calos de mandioca, cultivar Urubu, foi na de 10 mg/L de BAP, com 0,1051 g (Quadro 4); a partir desta concentração, houve decréscimo de aproximadamente 95% para as concentrações de 1 mg/L e 100 mg/L de BAP, com pesos médios de 0,0050 e 0,0048 g, respectivamente.

### 3.5. Calos transformados em meio MS, MS + GA<sub>3</sub> + BAP e MS + picloram

Houve diferença estatística entre os tratamentos (Quadro 5). O peso da matéria seca do tratamento com picloram (Quadro 6) foi significativamente maior; já aqueles com GA<sub>3</sub> + BAP e sem regulador de crescimento foram inferiores e se igualaram pelo teste de médias de Student. O peso da matéria seca do tratamento com picloram foi 44,59% superior em relação àquele com GA<sub>3</sub> + BAP e 41,21% ao sem regulador de crescimento.

Quadro 4 - Peso de matéria seca média de calos de plântulas de mandioca, cultivar Urubu, supostamente transformados, cultivados em vários níveis de BAP

BAP	Matéria seca
mg/L	g
1	0,0050 ± 0,0031
10	0,1051 ± 0,2600
50	0,0072 ± 0,0126
100	0,0048 ± 0,0020

Média ± desvio-padrão.

Quadro 5 - Resumo da análise de variância da matéria seca de calos do cultivar Urubu, supostamente transformados, sob efeito de diferentes meios de cultura

FV	GL	Quadrado médio
Meios de cultura	3	0,000199*
Resíduo	39	0,000054
C.V. (%)		68,23

\* Significativo pelo teste F ( $P < 0,05$ ).

Quadro 6 - Matéria seca média de calos do cultivar Urubu, supostamente transformados, sob efeito de diferentes meios de cultura

Médios de cultura	Matéria seca de calos
	g
MS	0,0087 b
MS + GA3 + BAP	0,0082 b
MS + picloram	0,0148 a

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Student-Newman-Keuls ( $P > 0,05$ ).

Quanto a mudanças morfogênicas, apesar de diferenças no tipo de células entre os tratamentos, não houve formação de embriões em nenhum tratamento.

### **3.6. Análise isozimática**

Foi obtida boa separação com os sistemas enzimáticos peroxidase, malato desidrogenase e esterase. Já para os sistemas isocitrato desidrogenase e glutamato oxaloacetato transaminase, as bandas isozimáticas mostraram-se de difícil visualização, em razão de estarem pouco definidas (Figura 4).

Na análise isozimática do sistema peroxidase dos calos transformados, observou-se ausência de uma banda presente na plântula normal e nos calos da plântula normal; no sistema malato desidrogenase, o calo transformado apresentou uma banda a mais em relação às demais; e, no sistema esterase, apresentou uma banda a menos.

Segundo ALVES et al. (1994), as isozimas de esterase, peroxidase, glutamato oxaloacetato transaminase e ácido fosfatase foram apropriadas para distinguir calos embriogênicos compactos de calos embriogênicos friáveis em batata-doce. A reversão dos calos foi associada com perda de banda ou declínio na atividade isozimática.

Na análise isozimática pelo sistema peroxidase, pode-se observar que, apesar de o material não-transformado ser diferente, planta e calos mostraram o mesmo padrão de bandas, diferindo dos calos transformados (Figura 5). Pode-se inferir que o calo transformado seria diferente dos demais materiais, indicando que houve transformação do material.

[+]	POD			EST			IDH			MDH			GOT		
	UP	UT	UC	UP	UT	UC	UP	UT	UC	UP	UT	UC	UP	UT	UC
MR															
1.0															
0.9	—														
0.8	—		—	—	—	—									
0.7	—	—	—	—	—	—				—	—	—			
0.6										—	—	—			
0.5	—	—	—				—	—	—	—	—	—	—	—	—
0.4								—	—	—	—	—			
0.3		—		—		—				—	—	—			
0.2	—	—	—	—	—	—									
0.1	—	—	—												
0.0															
[-]															

Figura 4 - Representação esquemática dos fenótipos isozimáticos de peroxidase (POD), esterase (EST), isocitratodesidrogenase (IDH), malato desidrogenase (MDH) e glutamato oxaloacetato transaminase (GOT), de material vegetal Urubu planta (UP), Urubu transformada (UT) e Urubu calos (UC), e suas mobilidades relativas (MR).



