

**CLÁUDIA MARTELLET FOGAÇA**

**TOLERÂNCIA AOS ESTRESSES SALINO E TÉRMICO EM CULTIVARES  
DE TARO E MANDIOCA TUBERIZADAS *in vitro***

Tese apresentada à  
Universidade Federal de  
Viçosa, como parte das  
exigências do Programa de  
Pós-Graduação em Genética e  
Melhoramento, para obtenção  
do título de *Doctor Scientiae*.

**VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2007**

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

F655t  
2007

Fogaça, Cláudia Martellet, 1977-

Tolerância aos estresses salino e térmico em cultivares de taro e mandioca tubalizadas *in vitro* / Cláudia Martellet Fogaça. – Viçosa : UFV, 2007.  
xi, 109f. : il. col. ; 29cm.

Inclui apêndice.

Orientador: Fernando Luiz Finger.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Melhoramento genético vegetal. 2. Mandioca - Anatomia.  
3. Mandioca - Fisiologia. 4. Mandioca - Efeito da temperatura.  
5. Mandioca - Efeito da salinidade. 6. Taro - Anatomia.  
7. Taro - Fisiologia. 8. Taro - Efeito da temperatura. 9. Taro -  
Efeito da salinidade. I. Universidade Federal de Viçosa. I.Título.

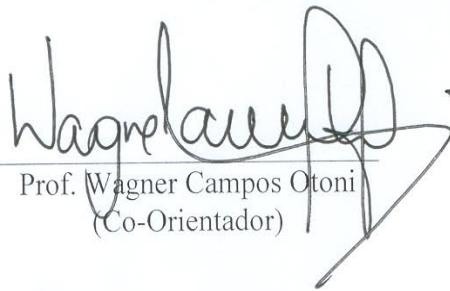
CDD 22.ed. 631.52

CLÁUDIA MARTELLET FOGAÇA

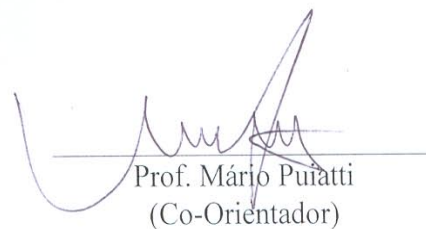
TOLERÂNCIA AOS ESTRESSES SALINO E TÉRMICO EM CULTIVARES  
DE TARO E MANDIOCA TUBERIZADAS *in vitro*

Tese apresentada à  
Universidade Federal de  
Viçosa, como parte das  
exigências do Programa de  
Pós-Graduação em Genética e  
Melhoramento, para obtenção  
do título de *Doctor Scientiae*.

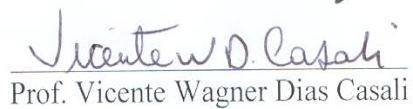
APROVADA: 09 de março de 2007.



Prof. Wagner Campos Otoni  
(Co-Orientador)



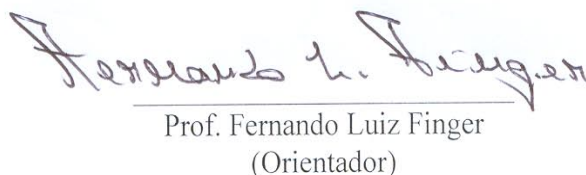
Prof. Mário Puiatti  
(Co-Orientador)



Prof. Vicente Wagner Dias Casali



Maria Aparecida Nogueira Sedyama



Prof. Fernando Luiz Finger  
(Orientador)

*Aos meus pais,  
Ao meu irmão e sua família,  
Dedico.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus por ter sempre iluminado meu caminho, protegendo a mim e a todos a quem amo;

Ao meu Orientador e meu amigo Prof. Fernando Luiz Finger, pela orientação científica e profissional, pela confiança em mim depositada, pela disponibilidade e paciência e, principalmente, pelo carinho e amizade;

Ao Prof. Wagner Otoni, pela atenção e orientação dada durante toda a elaboração e execução da tese;

A Prof. Aristéa Alves Azevedo por disponibilizar o Laboratório de Anatomia, equipamentos e auxílio nas análises de microscopia;

Ao técnico e amigo Geraldo Júlio do Laboratório de Pós-colheita, pelo carinho, aprendizagem, compreensão e amizade, muita obrigada;

Ao meu amigão Bruno Sant'Anna e Diego, pela disponibilidade e paciência na confecção de pranchas ;

As minhas incansáveis estagiárias (Delaine, Teresa, Aline, Marcell e Lucilene), muito obrigada mesmo, sem vocês eu não teria conseguido fazer tudo o que foi realizado, parte desta tese devo a vocês;

A todos os professores envolvidos direta ou indiretamente na minha formação;

Aos técnicos, Ribeiro e Sebastião, ao querido Vicente do apoio financeiro, sempre disposto a me ajudar;

Aos amigos do Laboratório, pela convivência, à todos muito obrigada;

Aos amigos que ganhei durante todo esse período de aprendizagem: Sabrina, Hyana, Cristiane, Verônica (Índia), Suffiati, Lila, Fábio, Dani, Beno, Fernanda, Manoel, Maurício, Giselda;

Ao meu namorado Adelião, pela ajuda, incentivo, dedicação e apoio em todos os momentos;

À Universidade Federal de Viçosa e, em particular, à Genética e Melhoramento, pela oportunidade de realizar o curso;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), e a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa de estudos;

Ao Grupo de Estudos GenMelhor do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, pelo companheirismo e aprendizagem;

À minha família, pela confiança, apoio e compreensão e incentivo durante toda a minha vida. AMO vocês!!!

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

**MUITO OBRIGADA!**

## **BIOGRAFIA**

CLÁUDIA MARTELLET FOGAÇA, filha de Luiz Paulo Costa Fogaça e Neiva Martellet Fogaça, nasceu no dia 31 de janeiro de 1977 em Santa Maria, no Estado do Rio Grande do Sul.

No ano de 2001, concluiu o Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas, pela Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

No ano de 2003, concluiu o Curso de Mestrado em Botânica, pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul, em Porto Alegre (UFRGS).

Em março de 2003 iniciou, na Universidade Federal de Viçosa, o Curso de Doutorado no Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, submetendo-se à defesa de tese em 9 de março de 2007.

## SUMÁRIO

RESUMO .....	viii
ABSTRACT .....	x
INTRODUÇÃO GERAL .....	1
CAPÍTULO I.....	12
Microtuberização <i>In Vitro</i> de Cultivares de Mandioca e Taro.....	12
RESUMO .....	12
1. INTRODUÇÃO .....	13
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	17
2.1. Material Vegetal.....	17
2.2. Estabelecimento e Manutenção das Culturas.....	17
2.3. Condições de Microtuberização.....	18
2.3.1. Microtuberização de Taro .....	18
2.3.1.1. Experimento 1: .....	18
2.3.1.2. Experimento 2 .....	19
2.3.1.3. Experimento 3 .....	20
2.3.2. Microtuberização de Mandioca.....	20
2.3.2.1. Experimento 1 .....	21
2.3.2.2. Experimento 2 .....	22
2.3.2.3. Experimento 3 .....	23
2.3.2.4. Experimento 4 .....	24
2.3.2.5. Experimento 5 .....	25
2.4. Delineamento Experimental e Análise Estatística .....	26
2.5. Preparo das lâminas permanentes de taro e de mandioca .....	27
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	28
3.1. Microtuberização de Taro .....	28
3.2. Microtuberização de Mandioca.....	35
4. CONCLUSÕES .....	50
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51

CAPÍTULO II .....	57
Efeito dos Estresses Salino e da Baixa Temperatura <i>in vitro</i> em Cultivares de Mandioca e Taro .....	57
RESUMO .....	57
1. INTRODUÇÃO .....	58
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	63
2.1. Material Vegetal.....	63
2.2. Estabelecimento e Manutenção das Culturas.....	63
2.3. Condições de Cultura .....	64
2.3.1. Estresse Salino .....	64
2.3.1.1. Experimento 1 .....	65
2.3.1.2. Experimento 2 .....	65
2.3.1.3. Experimento 3 .....	65
2.3.2. Estresse por Baixa Temperatura .....	65
2.3.2.1. Experimento 1 .....	65
2.3.2.2. Experimento 2 .....	66
2.4. Análises das Características das Plantas Submetidas a Tipos de Estresse.....	66
2.4.1. Análise Bioquímica.....	66
2.4.2. Mensuração da concentração de etileno.....	69
2.5. Delineamento Experimental e Análise Estatística .....	71
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	72
3.1. Estresse Salino .....	72
3.2. Estresse por Baixa Temperatura.....	81
4. CONCLUSÕES .....	95
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	96
CONCLUSÕES GERAIS .....	102
APÊNDICES.....	103

## RESUMO

FOGAÇA, Cláudia Martellet, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2007. **Tolerância aos estresses salino e térmico em cultivares de taro e mandioca tuberizadas *in vitro***. Orientador: Fernando Luiz Finger. Co-Orientadores: Wagner Campos Otoni e Mário Puiatti.