Figura 5 - Análise isoenzimática pelo sistema peroxidase de plântulas de mandioca docultivar Urubu (1), do calo supostamente transformado do cultivar Urubu (2) e do calo do cultivar Urubu (3).

#### 4. RESUMO E CONCLUSÕES

Os ensaios foram conduzidos no Laboratório de Progênies de Hortaliças do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Viçosa, com o objetivo de desenvolver um protocolo de transformação da mandioca via *A. rhizogenes*. Dessa maneira, foram estudados o efeito da canamicina (0, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 e 1.000 mg/L); o efeito da presença ou ausência da luz em discos foliares velhos e novos cocultivados com o *A. rhizogenes*; o cocultivo de discos foliares em meio MS mais *A. rhizogenes*, em vários níveis de concentração de ANA (0,0; 0,1; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; e 5,0 mg/L); os calos supostamente transformados cultivados em vários níveis de BAP (1,0; 10,0; 50,0; e 100,0 mg/L); e os calos supostamente transformados cultivados em meio MS, GA<sub>3</sub> (0,05 mg/L) + BAP (2 mg/L) + MS e picloram (8 mg/L) + MS, bem como foi feita a análise de isozimas.

Os resultados obtidos permitiram as seguintes conclusões:

- A mandioca cultivar Urubu é extremamente sensível a concentrações superiores a 100 mg/L de canamicina.
- A presença ou ausência da luz e idade da folha são fatores determinantes no sucesso da transformação; folhas novas e no escuro apresentaram melhores resultados.

- A melhor concentração recomendada de ANA no cocultivo seria de 2 mg/L, pois foi aquela em que houve maior número de calos e maior comprimento de raízes.
- A concentração de BAP mais indicada para os calos supostamente transformados seria a de 10 mg/L, que apresentou maior peso de matéria seca.
- Picloram favoreceu o maior incremento de matéria seca.
- Pela análise isozimática, percebe-se a perda de uma banda na mandioca transformada, mas isso não significa que ela esteja transformada, pois somente depois da regeneração e do estabelecimento no campo é que se pode afirmar se houve ou não transformação.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFENAS, A.C., BRUNE, W. Eletroforese em gel de amido. In: ALFENAS, A.C. (Ed.). **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins – fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos**. Viçosa, MG: UFV, 1998. p.115-148.
- ALVES, J.M.C., SIHACHAKR, D., ALLO, M., TIZROUTINE, S., MUSSIO, I., SERVAES, A., DUCREUX, G. Isozyme modifications and plant regeneration through somatic embryogenesis in sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam). **Plant Cell Reports**, v.13, n.8, p.437-441, 1994.
- ARIMURA, C.T. **Propagação *in vitro* de gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) por meio de segmentos nodais estiolados**. Viçosa, MG: UFV, 1997. 62p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Viçosa, 1997.
- BENDER, L., NEUMANN, K.H. Ethylene production and growth of carrot root tissue culture (*Daucus carota*) as influenced by indole-3-acetic acid and kinetin. **Zeitschrift fur Pflanzenphysiol**, v.88, n.5, p.227-234, 1978.
- BEYER, E. A potent inhibitor of ethylene action in plants. **Physiologia Plantarum**. v.58, n.2, p.268-271, 1976.
- BINNS, A.N. *Agrobacterium*-mediated gene delivery and biology of host range limitations. **Physiology Plantarum**, v.79, n.1, p.135-139, 1990.