A tuberização é um complexo processo de desenvolvimento que é influenciado por variáveis genéticas, ambientais e fisiológicas, sendo caracterizado por significativas mudanças anatômicas, hormonais e bioquímicas. Nesse sentido, a microtuberização *in vitro*, além de sua importância pela rápida propagação vegetativa das plantas livres de doenças, manutenção e manipulação de material, facilidade de conservação e intercâmbio de germoplasma, se presta como sistema experimental para o melhor entendimento de processos associados à indução e controle da tuberização. Com o objetivo de induzir o processo de microtuberização *in vitro* de cultivares de mandioca e de taro foi analisado a ação de diferentes reguladores de crescimento, BAP e ANA, doses de sacarose (3%, 6% e 8% p/v) e regime luminoso diferenciado. Foram analisadas características morfológicas como o comprimento da parte aérea (CPA), o número médio de raízes (NR), o diâmetro de rizomas (DR), o padrão de desenvolvimento dos microtubérculos, bem como características anatômicas. Com base nos resultados verificou-se que as cultivares de taro e mandioca respondem diferentemente à microtuberização *in vitro*. A cultivar de taro Japonês respondeu melhor ao processo de indução de microrizomas, principalmente quando submetida ao tratamento com 22,2 µM BAP e 8% (p/v) sacarose. Já em mandioca, a cultivar Parazinha respondeu melhor à indução de raízes tuberiformes, tendo o tratamento constituído de 0,4 µM BAP, 1,6 µM ANA e 8% (p/v) sacarose como maior indutor na formação de raiz tuberiforme, tanto em meio semisólido quanto em meio líquido. No comprimento médio da parte aérea, comprimento médio da raiz mais longa e número médio de raízes destacou-se a cultivar de mandioca Mantiqueira, porém, em meio de indução à raiz tuberiforme, foi considerada recalcitrante. Anatomicamente, a microtuberização *in vitro* caracterizou-se pela presença de grãos de amido

nos microrizomas e raízes tuberiformes de taro e mandioca, respectivamente. Para estudar os efeitos do estresse salino e de baixa temperatura *in vitro*, cultivares de taro e mandioca tuberizadas em meio MS foram transferidas para meio com diferentes concentrações salinas (0, 50, 75 e 100 mmol L<sup>-1</sup> de NaCl) ou submetidas a diferentes temperaturas (5°, 10° e 25°C), por um período de 7 dias. Foram mensurados os níveis de etileno aos 5, 20 e 40 dias de cultivo para o experimento de estresse salino, e aos 3 e 7 dias para os de estresse térmico. Também, foram realizadas análises bioquímicas de enzimas antioxidantes (POD, PPO e CAT) e isoenzimas, além da análise das características morfológicas decorrentes do estresse abiótico. A adição de NaCl ao meio de cultivo induziu o estresse oxidativo, caracterizado pelo aumento da atividade das enzimas POD e CAT, e elevada concentração de etileno em mandioca. Em meio líquido, o NaCl elevou a produção de etileno e aumento da atividade da CAT na mandioca 'Parazinha'; verificou-se também, diferença de tolerância ao estresse térmico e salino entre as cultivares de mandioca e taro. A baixa temperatura, em mandioca, também estimulou a atividade das enzimas POD e CAT, havendo diferença na atividade de enzimas em relação às partes da planta, e ainda, aumento da produção de etileno. Além disso, em taro, constatou-se duas isoenzimas para POD e PPO nos rizomas, havendo uma para POD e duas para PPO na parte aérea. Contudo, no sistema radicular de mandioca verificou-se duas isoenzimas para POD e uma para PPO.

## ABSTRACT

FOGAÇA, Cláudia Martellet, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, March of 2007. **Tolerance to salt and thermal stresses in cultivars of taro and cassava tuberized in vitro.** Adviser: Fernando Luiz Finger. Co-Advisers: Wagner Campos Otoni and Mário Puiatti.

Tuberization is a complex process of the plant development, influenced by genetic, environmental and physiological factors, characterized by changes in the plant anatomy, hormones and biochemistry. Thus the tuberization *in vitro*, in addition to promote fast vegetative propagation, clean plants from diseases, conservation and exchange of germoplasms, is an excellent experimental tool for the study and control of tuber formation. With the goal to induce the micro tuberization *in vitro*, cultivars of cassava and taro were grown with different conditions, containing BAP and ANA, and rates of sucrose (3%, 6% and 8% w/v) with differentiated light regime. It was analyzed the length of aerial portion (CPA), number of roots (NR), diameter of the rhizomes (DR), pattern of the micro tubers development and anatomical changes. Based on results, it was verified that both taro and cassava respond to tuberization *in vitro*. The cultivar of taro Japonês showed the best response to the induction of micro rhizomes, in particular for the treatment containing 22.2  $\mu\text{M}$  BAP and 8% sucrose. For the cassava, the cultivar Parasinha had better formation of tuber roots with 0.4  $\mu\text{M}$  BAP, 1.6  $\mu\text{M}$  ANA and 8% sucrose, in both semi solid and liquid growth media. The length of aerial portion, length of the longest root and number of roots were better in the cultivar of cassava Mantiqueira, but the induction of tuber roots was recalcitrant. Anatomically, the micro tubers were characterized by the presence of starch grains in both micro rhizomes and tuber roots of taro and cassava respectively. In order to study the effect of salt and low temperature *in vitro* grown cultivars of taro and cassava in MS medium containing different concentrations of salt (0, 50, 75 and 100  $\text{mmol L}^{-1}$  NaCl) or grown at different temperatures (5, 10 and 25°C), for seven days. It was measured the level of ethylene at 5, 20 and 40 days under the salt stress and at 3 and 7 for the thermal stress. Also, it was determined the activity of oxidative enzymes

(POD, PPO and CAT), presence of isozymes and morphological changes during the stresses. The addition of NaCl in the growth media induced oxidative stress, characterized by the increase in the activity of POD and CAT, and elevated concentration of ethylene in cassava. In the liquid media, the NaCl increased the production of ethylene and higher activity of CAT in the cultivar Parasinha; it was evident, the differences in tolerance to the stresses among the cultivars of cassava and taro. The low temperature, in cassava, also increased the activity of POD and CAT, with differences in the different tissues, accompanied by elevated ethylene production. In taro it was detected two isozymes for POD and PPO in the rhizomes, with one POD and two PPO in the aerial portion. For the roots system, in cassava, it was identified two isozymes for POD and one for PPO.

## INTRODUÇÃO GERAL

As culturas de mandioca e taro são amplamente difundidas nos países em desenvolvimento de clima tropical, pois apresentam como componente principal o amido, o qual é indicado como grande potencial na alimentação animal e humana.

Os principais polissacarídeos de reserva dos vegetais em tubérculos e raízes tuberosas é o amido (batata, mandioca), juntamente com a sacarose (beterraba e cenoura). O amido é armazenado temporariamente nos cloroplastos e, em seguida, na biossíntese da sacarose, que é a principal forma de transporte dos carboidratos, através do floema, sendo então deslocada aos pontos de crescimento ou armazenamento (Taiz & Zeiger, 2004).

O amido, polímero de glicose, contém amilose e amilopectina em sua estrutura (Woiciechowski et al., 2002), destacando-se como a principal reserva nas plantas superiores, fornecendo de 70 a 80% das calorias consumidas pelo corpo humano. Os depósitos permanentes de amido nas plantas ocorrem nos órgãos de reserva como é o caso de sementes, em cereais (milho e arroz) e de tubérculos e raízes (batata e mandioca, taro) (Leonel & Cereda, 2002).

As indústrias alimentícias são as maiores consumidoras de amido, entretanto, este polímero é usado também em grande número de processos industriais, destacando-se seu uso pelas indústrias química e têxtil. Neste ponto, os países em regiões tropicais, como o Brasil, estão em grande vantagem dentre os produtores de amido no mundo localizados em regiões temperadas, devido à variedade de culturas tropicais amiláceas (Camargo Filho et al., 2001).

Estas informações são importantes na tomada de decisão pelas indústrias produtoras de amido, pois se existir mercado para algum tipo de amido será preciso realizar trabalhos de melhoria de rendimento da cultura, visto que nenhuma dessas culturas tem sido plantada com o objetivo de produção de amido comercial (Leonel & Cereda, 2002).

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz.), originária da América do Sul, é uma planta arbustiva, dicotiledônea, perene, heliófila, da família

Euphorbiaceae. O gênero *Manihot* possui cerca de 200 espécies estudadas, e ocorre principalmente em regiões de clima tropical (Figueiredo, 1996). É uma espécie altamente heterozigótica e poliplóide ( $2n=4x=36$ ), pela qual razão sua propagação geralmente é feita por estacas (manivas) e não por sementes (Junqueira, 2001).

A raiz de mandioca é o terceiro mais importante alimento energético nos trópicos, após o arroz e o milho. O Brasil produz cerca de 25 milhões de toneladas anuais (FAO, 2000). O consumo *per capita* é de aproximadamente 70 kg/ano. A região Nordeste tem o consumo de 150 kg/*per capita*/ano, constituindo-se a maior parte deste consumo como farinha (60 kg/hab/ano), ressaltando-se que cerca de 50% da produção é utilizada como ração animal (CIAT, 2004).

A África (69 milhões de ton/ano) e a Ásia (51 milhões de ton/ano) são os maiores produtores mundiais. Em países como o Zaire, o consumo *per capita* é de 390,9 kg/ano, denotando que a mandioca é a principal fonte alimentar de seus habitantes, o que ocorre em outros países do terceiro mundo (Reilly et al., 2001).

Originário da Ásia, o taro (*Colocasia esculenta* L. Schott), outrora popularmente conhecido como inhame, passou a ter a denominação definitiva de taro, segundo a nova nomenclatura proposta por Pedralli et al. (2002). É uma espécie com larga distribuição geográfica, especialmente nas regiões tropicais; rico em amido e considerado cultura típica de subsistência (Carvalho, 1991). Pertencente à família Araceae, que compreende cerca de 104 gêneros e 3700 espécies, seus representantes ocorrem naturalmente em todos os continentes, exceto na Antártica, sendo predominantemente tropicais (IAS, 2003).

Pode ser cultivado tanto em áreas de solo seco e alagadas; a cultura apresenta elevado rendimento por unidade de área, fácil conservação e alto valor nutritivo e resistência a pragas e doenças. O taro é propagado pelo plantio do rizoma-mãe ou central (cabeça) e rizomas laterais ou filhos, constituindo os últimos melhores materiais de propagação (Carvalho, 1991).

A maturidade fisiológica é alcançada quando o conteúdo de açúcares totais dos rizomas é mínimo. A translocação mais rápida de fotoassimilados (açúcares) em plantas de taro ocorre durante o verão e quando a

temperatura das folhas e dos pecíolos está na faixa de 20 a 30°C (Soares, 1991).

Os açúcares resultantes do processo fotossintético são translocados do limbo foliar para os pecíolos, local onde, dependendo da planta, ocorre menor ou maior armazenamento desses açúcares; a translocação prossegue até os rizomas, onde ocorre a síntese do amido de reserva e, conseqüentemente, o crescimento dos rizomas filhos. Por essa razão, condições que propiciem as plantas de taro manter as folhas com grandes limbos e pecíolos exuberantes têm o potencial de proporcionar plantas mais produtivas (Puiatti et al., 2003).

A microtuberização *in vitro* tornou-se ainda mais importante para a rápida propagação de tubérculos livres de doenças (manutenção e manipulação desse material), como também, facilidade de conservação e transferência de microtubérculos (Zobayed et al., 2001), como no transporte de germoplasma, e ainda na produção de plantas em larga escala (Hussey & Stacey, 1984). Além disso, o rápido período de desenvolvimento dos microtubérculos torna o sistema de melhor operacionalidade, prontamente programável, com possibilidade de uso durante todo o ano, demandando pouco espaço e, portanto, mais efetivo do que o uso de plantas inteiras (Debon et al., 1998). Dessa forma, o uso da cultura *in vitro* propicia a obtenção e seleção de indivíduos uniformes que podem ser usados nos estudos dos aspectos morfogênicos do processo de tuberização sob condições controladas (Ulloa et al., 1997).

A tuberização é definida como um forte dreno de armazenamento, podendo a estrutura tuberosa, em algumas espécies, atuar como fonte quando a planta está em crescimento ou sob estresse (Han et al., 2001). É um complexo processo de desenvolvimento que é influenciado por variáveis genéticas, ambientais e fisiológicas (Villafranca et al., 1998).

No entanto, nas condições *in vitro* este processo ainda não está totalmente esclarecido, uma vez que existem vários trabalhos (Silva et al., 2001; Omokolo et al., 2003; Nhut et al., 2004; Allemann & Hammes, 2006) com diferentes culturas tentando caracterizar a tuberização. Entretanto, até o momento não foi estabelecido um consenso sobre este processo que necessita de mais estudos com a finalidade de identificar anatomicamente

as fases iniciais de desenvolvimento de raízes tuberiformes, bem como, a formação de microrizomas.

Além disso, as técnicas de cultura de tecidos têm sido utilizadas em estudos de seleção ou avaliação da tolerância de plantas, sendo, em alguns casos, vantajosas pela relativa rapidez de resposta e pela possibilidade de controle das condições ambientais (Silva et al., 2001), podendo contribuir na elucidação diante das alterações morfológicas e bioquímicas provenientes das condições de estresse salino e térmico.

As desordens ou injúrias causadas pela a exposição dos tecidos a baixas temperaturas, porém acima do ponto de congelamento, são denominadas injúria por frio (*chilling*). Plantas sensíveis ao frio sob condições de estresse apresentam, inicialmente, modificação na fase lipídica das membranas, alteração na cinética ou na especificidade das enzimas reguladoras, e modificação na estrutura celular ou aumento do cálcio citosólico (Chitarra & Chitarra, 2005). Posteriormente, ocorre estímulo à síntese de etileno, aumento na respiração, alteração na estrutura celular, redução da fotossíntese, aumento da permeabilidade de membrana e modificação nos mecanismos de produção de energia, acarretando em descolorações, depressões superficiais, colapso interno, favorecendo a doenças e promovendo danos (Menolli, 2006).

Existem técnicas de pós-colheita que visam prolongar a vida de prateleira de produtos hortícolas. Dentre essas técnicas, a refrigeração, procedimento pós-colheita relativamente simples, reduz o metabolismo do produto, permitindo menor perda de água do órgão armazenado e dificultando o desenvolvimento de doenças pós-colheita. Porém esta técnica requer certos cuidados quanto a temperatura a ser utilizada, pois temperaturas na faixa de 5°C a 15°C podem causar desordens fisiológicas em espécies tropicais e subtropicais (Menolli, 2006).

Um ponto chave na redução nos danos causados por estresse ao frio, são as aplicações exógenas na planta de ácido abscísico (ABA), o qual induz a tolerância ao frio em plantas de trigo e em cultura de células. O papel do ABA é muito importante na transdução de sinais em resposta ao frio, e pode afetar a translocação de açúcares mediante interação específica com os canais de potássio (Kerepesi et al., 2004).