- BOLONHEZI, A.C. **Influência do fotoperíodo sobre o desenvolvimento da planta e a produção de raízes tuberosas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz)**. Piracicaba: ESALQ, 1991. 228p. Tese (Doutorado em Agronomia)-Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 1991.
- BORSOI FILHO, J.L. **Variabilidade isozimática e divergência genética de seis cultivares de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz)**. Viçosa, MG: UFV, 1995.. 52p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Viçosa, 1995.
- BRAGA, J.M., DEFELIPPO, B.V. Determinação espectrofotométrica de fósforo em estratos de solos e plantas. **Revista Ceres**, v.21, n.113, p.73-85, 1974.
- BRASILEIRO, A.C.M., LEPLÈ, J.C., DREVET, C., JOUANIN, L. Genetic transformation of poplar (*Populus tremula* x *P. alba*). In: ENCONTRO BRASILEIRO DE BIOTECNOLOGIA VEGETAL, 1, 1993, Brasília. **Anais...** Brasília: EMBRAPA, 1993. p.33.
- BROWN, A.D.H. Isozymes, plant population, genetic structure and genetic conservation. **Theor. Appl. Genet.**, v.52, n.4, p.145-157, 1978.
- CABRAL, G.B., BATISTA, L.O., BRASILEIRO, A.C.M. Transformação genética de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) via *Agrobacterium tumefaciens*. In: ENCONTRO BRASILEIRO DE BIOTECNOLOGIA VEGETAL, 1, 1993, Brasília. **Anais...** Brasília: EMBRAPA, 1993. p.30.
- CAETANO, L.C. Estudo da formação de metabólitos secundários em sistemas de cultura de tecidos vegetais, calos, suspensão de células, raízes normais, raízes transformadas via *Agrobacterium rhizogenes*, folíolos transformados via *A. tumefaciens* (folíolo-mutante). In: ENCONTRO BRASILEIRO DE BIOTECNOLOGIA VEGETAL, 1, 1993, Brasília. **Anais...** Brasília: EMBRAPA, 1993. p.14.
- CARDARELLI, M., MARIOTTI, D., POMPONI, M. *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA genes capable of inducing hairy root phenotype. **Molecular and General Genetics**. v.209, n.5, p.474-480, 1987.
- CHAND, P.R., RECH, E.L., GOLDS, T.J., POWER, J.B., DAVEY, M.R. Electroporation stimulates transformation of freshly isolated cell suspension protoplasts of *Solanum dulcamara* by *Agrobacterium*. **Plant Cell Reports**, v.8, n.2, p.86-89, 1989.
- CHESNIN, L., YIEN, C.H. Turbidimetric determination of available sulfate. **Soil Science American Proceedings**, v.15, n.1, p.149-151, 1950.

- CHI, G., PUA, E. Ethylene inhibitor enhanced *de novo* shoot regeneration from cotyledons of *Brassica campestris* ssp. *Chinesis* (Chinese cabbage) *in vitro*. **Plant Science**. v.64, n.2, p.243-250, 1989.
- COCK, J.H. **Cassava: new potencial for a neglected crop**. Colorado: Westview/ Boulderand, 1985. 192p.
- CONCEIÇÃO, A.J. **A mandioca**. São Paulo: Nobel, 1986. 382p.
- CONKLE, M.T., HODGSKISS, P.D., NUNNALLY, L.B. **Starch gel electroforesis conifer seeds: a laboratory manual**. Berkerley, USDA: Forest Service, 1982. 18p.
- COUSSON, A., TRAN THANH VAN, K. Light- and sugar-mediated control of direct *de novo* flower differentiation from tobacco thin cell layers. **Plant Physiology**, v.72, n.1, p.33-36, 1983.
- DOBIGNY, A ., TIZROUTINE, S., GAISNE, C., HAICOUR, R., ROSSIGNOL, L., DUCREUX, G., SIHACHAKR, D. Direct regeneration of transformed plants from stem fragments of potato inoculated with *Agrobacterium rhizogenes*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.45, n.2, p.115-121, 1996.
- EAPEN, S., GEORGE, L. Plant regeneration from peduncle segments of oil seed *Brassica* species: Influence of silver nitrate and silver thiosulfate. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.51, n.3, p.229-232, 1997.
- ESKES, A.B., VARGA, A., STARITSKY, G., BRUINSMA, J. Callus growth and rooting of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) stem segment cultured *in vitro*. **Acta Botanica Neerland**, v.23, n.3, p.315-320, 1994.
- FAUQUET, C., BOGUSZ, D., FRANCHE, C., CHAVARRIAGA, P., SCHOPKE, C., BEACHY, R.N. Cassava viruses and genetic engineering. In: THOTTHAPILLY, G., MONTI, L., MOHAN RAJ, D.R., MOORE, A.W. (Eds.). **Biotechnoligy: enhancing research on tropical crops in Africa**. Ibadan, Nigeria: CTA/IITA, Nigeria, 1992. p.287-296.
- FREITAS, V.M.G., LACORTE, C., CORDEIRO, A.R., OLIVEIRA, D.E., MANSUR, E. Peanut (*Arachis hypogaea* L.) genetic transformation via *Agrobacterium* mediated gene transfer. In: ENCONTRO BRASILEIRO DE BIOTECNOLOGIA VEGETAL, 1, 1993, Brasília. **Anais...** Brasília: EMBRAPA, 1993. p.19.

- GAMA, M.I.C.S., LEITE, R.P.,CORDEIRO, A.R., CANTLIFFE, D.J. Produção de plantas transgênicas de batata-doce por transformação de calos embriogênicos através de *Agrobacterium tumefaciens*. In: ENCONTRO BRASILEIRO DE BIOTECNOLOGIA VEGETAL, 1, 1993, Brasília. **Anais...** Brasília: EMBRAPA, 1993. p.21.
- GRAHAM, J., McNICOL, R.J., GREIG, K. Use of the GUS gene as a selectable marker for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Rubus*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.20, n.6, p.609-613, 1990.
- HANGARTER, R.P., GOOD, N.E. Evidence that IAA conjugates are slow-release source of free IAA in plant tissues. **Plant Physiology**, v.68, n.6, p.1424-1427, 1981.
- HANGARTER, R.P., STASINOPOULOS, T.C. Effect of Fe-catalyzed of EDTA on root growth in plant culture media. **Plant Physiology**, v.96, n.3, p.843-847, 1991a.
- HANGARTER, R.P., STASINOPOULOS, T.C. Repression of plant tissue growth by light is caused by photochemical change in the culture medium. **Plant Science**, v. 79, n.2, p.253-257, 1991b.
- HERSHEY, C.H., JENNINGS, D.L. Progress in breeding cassava for adaptation to stress. **Plant. Breed. Abstr.**, v.62, n.5, p.823-831, 1992.
- HICKS, G.S. Patterns of organ development in plant tissue culture and the problem of organ determination. **Bot. Rev.**, v.46, n.1, p.1-23, 1980.
- HOOYKAAS, P.J.J., THORPE, T.A. Effects of fluridone and abscisic acid on lateral root initiation and root elongation of excised tomato roots cultured *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.52, n.3, p.199-203, 1998.
- HOOYKAAS, P.J.J., BEIJERSBERGEN, A.G. The virulence system of *Agrobacterium tumefaciens*. **Annual Review of Phytopatology**, v.32, n.1, p.157-179, 1994.
- HOOYKAAS, P.J.J., SCHILPEROORT, R.A. *Agrobacterium* and plant genetic engineering. **Plant Molecular Biology**, v.19, n.1, p.15-38, 1992.
- HUNT, L.A., WHOLEY, D.N., COCK, J.H. Growth physiology of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Field Crop Abstracts**, v.30, n.2, p.77-91, 1977.