A salinidade também induz uma gama de perturbações em nível celular como na planta inteira, que resulta em inúmeros processos prejudiciais que incluem acumulação de níveis tóxicos de íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$ , redução na disponibilidade de nutrientes, inibição do crescimento e da fotossíntese na maioria das plantas, modificação no status de água nos tecidos, e secundariamente, como o estresse oxidativo ligado à produção de espécies de oxigênios reativos (Bajji et al., 1998; Chen et al., 1998;). Produtos de estresse oxidativo incluem espécies de oxigênios reativos (ROS), como o radical superóxido ( $\cdot\text{O}_2^-$ ), peróxido de hidrogênio, oxigênio singleto e radical hidroxila ( $\cdot\text{OH}$ ) (Morsy et al., 2007).

Embora na natureza as plantas estão envolvidas num rigoroso mecanismo adaptativo para enfrentar a presença do sal no seu ambiente, a compreensão deste mecanismo ainda permanece incompleta, principalmente por causa da complexidade do estresse salino, que apresenta de um lado um componente iônico, e por outro, um componente osmótico (Lutts et al., 1996), que envolve mudanças morfológicas, fisiológicas e metabólicas. Essas mudanças permitem que a planta restabeleça suas condições permitindo seu crescimento mesmo sob estresse (Radic et al., 2006).

Solutos orgânicos, como os carboidratos podem realizar importante papel como osmoprotetores para contrabalançar o efeito tóxico do  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  em muitas espécies de plantas que estão sob estresse salino (Evers et al., 1997). O mecanismo de ajustamento osmótico refere-se ao baixo potencial osmótico devido à acumulação de solutos em resposta ao déficit de água ou à salinidade; isto é fundamental na conservação do turgor, que faz a manutenção da atividade metabólica da planta e, portanto, o crescimento e a produtividade (Balibrea et al., 1997).

O melhoramento clássico de plantas tem limitado sucesso na seleção de plantas tolerantes à salinidade em muitas espécies. Em parte, isto é devido principalmente a características fisiológicas e bioquímicas que contribuem para a aquisição de resistência ao sal, regulados por diferentes níveis de organização. Em outras palavras, a tolerância à salinidade não é conferida por um único fator genético, e sim por características de natureza multigênica (Vinocur & Altman, 2005).

Embora sejam bem conhecidas as conseqüências tanto do estresse térmico como do salino, há muitas dificuldades no controle e na compreensão das alterações bioquímicas e morfológicas que ocorrem nas plantas sob estas condições.

Este trabalho visa, primeiramente, estabelecer um protocolo de formação de microrizomas e de raízes tuberiformes *in vitro* de cultivares de taro (Chinês e Japonês) e mandioca (Parazinha, Vassourinha e Mantiqueira), bem como a caracterização morfológica e anatômica do desenvolvimento de microtubérculos, e verificar, ainda, as alterações bioquímicas que ocorrem nestas estruturas desenvolvidas sob condições de estresses salino e térmico.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEMANN, J. & HAMMES, P.S. Effect of photoperiod on tuberization in the Livingstone Potato (*Plectranthus esculentus* N.E.Br Lamiaceae). **Field Crops Research**, 98: 7-81, 2006.

BAJJI, M, KINET, J-M., LUTTS, S. Salt stress effects on roots and leaves of *Atriplex halimus* L. and their corresponding callus cultures. **Plant Science**, 137: 131-142, 1998.

BALIBREA, M.E., RUS-ALVAREZ, A.M., BOLARÍN, M.C., PÉRES-ALFOCEA, F. Fast changes in soluble carbohydrates and proline contents in tomato seedlings in response to ionic and no-ionic iso-osmotic stresses. **Journal of Plant Physiology**, 151: 221-226, 1997.

CAMARGO FILHO, W.P., MAZZEI, A.R., ALVES, H.S. Mercado de raízes e tubérculos: análise e preços. **Informações econômicas**, 31: 36-44, 2001.

CARVALHO, E.F. Propagação de inhame (*Colocasia esculenta* (L.) Schott) pelo método de divisão de rizomas. **Ciência Agrônômica de Fortaleza**, 22: 61-66, 1991.

CENTRO INTERNACIONAL DE AGRICULTURA TROPICAL (CIAT). Yuca: Lo ultimo acerca de um cultivo milenario. Cali. **Boletim informativo**, CIAT, 2004.

CHEN, D.M., KEIPER, F.J., FILIPPIS, L.F.D. Physiological changes accompanying the induction of salt tolerance in *Eucalyptus microcorys* shoots in tissue culture. **Journal of Plant Physiology**, 152: 555-563, 1998.

CHITARRA, M.I.F. & CHITARRA, A.B. **Pós-colheita de frutas e hortaliças: fisiologia e manuseio**. Lavras. ESAL/FAEPE, 783p, 2005.

DEBON, S.J.J., TESTER, R.F., MILLAM, S., DAVIES, H.V. Effect of temperature on the synthesis, composition and physical properties of potato microtubers starch. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 76: 599-607, 1998.

EVERS, D., SCHMIT, C., MAILLIET, Y., HAUSMAN, J.F. Growth characteristics and biochemical changes of poplar shoots *in vitro* under sodium chloride stress. **Journal of Plant Physiology**, 151: 748-753, 1997.

FOOD AND AGRICULTURE OF THE UNITED NATIONS (FAO). **A new strategy for cassava**. FAO: Rome, 2000.

HAN, Y., GÓMEZ-VÁSQUEZ, R., REILLY, K., LI, H., TOHME, J., COOPER, R.M., BEECHING, J.R. Hydroxyproline-rich glycoproteins expressed during stress responses in cassava. **Euphytica**, 120: 59-70, 2001.

HUSSEY, G. & STACEY, N.J. Factors affecting the formation of *in vitro* tubers of potato (*Solanum tuberosum* L.). **Annals Botany**, 53: 565-578, 1984.

IAS, INTERNATIONAL AROID SOCIETY. 2003 [Online]. **The genera Araceae**. Homepage: <http://www.aroid.org/genera/index.html#a>

JUNQUEIRA, C.S. **Micropropagação de cultivares de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz.): embriogênese somática e multibrotação**. Viçosa, 2001. 52p. (Tese – Mestrado em Fitotecnia, Universidade Federal de Viçosa, MG).

KEREPESI, I., BANYAI-STEFANOVITS, E., GALIBA, G. Cold acclimation and abscisic acid induced alterations in carbohydrate content in calli of wheat genotypes differing in frost tolerance. **Journal of Plant Physiology**, 161: 131-133, 2004.

LEONEL, M. & CEREDA, M.P. Caracterização físico-química de algumas tuberosas amiláceas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 22: 65-69, 2002.

LUTTS, S., KINET, J.M., BOUHARMONT, J. Effects of various salts and of mannitol on ion and praline accumulation in relation to osmotic adjustment in rice (*Oryza sativa* L.) callus cultures. **Journal of Plant Physiology**, 149: 186-195, 1996.

MENOLLI, L.N. **Atuação das enzimas oxidativas em raízes de batata-baroa (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft) submetidas a injúria por frio.** Viçosa: UFV, 2006. 63p. (Dissertação - Mestrado em Fisiologia Vegetal, Universidade Federal de Viçosa, MG).

MORSY, M.R., JOUVE, L., HAUSMAN, J.F., HOFFMANN, L., STEWART, J.M. Alteration of oxidative and carbohydrate metabolism under abiotic stress in two rice (*Oryza sativa* L.) genotypes contrasting in chilling tolerance. **Journal of Plant Physiology**, 164 (1): 157-167, 2007.

NHUT, D.T., HUONG, N.T.D., KHIRM, D.V. Direct microtuber formation and enhanced growth in the acclimatization of in vitro plantlets of taro (*Colocasia esculenta* spp.) using hydroponics. **Scientia Horticulturae**, 101: 207-212, 2004.

OMOKOLO, N.D., BOUDJEKO, T., TSAFACK TAKADONG, J.J. *In vitro* tuberization of *Xanthosoma sagittifolium* L. Shott: effects of phytohormones, sucrose, nitrogen and photoperiod. **Scientia Horticulturae**, 98: 337-345, 2003.

PEDRALLI, G., CARMO, C.A.S., CEREDA, M., PUIATTI, M.. Uso de nomes populares para as espécies de Araceae e Dioscoreaceae no Brasil. **Horticultura Brasileira**, 20: 530-532, 2002.

PUIATTI, M., KATSUMOTO, R., PEREIRA, F.H.F., BARRELLA, T.P. Crescimento de plantas e produção de rizomas de taro 'Chinês' em função do tipo de muda. **Horticultura Brasileira**, 21: 110-115, 2003.

RADIC, S. RADIC-STOJKOVIC, M., PEVALEK-KOZLINAB. Influence of NaCl and manitol on peroxidases activity and lipid peroxidation in *Centaurea ragusina* L. roots and shoots. **Journal of Plant Physiology**, 16: 1284-1292, 2006.

REILLY, K, HAN, Y., TOHME, J., BEECHING, J.R. Isolation and characterization of a cassava catalase expressed during post-harvest physiological deterioration. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1518: 317-323, 2001.

SILVA, J.A.B., OTONI, W.C., MARTINEZ, C.A. DIAS, L.M., SILVA, M.A.P. Microtuberization of Andean potato species (*Solanum* spp.) as effected by salinity. **Scientia Horticulturae**, 89: 91-101, 2001.

SOARES, J.G. **Crescimento do inhame (*Colocasia esculenta* (L.) Schott) em duas condições agroclimáticas, em seis níveis de água e cobertura morta**. Viçosa, 1991. 85p. (Tese – Mestrado em Fitotecnia, Universidade Federal de Viçosa, MG).

TAIZ, L. & ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Artmed Editora Ltda. Porto Alegre, 3 ed., p 346-481, 2004.

ULLOA, R.M., MAC INTOSH, G.C., MELCHIORRE, M., MENTABERRY, A.N., DALLARI, P., MORICONI, D.N., TÉLLEZ-IÑÓN, M.T. Protein kinase activity in different stages of potato (*Solanum tuberosum* L.) microtuberization. **Plant Cell Reports**, 16: 426-429, 1997.

VILLAFRANCA, M.J., VERAMENDI, J., SOTA, V., MINGO-CASTEL, A.M. Effect of physiological age of mother tuber and number of subcultures on *in vitro* tuberization of potato (*Solanum tuberosum* L.). **Plant Cell Reports**, 17: 787-790, 1998.

VINOCUR, B. & ALTMAN, A. Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations. **Current Opinion in Biotechnology**, 16: 123-132, 2005.

WOICIECHOWSKI, A.L., NITSCHKE, S., PANDEY, A., SOCCOL, C.R. Acid and enzymatic hydrolysis to recover reducing sugars from cassava bagasse: an economic study. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 45: 393-400, 2002.

ZOBAYED, S.M., ARMSTRONG, J., ARMSTRONG, W. Micropropagation of potato: evaluation of closed, diffusive and forced ventilation on growth and tuberization. **Annals of Botany**, 87: 53-59, 2001.

## CAPÍTULO I

---

### Microtuberização *In Vitro* de Cultivares de Mandioca e Taro

#### RESUMO

A tuberização é um complexo processo de desenvolvimento que é influenciado por variáveis genéticas, ambientais e fisiológicas. Este processo é caracterizado por significativas mudanças anatômicas, hormonais e bioquímicas. No entanto, não há relatos na literatura visando à obtenção de microtubérculos de taro *in vitro* e os trabalhos com mandioca concentram-se no desenvolvimento de sistemas de conservação, propagação e regeneração *in vitro*. Com o objetivo de induzir a microtuberização *in vitro* de cultivares de mandioca (*Manihot esculenta* C.) e de taro (*Colocassia esculenta* L.) foi analisado a ação dos reguladores de crescimento, BAP e ANA, sob diferentes concentrações, diferentes doses de sacarose (3%, 6% e 8%), e alterações anatômicas. Características morfológicas como comprimento médio da parte aérea (CPA), NR, DR, padrão de desenvolvimento dos microtubérculos, e características anatômicas foram analisadas. Com base nos resultados verificou-se que: a) as cultivares de taro e mandioca respondem diferentemente à microtuberização *in vitro*; b) a cultivar de taro Japonês respondeu melhor ao processo de indução de microrizomas em relação a cultivar Chinês; c) o tratamento com 22,2  $\mu$ M BAP e 8% sacarose permitiu obter maior sucesso no processo de formação de microrizomas; d) em mandioca, a cultivar Parazinha respondeu melhor à indução de raiz tuberiforme; e) o tratamento com 0,4  $\mu$ M BAP, 1,6  $\mu$ M ANA e 8% sacarose, induziu a formação de raiz tuberiforme em mandioca, tanto em meio semisólido como em meio líquido; f) as características morfológicas comprimento médio da parte aérea, comprimento médio da raiz mais longa (cm) e número médio de raízes, destaca-se a cultivar de mandioca Mantiqueira, porém, em meio de indução à raiz tuberiforme esta cultivar foi recalcitrante; h) a microtuberização *in vitro* foi caracterizada pela presença de grãos de amido nos microrizomas e raízes tuberiformes de taro e mandioca, respectivamente.

# CAPÍTULO I

## MICROTUBERIZAÇÃO *IN VITRO* DE CULTIVARES DE MANDIOCA E TARO

### 1. INTRODUÇÃO

As culturas de mandioca e taro constituem um dos principais alimentos energéticos que podem ser obtidos em grande escala com baixo custo nos países em desenvolvimento. São espécies que se adaptam muito bem às condições tropicais e desenvolvem-se em solos pobres, pois atualmente, ainda são cultivadas em pequenas áreas com baixo nível tecnológico.

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz.), é conhecida pela rusticidade e pela função social que desempenha junto às populações de baixa renda, a cultura de mandioca tem grande adaptabilidade aos diferentes ecossistemas, o que possibilita o seu cultivo praticamente em todo o território nacional (Reis, 1987). Situando-se entre os nove primeiros produtos agrícolas do país, em de área cultivada, e o sexto em valor de produção (FAO, 2000). Embora, não possa ser considerada alimento completo, a mandioca é de vital importância nos países subdesenvolvidos já que é extraordinária fonte de carboidratos (Junqueira, 2001). Sua principal parte, sob o aspecto econômico, são as raízes tuberosas, ricas em amido. Já a parte aérea da planta, geralmente desprezada, tem grande potencial na alimentação animal e humana (CIAT, 2004).

Contudo, alguns fatores interferem negativamente na produtividade desta cultura, sendo a rápida deterioração pós-colheita o mais significativo. Entre 24-48 horas após a colheita, dependendo da cultivar, raízes de mandioca são alteradas, se tornam não palatáveis e não são aceitas no mercado. As alterações que ocorrem nas raízes devido à deterioração pós-colheita são as mesmas observadas em resposta a injúrias mecânicas e estresse induzido (Han et al., 2001). Outro fator severo que limita a produtividade é a bacteriose (*Xanthomonas campestris* pv. manihots), doença que causa murcha, seca e queda das folhas, culminando com a morte da planta (Junqueira, 2001).

Espécies tuberosas, como a mandioca, apresentam órgãos de reservas com desenvolvimento subterrâneo. A formação de raízes de mandioca a campo é consequência, principalmente, da elevada produção de elementos do xilema e floema provenientes da atividade do câmbio, seguida do depósito de substâncias de reserva, principalmente amido e sacarose, nas células parenquimáticas (Figueiredo, 1996).

O taro (*Colocasia esculenta* L. Schott) é uma espécie rizomatosa cujo componente principal dos rizomas é o amido, conhecido por apresentar grânulos relativamente pequenos, quando comparado a outras amiláceas, com digestibilidade da ordem de 97%, proporcionando eficiente liberação dos componentes durante a digestão. Apesar dessas características, os rizomas centrais (cabeças) têm baixo valor de comercialização e normalmente são eliminados na propriedade rural devido ao sabor às vezes “aguado” e o aspecto visual pouco atraente aos olhos do consumidor (Puiatti et al., 2003).