- HUXTER, T.J., REID, D.M., THORPE, T.A. Ethylene production by tobacco (*Nicotiana tabacum*) callus. **Physiologia Plantarum**, v.46, n.2, p.375-380, 1979.
- JACKSON, M.L. Nitrogen determination for soil plant tissue. In: JACKSON, M.L. (Eds.). **Soil and chemical analysis**. Englewood Cliffs: Prentice-Hall, 1958. p.183-204.
- JEAN, M., CAPPADOCIA, M. Effects of some growth regulator on *in vitro* tuberization in *Dioscorea alata* L. 'Brazo fuerte' and *D. abyssinica* Hoch. **Plant Cell Reports**, v.11, n.1, p.34-38, 1992.
- KARTHA, K.K., GAMBORG, O.L. Cassava tissue culture-principles and applications. In: SHARP, W.R., LASSEN, P.Q., PADDOCK, V. (Eds.). **Plant cell tissue culture: principles and applications**. Raghaven, Ohio: State University Press Columbus, 1979. p.711-725.
- KOHLLENBACH, H.W. Basic aspects of differentiation and plant regeneration from cell and tissue culture. In: BARZ, W.; REINHARD, E.; ZENK, M.H. (Eds.). **Plant tissue culture and its bio-technological application**. New York: Springer-Verlag, 1976. p.344-366.
- KOKKO, H.I., KARENLAMPI, S.O. Transformation of arctic bramble (*Rubus arcticus* L.) by *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Cell Reports**, v.17, n.11, p.822-826, 1998.
- KOTT, L.S., KASHA, K.J. Initiation and morphological development of somatic embryoids from barley cell cultures. **Canadian Journal Botany**, v.62, n.11, p.1245-1249, 1984.
- LA RUE, A.G., GAMBORG, O.L. Ethylene production by plant cell cultures. Variations during production and growth cycle and in different species. **Physiologia Plantarum**, v.48, n.2, p.394-398, 1971.
- LACORTE, C., MANSUR, E. Transferência de genes através da *Agrobacterium tumefaciens*: avaliação da compatibilidade patógeno-hospedeiro. **ABCTP Notícias**, v.21, n.1, p.2-7, 1993.
- LE V.B., MY, N.T., GENDY, C., VIDAL, J., TRNTHANH VAN, K. Somatic embryogenesis on thin cell layers of a C<sub>4</sub> species, *Digitaria sanguinalis* (L.) Scop. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.49, n.3, p.201-208, 1997.
- LESHEM, B., RONEN, R., SOUDRY, E., LURIE, S., GEPSTEIN, S. Cytokinin and white light coact to enhance polypeptide metabolism and shoot regeneration in cultured melon cotyledons. **Journal of Plant Physiology**, v.145, n.3/4, p.291-295, 1995.

- LI, H.Q., SAUTER, C., POTRYKUS, I., PUONTI-KAERLAS, J. Genetic transformation of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Nature Biotechnology**, v.14, n.6, p.736-740, 1996.
- MACHADO, L.O.P., BARRUETO, L.P., BRASILEIRO, A.C.M. Estudo da susceptibilidade de *Eucalyptus* à *Agrobacterium tumefaciens*. In: ENCONTRO BRASILEIRO DE BIOTECNOLOGIA VEGETAL, 1, 1993, Brasília. **Anais...** Brasília: EMBRAPA, 1993. p.28.
- MACKENZIE, I.A., STREET, H.E. Studies on growth in culture of plant cells. VIII. The production of ethylene by suspension cultures of *Acer pseudoplatanus* L. **Journal of Experimental Botany**, v.21, n.68, p.824-834, 1970.
- MAGDALITA, P.M., GODWIN, I.D., DREW, R.A., ADKINS, S.W. Effect of ethylene and culture environment on development of papaya nodal cultures. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.49, n.2, p.93-100, 1997.
- MARCELLINO, L.H., GANDER, E., CONÇEIÇÃO, A.S., KREBBERS, E. e NESHICH, G. Expression of mutated 2.s. cDNA in *Nicotiana tabacum* . In: ENCONTRO BRASILEIRO DE BIOTECNOLOGIA VEGETAL, 1, 1993, Brasília. **Anais...** Brasília: EMBRAPA, 1993. p.17.
- MARIA, J. **Root growth and development in Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) *in vitro***. Manchester:University of Manchester, 1987, 174p. Thesis (doctor of Philosophy) University of Manchester, 1987.
- MAUREL, C., LEBLANC, N., BARBIER-BRYGOO, H. Alterations of auxin perception in *rolB*-Transformed tobacco protoplasts. **Plant Physiology**, v.105, n.10, p.1209-1215, 1994.
- MURASHIGE, T., SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, n.3, p.473-497, 1962.
- MUSSIO, I., CHAPUT, M.H., SERRAF, I., DUCREUX, G., SIHACHAKR, D. Adventitious shoot regeneration from leaf explants of an African clone of Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) and analysis of conformity of regenerated plants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.53, n.3, p.205-211, 1998.
- NEHLIN, L., MOLLERS, C., GLIMELIUS, K. Induction of secondary embryogenesis in microspore-derived embryos of *Brassica napus* L. **Plant Science**, v.111, n.2, p.219-229, 1995.