A importância dos rizomas de taro não se limita apenas como fonte de carboidratos e proteínas, mas por suplementar com vitaminas e sais minerais essenciais, as dietas à base de cereais deficientes nestes nutrientes. Ainda, por sua rusticidade de cultivo e valor nutricional, o taro tem sido sugerido pela FAO (Food and Agriculture Organization), juntamente com outras espécies produtoras de tubérculos e raízes tuberosas, como cultura alternativa para aumentar a base alimentar de países em desenvolvimento (Pereira et al., 2003).

Um dos principais problemas para se implantar a cultura é a falta de material propagativo. A propagação convencional por rizomas exige muito tempo e é onerosa em razão do grande volume de material a transportar e da necessidade de grandes áreas para produção do material de propagação. O método de produção de mudas por divisão de rizomas pode constituir uma alternativa viável para solucionar o problema da escassez de material de plantio, reduzir o tempo e os custos de produção desse material (Carvalho, 1991).

Entretanto, o uso de microtubérculos crescidos *in vitro* tem potencial de oferecer algumas vantagens consideráveis sobre os tubérculos crescidos no solo. Primeiro, é notoriamente difícil o acesso preciso no estágio de

desenvolvimento desejado em tubérculos crescidos no solo, particularmente, nos primeiros estádios. Tubérculos crescidos no solo podem ter aparentemente o mesmo tamanho, porém apresentar tremenda variabilidade em seus status metabólicos. Em contraste, a rapidez, a sincronia e a reprodutibilidade na localização da iniciação do microtubérculo *in vitro* permitem que o estágio de pós-colheita seja definido precisamente. Segundo, microtubérculos *in vitro* têm grande potencial como sistema experimental para o fluxo de análises, as quais não podem ser feitas *in situ* (Veramendi et al., 1999). Tornando-se menos propensos aos danos que ocorrem quando cultivados a campo, e podendo ser armazenados por longos períodos sem afetar sua variabilidade (John et al., 1993). Melhoramento nas técnicas agrônomicas e utilização de ferramentas da genética moderna podem permitir que este tubérculo seja cultivado e comercializado extensivamente (Pérez et al., 2005).

A tuberização é um complexo processo de desenvolvimento que é influenciado por variáveis genéticas, ambientais e fisiológicas (Villafranca et al., 1998). Este processo é caracterizado por significativas mudanças anatômicas, hormonais e bioquímicas (Ross et al., 1994). Os principais estudos do processo de tuberização realizaram-se, na sua maioria, com a batata (*Solanum tuberosum* L.) No entanto, não há relatos de trabalhos visando à obtenção de microrizomas de taro *in vitro*, e os trabalhos com mandioca concentram-se no desenvolvimento de sistemas de conservação, propagação e regeneração (Figueiredo, 1996).

Trabalhos com microtuberização em batata (Villafranca et al., 1998; Hussey & tacey, 1984; Nowak & Colborne, 1989) têm focado principalmente o uso de reguladores de crescimento como aspecto favorável na elucidação dos fenômenos bioquímicos envolvidos na formação do tubérculo (Silva et al., 2001); o mesmo foi observado por Lopez-Delgado & Scott (1997) evidenciando que os estímulos que levam à tuberização são de natureza hormonal. Da mesma forma, verificou-se em estudos de microtuberização de inhame (*Dioscorea* spp.) a importância dos reguladores de crescimento durante o processo de tuberização (Lauzer et al., 1992; Kim et al., 2003).

Dentre os fatores ambientais, o fotoperíodo é considerado como determinante na tuberização (Allemamm & Hammes, 2006), podendo variar

conforme a cultura. Trabalhos com fotoperíodos (Hussey & Stacey, 1984; Peres et al., 2005; Allemamm & Hammes, 2006) relataram que, principalmente, dias curtos favorecem as respostas fotoperiódicas, tanto no florescimento como na tuberização de batata. No entanto, tem-se sugerido que dias longos favorecem a formação do microrizoma em plantas que apresentam rizomas, como foi observado em *Dioscorea*, onde fotoperíodos longos (12 e 16 h) aumentaram a indução de microtubérculos (John et al., 1993), como também promoveram a bulbificação em alho (Kahane et al., 1992).

Outro ponto chave deste processo são os níveis de açúcares no meio de cultura, especialmente a sacarose. Xu et al. (1998), em batata, e Omokolo et al. (2003), em taioba, constataram que concentrações elevadas de sacarose também afetam a tuberização *in vitro*. De acordo com isso, um estudo realizado em batata confirma a importância da sacarose no meio de cultura e ressalta a relação fonte-dreno entre a parte aérea e o tubérculo em desenvolvimento (Peres et al., 2005).

Com relação ao aspecto anatômico do processo de tuberização, há contradições, pois na mandioca a formação da raiz tuberosa é resultado da atividade cambial, seguida de depósito de amido predominantemente nas células do parênquima do xilema secundário (Figueiredo, 1996). No caso da batata, inicialmente ocorre intensa divisão celular, seguida do alongamento das células, divisões das células parenquimáticas próximas ao floema e depósito de amido (Ewing & Struik, 1992).

Portanto, são inúmeros os fatores que podem influenciar a microtuberização, entretanto há detalhes que ainda permanecem desconhecidos. Diante do exposto, objetivou-se com este trabalho induzir o processo de microtuberização *in vitro* de cultivares de mandioca e de taro sob a ação diferentes reguladores de crescimento, concentrações de sacarose e verificar as alterações estruturais ocorridas decorrentes do processo de tuberização.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Material Vegetal

As cultivares de taro (*Colocasia esculenta* L. Schott) estudadas foram Chinês e Japonês, BGH/UFV, obtidas da área experimental da Horta de Pesquisas da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, Minas Gerais. Seus rizomas foram submetidos ao processo de assepsia no Laboratório de Progênes de Hortaliças da UFV, e logo após foram inoculados em meio MS (Murashige e Skoog, 1962), para o estabelecimento das culturas. As cultivares de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz.) utilizadas no estudo foram 'Mantiqueira', obtida do Laboratório de Cultura de Tecidos/BIOAGRO/UFV e 'Parazinha' e 'Vassourinha', da EMBRAPA/CERNAGEN, Brasília-DF, já em condições assépticas.

### 2.2. Estabelecimento e Manutenção das Culturas

As plantas de taro foram cultivadas *in vitro* a partir das gemas apicais obtidas do rizoma mãe. Foi utilizado o meio de cultura constituído dos sais MS, suplementado de mio-inositol (0,01%, p/v; Sigma Chem. Co., USA), complexo vitamínico de MS (0,02% p/v de glicina, 0,005% p/v de ácido nicotínico, 0,005% p/v de piridoxina.HCl e 0,001% p/v de tiamina.HCl), sacarose (3%; p/v), 8,88  $\mu\text{M}$  de BAP (6-Benzilaminopurina; Sigma Chem. Co., USA), e solidificado com Fitagel (Sigma Chem. Co., USA) a 0,23 % (p/v).

As cultivares de mandioca foram propagados *in vitro* mediante subcultivos mensais empregando-se segmentos nodais cultivados em meio MS, adicionado de mio-inositol (0,01% p/v), vitaminas de MS e sacarose (3% p/v), desprovido de reguladores de crescimento e solidificado com Fitagel (0,23%).

O pH dos meios foi corrigido para  $5,7 \pm 0,1$ , utilizando-se alíquotas de 12 mL por tubo de ensaio, vedados com tampa de poliestireno. A autoclavagem dos meios foi a 120°C e a 1,5 atm, durante 15 minutos. As culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura controlada e irradiância de 50-60  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

Esta etapa teve como meta a micropropagação das cultivares, para estabelecimento de culturas estoques a serem usadas como fonte de material vegetal durante todo o trabalho.

### 2.3. Condições de Microtuberização

Esta fase teve por objetivo a obtenção de microrizomas de taro e raízes tuberiformes de mandioca *in vitro*. Após, aproximadamente, três subcultivos ( $\pm 40$  dias cada) tanto a cultura de taro como a de mandioca foram conduzidos aos diferentes meios de microtuberização.

#### 2.3.1. Microtuberização de Taro

Em todos os experimentos o pH dos meios foi corrigido para  $5,7 \pm 0,1$ , antes da autoclavagem. Os experimentos foram conduzidos sob regime luminoso de 16 horas de luz e oito horas diárias de escuro, à temperatura de  $27 \pm 1^\circ\text{C}$  e irradiância de  $50-60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . As duas cultivares (Chinês e Japonês) foram analisadas em todos os ensaios, e as características analisadas foram: comprimento médio da parte aérea (CPA), diâmetro do rizoma (DR), em centímetros, e número médio de brotos (NB).

A resposta morfogênica das duas cultivares de taro foi avaliada aos 60 dias após a aplicação dos tratamentos.

##### 2.3.1.1. Experimento 1:

Brotos das cultivares Chinês e Japonês, no terceiro subcultivo foram utilizados como explantes e inoculados *in vitro* em meio de indução de microtuberização, que contém meio MS, suplementado de mio-inositol (0,01%), vitaminas de MS,  $8,88 \mu\text{M}$  de BAP, diferentes concentrações de sacarose, solidificado com Fitigel (0,23%), constituindo quatro tratamentos, Tabela 1.

Tabela 1: Tratamentos do experimento 1

T1= MS0 + 3% (p/v) sacarose
T2= 8,88 $\mu$ M BAP + 3% sacarose
T3= 8,88 $\mu$ M BAP + 6% sacarose
T4= 8,88 $\mu$ M BAP + 8% sacarose

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial de 2x4, duas cultivares e quatro tratamentos, com 10 repetições. Cada unidade experimental foi composta por um frasco contendo uma planta, totalizando 40 unidades amostrais por cultivar.

O processo de indução de microrizomas das cultivares de taro iniciou-se com base nos trabalhos que já vinham sendo realizados no laboratório, que tinham como objetivo apenas a propagação e a conservação das cultivares. A indução dos microrizomas sempre ocorreu em meio MS semisólido.

### 2.3.1.2. Experimento 2

Este meio de formação de microrizomas constou de uma fase de indução de 15 dias, com o tratamento controle T1 = MS0 + 3% de sacarose e os demais tratamentos acrescidos de 4,88  $\mu$ M de BAP com mesmo nível de sacarose, totalizando quatro tratamentos. A segunda fase do processo de microtuberização foi denominada formação, que agregou aumento na concentração da citocinina, como também, diferentes concentrações de sacarose. Ambas as fases são compostas por meio MS, suplementado de mio-inositol (0,01%), complexo vitamínico de MS e solidificado com Fitagel (0,23%), resultando nos seguintes tratamentos (Tabela 2):

Tabela 2: Tratamentos do experimento 2

<b>Indução</b>	<b>Formação</b>
T1= MS0 + 3% (p/v) sacarose	T1= MS0 + 3% sacarose
T2= 4,88 $\mu$ M BAP + 3% sacarose	T2= 26,64 $\mu$ M BAP + 3% sacarose
T3= 4,88 $\mu$ M BAP + 6% sacarose	T3= 26,64 $\mu$ M BAP + 6% sacarose
T4= 4,88 $\mu$ M BAP + 8% sacarose	T4= 26,64 $\mu$ M BAP + 8% sacarose

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial de 2x4, duas cultivares e quatro tratamentos, com 15 repetições. Cada unidade experimental foi composta por um frasco contendo uma planta, totalizando 60 unidades amostrais por cultivar.

### 2.3.1.3. Experimento 3

O ensaio constou de um meio de cultura, na presença ou ausência de BAP. O meio de indução de microrizomas foi o meio MS, suplementado de mio-inositol (0,01%), vitaminas de MS, 22,2  $\mu$ M de BAP e diferentes concentrações de sacarose, solidificado com Fitigel (0,23%), demonstrado na Tabela 3.

Tabela 3: Tratamentos do experimento 1

---

T1= MS0 + 3% (p/v) sacarose
T2= 22,2 $\mu$ M BAP + 3% sacarose
T3= 22,2 $\mu$ M BAP + 6% sacarose
T4= 22,2 $\mu$ M BAP + 8% sacarose

---

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial de 2x4, duas cultivares e quatro tratamentos, com 10 repetições. Cada unidade experimental foi composta por um frasco contendo uma planta, totalizando 40 unidades amostrais por cultivar.

### 2.3.2. Microtuberização de Mandioca

Dados preliminares demonstraram que a presença do meristema apical na planta de mandioca é essencial para a plena resposta das cultivares aos diferentes tratamentos em que foram submetidas. Isto foi evidenciado em um teste piloto que analisou a resposta das plantas na presença ou ausência do ápice meristemático. Os resultados foram decisivos, a presença do ápice é de fundamental importância para o desenvolvimento da planta, e sob esta situação a respostas aos tratamentos foram mais rápidas do que nas plantas desprovidas de ápice.

O processo de formação de raízes tuberiformes das cultivares Parazinha, Vassourinha e Mantiqueira basearam-se nos resultados obtidos por Figueiredo (1996) com outros genótipos de mandioca, e no trabalho de Silva et al. (2001), com minituberização de batateiras cultivadas *in vitro*.

Todos os experimentos foram conduzidos sob dois fotoperíodos, o primeiro, denominado indução, com 16 horas de luz e oito horas diárias de escuro, por quatro dias em meio semisólido e seis dias em meio líquido; os segundo regime luminoso consta de 16 horas escuro e 8 horas diárias de luz (dia curto) todos à temperatura de  $27 \pm 1^{\circ}\text{C}$  e irradiância de  $50\text{-}60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

A avaliação foi realizada aos 25-30 dias após a aplicação dos tratamentos, as características analisadas foram: comprimento médio da parte aérea (CPA), comprimento médio da raiz mais longa (CR), em centímetros, número médio de raízes (NR), e padrão de desenvolvimento das raízes tuberiformes.

#### 2.3.2.1. Experimento 1

Ápices caulinares de mandioca 'Mantiqueira', 'Parazinha' e 'Vassourinha' com aproximadamente 3 cm, foram submetidos ao meio de indução por seis dias, período de emissão das raízes. Posteriormente, foram transferidas para o meio de formação de raízes tuberiformes, meio MS líquido, acrescido de mio-inositol (0,01%), complexo vitamínico de MS (0,02% p/v de glicina, 0,005% p/v de ácido nicotínico, 0,005% p/v de piridoxina.HCl e 0,001% p/v de tiamina.HCl), 3% (p/v) de sacarose, sem adição de reguladores de crescimento (**T1**), e MS suplementado com  $0,4 \mu\text{M}$  de BAP e  $1,6 \mu\text{M}$  de ácido  $\alpha$ -naftalenoacético (ANA; Sigma Chem. Co., USA), sob diferentes concentrações de sacarose 3% (**T2**), 6% (**T3**) e 8% (**T4**), constituindo quatro tratamentos (Tabela 4).

Tabela 4: Tratamentos do experimento 1

---

T1= MS0 + 3% sacarose
T2= 22,2 $\mu$ M BAP + 3% sacarose
T3= 22,2 $\mu$ M BAP + 6% sacarose
T4= 22,2 $\mu$ M BAP + 8% sacarose

---

O delineamento empregado neste experimento foi o inteiramente casualizado, com quatro repetições por tratamento, sendo cada unidade experimental composta por um frasco contendo duas plantas, totalizando 16 unidades amostrais por cultivar.

#### 2.3.2.2. Experimento 2

Neste ensaio de indução de raízes tuberiformes foram analisados as três cultivares de mandioca, após o período de indução de quatro dias em meio MS semisólido, acrescido de mio-inositol (0,01%), vitaminas de MS, sacarose (3%) e solidificado com Fitagel (0,23%). O meio de cultura de formação de raiz tuberiforme utilizado está especificado na Tabela 5, conforme Silva et al. (2001).