- PANDURO, A.M.R. **Análise do comportamento da alface (*Latuca sativa* L.), sob diferentes condições de iluminação.** Piracicaba, SP: ESALQ, 1986. 129p. Dissertação (Mestrado em Agronomia)-Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 1986.
- PARKE, D. Tissue culture of cassava on chemically defined media. **Physiologia Plantarum**, v.42, n.2, p.195-201, 1978.
- PÉLISSIER, B., BOUCHEFRA, O., PÉPIN, O., FREYSSINET, G. Production of isolated somatic embryos from sunflower thin cell layers. **Plant Cell Reports**, v.9, n.1, p.47-50, 1990.
- PEREIRA, E.A. **Caracterização morfoisozimática de 24 ecótipos de capim gordura (*Melinis minutiflora* Beauv.).** Viçosa, MG: UFV, 1986. 63p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa, 1986.
- PHILLIPS, T.P. **Cassava utilization and potencial markets.** Canada: 1974. 182 p.
- PIERIK, R.L.M. Closure of test tubes and flasks. In: PIERIK, R.L.M. (Ed.). **In vitro culture of higher plants.** Netherlands: Martinus Nijhoff, 1987. p.83-125.
- PODDAR, K., VISHNOI, R.K., KOTHARI, S.L. Plant regeneration from embryogenic callus of finger millet *Eleusine coracana* (L.) Gaertn. on higher concentrations of  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  as a replacement of NAA in the medium. **Plant Science**, v.129, n.1, p.101-106, 1997.
- POTTER, T.I., ROOD, S.B. Light intensity, gibberellin metabolism in *Brassica*. **Plant Physiology**, v.102, n.1, p.8, 1993.
- PRABHUDESAI, V.R., NARAYANASWAMY, S. A tissue culture from tapioca. **Plant Science Letters**, v.4, n.4, p.237-241, 1975
- PYTHOUD, F., SINKAR, V.P., NESTER, E.W. Increased virulence of *Agrobacterium rhizogenes* conferred by the vir region of pTiBo5542: application to genetic engineering of poplar. **Biotechnology**, v.5, n.12, p.1323-1327, 1987.
- RAEMAKERS, C.J.J.M., SCHAVEMAKERS, C.M., JACOBSEN, E., VISSER, R.G.F. Improvements of cyclic somatic embryogenesis of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Plant Cell Reports**, v.12, n.4, p.226-229, 1993.

- REINERT, J., BAJAJ, Y.P.S., ZBELL, B. Aspects of organization-organogenesis, embryogenesis, cytodifferentiation. In: STREET, H. E. (Ed.). **Plant tissue and cell culture**. Berkeley: University of California, 1977. p.384-427.
- REUTER, D.J., ROBINSON, J.B. **Plant analysis an interpretation manual**. Melbourne, Sydney: Inkata, 1988. 218p.
- RIGHETTI, B., MAGNANINI, E., INFANTE, R., PREDIERE, R. Ethylene, ethanol acetaldehyde and carbon dioxide release by *Prunus avium* shoot cultures. **Physiologia Plantarum**, v.78, n.4, p.507-510, 1990.
- ROCA, W.M., ESCOBAR, R., MAFLA, G., SARRIA, R., TORRES, E., BALCAZAR, N., DESTEFANO. Progress in cryopreservation and transformation research with Cassava (*Manihot esculenta* Crantz). In: ENCONTRO BRASILEIRO DE BIOTECNOLOGIA VEGETAL, 1, 1993, Brasília. **Anais...** Brasília: EMBRAPA, 1993. p.13.
- ROGERS, D.J. Studies of *Manihot esculenta* Crantz and related species. **Bulletin Torrey Botany Club**, v.90, n.1, p.43-54, 1963.
- ROOD, S.B., ZANEWICH, K.P. Photocontrol of gibberellin metabolism in *Brassica*. **Plant Physiology**, v.102, n.1, p.8, 1993.
- SALEHUZZAMAN, S.N.I.M., JACOBSEN, E. VISSER, R.G.F. Isolation and characterization of a cDNA encoding granule-bound starch synthase in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) and its antisense expression in potato. **Plant Molecular Biology**, v.23, n.8, p.947-962, 1993.
- SALES FILHO, S.B. **Caracterização de cultivares de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) pela morfologia e padrões isozimáticos**. Viçosa,, MG: UFV, 1991. 118p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal de Viçosa, 1991.
- SANTOS, M.O. **Transformação mediada por *Agrobacterium rhizogenes* visando aumentar o enraizamento em eucalipto**. Viçosa, MG: UFV, 1996. 50p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa, 1996.
- SATO, A.Y. **Propagação de gérbera de vaso através da cultura de tecidos**. Lavras, MG: UFLA, 1994. 95 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Lavras, 1994.
- SHAHIM, E.A., SHEPARD, J.F. Cassava mesophyll protoplasts: isolation, proliferation and shoot formation. **Plant Science Letters**, v.17, n.4, p.459-465, 1980.

- SHAW, C.R., PRASAD, R. Starch gel eletrophoresis of enzymes- compilation of recipes. **Biochemical Genetics**, v.4, n.2, p.297-320, 1970.
- SILVA, J.R. Mercado de produtos. **Informações Econômicas**, v.29, n.2, p.56, 1999.
- SOENARJO, R., POESPODARSONO, S., NUGROHO, J.H. Cassava breeding and agronomy research in Asia. **Proceeding of Regional Workshop held in Ryong**, n.1, p.27-33, 1987.
- SPENA, A., SCHMULLING, T., KONCZ, C. Independent and synergistic activity of *rol A, B* and *C* in stimulating abnormal growth in plants. **The EMBO Journal**. v.6, n.32, p.3891-3899, 1987.
- STASINOPOULOS, T.C., HANGARTER, R.P. Preventing photochemistry in culture media by long-pass light filters alters growth of cultured tissues, **Plant Physiology**, v.93, n.10, p.1365-1369, 1990.
- TAIZ, L., ZEIGER, E. **Plant physiology**. California: The Benjamin Cummings, 1991. 559p.
- TEPFER, D. Genetic transformation using *Agrobacterium rhizogenes*. **Physiologia Plantarum**, v.79, n.1, p.140-146, 1990.
- THRO, A. M., BEACHY, R.H., BONIERBALE, M., FAUQUET, C., HENRY, G., HENSHAW, G.G., HUGHES, M.A., KAWANO, K., RAEMAKERS, C.J.J.M., ROCA, W., SCHOPKE, C., TAYLOR, N., VISSER, R.G.F. International research on biotechnology of cassava (*tapioca, Manihot esculenta* Crantz) and its relevance to Southeast Asia economies: a cassava biotechnology network review. **Asian Journal Tropical Biology**, v.2, n.1, p.1-30, 1996.
- UENO, H.L., SILVA, J.R. Fontes e estacionalidade de suprimento e de preços de mandioca de mesa no Estado de São Paulo, 1987-91. **Informações Econômicas**, v.22, n.11, p.21, 1992.
- WILLIANS, C.N. Growth and productivity of tapioca (*Manihot utilissima*). IV. Development and yield of tubers. **Experimental Agricultural**, v.10, n.1, p.9-16, 1974.
- WINNANS, S.C. Two-way chemical signaling in *Agrobacterium*-plant interactions. **Microbiology Review**, v.56, n.1, p.12-31, 1992.
- YAMAGUCHI, T., STREET, H.E. Stimulation of the growth of excised cultured roots of soybean by abscisic acid. **Annual Botany**, v.41, n.17, p.1129-1133, 1977.