Tabela 5: Tratamentos do experimento 2

---

T1= MS0 + 3% sacarose
T2= 22,2 $\mu$ M BAP e 3% sacarose
T3 = 22,2 $\mu$ M BAP + 6% sacarose
T4= 22,2 $\mu$ M BAP + 8% sacarose

---

O delineamento empregado foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 3X4 com três cultivares de mandioca e quatro tratamentos, com 13 repetições, sendo cada unidade experimental constituída por um frasco ocorrendo uma planta, totalizando 52 unidades amostrais por cultivar.

### 2.3.2.3. Experimento 3

O processo de indução de microtuberização foi observado na presença ou ausência de carvão ativado (Reagem, Quimibrás – Indústrias Químicas S.A.) aplicados na cultivar Mantiqueira. Visando minimizar o efeito da luz que incide no sistema radicular da planta, colocou-se uma cobertura de papel em torno do tubo de ensaio, na altura do sistema radicular e, sobre o meio de cultura MS (sem carvão ativado), já solidificado, aplicou-se uma camada de aproximadamente 0,5 cm de meio de cultura MS com carvão ativado a 0,2% (p/v) (Figura 1 A e B).

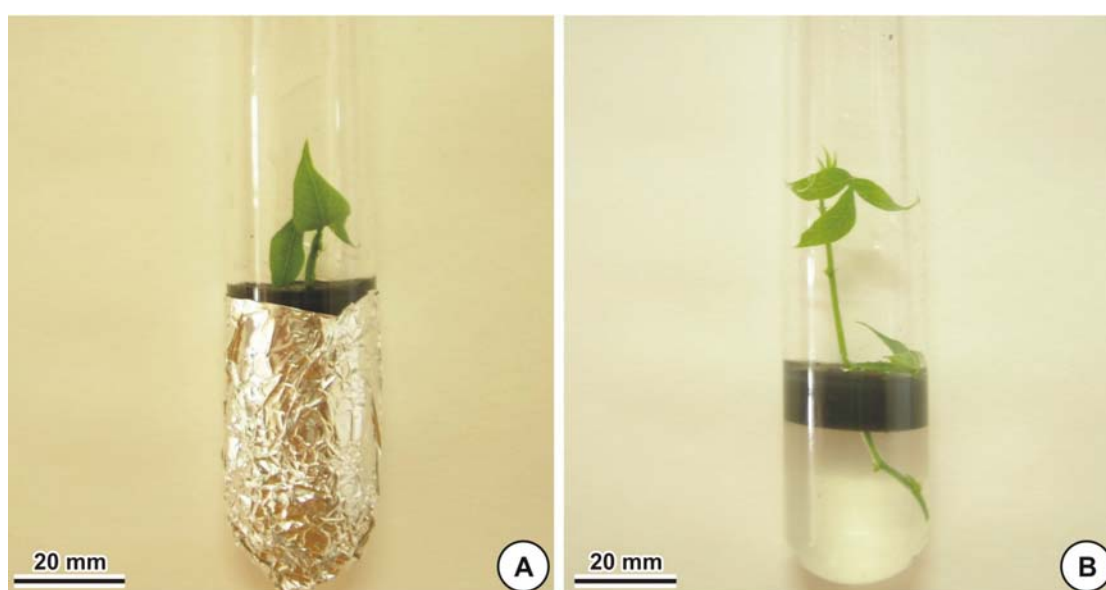


Figura 1: Plantas em meio de cultura MS com cobertura de papel alumínio em torno do tubo de ensaio na altura do sistema radicular (A); e plantas em meio MS com uma camada do mesmo meio contendo carvão ativado a 0,2% (B).

Após o período de indução de quatro dias em meio MS semisólido, acrescido de mio-inositol (0,01%), vitaminas de MS, sacarose (3%) e solidificado com Fitagel (0,23%). As plantas foram transferidas para o meio de indução de raízes tuberiformes; MS suplementado de mio-inositol (0,01%), vitaminas e solidificado com Fitagel (0,23%). O experimento constou de dois tipos de meio: com e sem carvão ativado (Tabela 6).

Tabela 6: Tratamentos do experimento 3

Tratamento	COM CARVÃO (CA)	SEM CARVÃO
T1	MS0 + 3% sacarose + 0,2% CA	MS0 + 3% sacarose
T2	MS + 22,2 µM BAP + 3% sacarose + 0,2% CA	MS + 22,2 µM BAP + 3% sacarose
T3	MS + 22,2 µM BAP + 6% sacarose + 0,2% CA	MS + 22,2 µM BAP + 6% sacarose
T4	MS + 22,2 µM BAP + 8% sacarose + 0,2% CA	MS + 22,2 µM BAP + 8% sacarose

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial de 2x4, dois tipos de meio, quatro tratamentos, com sete repetições por tratamento, sendo cada unidade experimental composta por uma planta, ocorrendo uma planta por frasco, totalizando 56 unidades amostrais.

#### 2.3.2.4. Experimento 4

Este experimento engloba a ação dos diferentes tratamentos nas três cultivares estudadas as quais foram submetidas ao meio de indução por seis dias em meio MS líquido, em seguida, foram transferidas para o meio de formação de raízes tuberiformes, meio líquido MS, acrescido de mio-inositol (0,01%) e complexo vitamínico de MS. Os tratamentos de indução de raízes tuberiformes utilizados estão descritos na Tabela 7.

Tabela 7: Tratamentos do experimento 4.

---

T1 = MS0 + 3% sacarose

T2 = 0,4  $\mu$ M BAP + 1,6  $\mu$ M ANA + 3% sacarose

T3 = 0,4  $\mu$ M BAP + 1,6  $\mu$ M ANA + 6% sacarose

T4 = 0,4  $\mu$ M BAP + 1,6  $\mu$ M ANA + 8% sacarose

T5 = 22,2  $\mu$ M BAP + 3% sacarose

T6 = 22,2  $\mu$ M BAP + 6% sacarose

T7 = 22,2  $\mu$ M BAP + 8% sacarose

---

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial de 3x7, três cultivares, sete tratamentos, com oito repetições por tratamento, sendo cada unidade experimental constituída por um frasco contendo duas plantas, totalizando 56 unidades amostrais por cultivar.

#### 2.3.2.5. Experimento 5

O processo de indução de raiz tuberiforme testado neste ensaio consta de meio MS semisólido, acrescido de mio-inositol (0,01%), vitaminas de MS e solidificado com Fitagel (0,23%). Neste experimento também foi testado a resposta das três cultivares (Mantiqueira, Parazinha e Vassourinha). Os tratamentos são apresentados na Tabela 8.

Tabela 8: Tratamentos do experimento 5

---

T1 = MS0 + 3% sacarose

T2 = 0,4  $\mu$ M BAP + 1,6  $\mu$ M ANA + 3% sacarose

T3 = 0,4  $\mu$ M BAP + 1,6  $\mu$ M ANA + 6% sacarose

T4 = 0,4  $\mu$ M BAP + 1,6  $\mu$ M ANA + 8% sacarose

T5 = 22,2  $\mu$ M BAP + 3% sacarose

T6 = 22,2  $\mu$ M BAP + 6% sacarose

T7 = 22,2  $\mu$ M BAP + 8% sacarose

---

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial de 3x7, três cultivares, sete tratamentos, com 10 repetições, sendo cada unidade experimental constituída por um frasco contendo uma planta, totalizando 70 unidades amostrais por cultivar.

#### 2.4. Delineamento Experimental e Análise Estatística

Em todos os experimentos foi adotado o delineamento inteiramente casualizado, tanto em taro como em mandioca. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), empregando-se o programa SAEG - Sistema de Análises Estatísticas e Genéticas da UFV (Euclides, 1983), e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Foram avaliadas as seguintes características das plantas de mandioca: comprimento médio da parte aérea (CPA), comprimento médio da raiz mais longa (CR), em centímetros, e número médio de raízes (NR); e para taro: comprimento médio da parte aérea (CPA), diâmetro médio do rizoma (DR), em centímetros, e número médio de brotos (NB).

## 2.5. Preparo das lâminas permanentes de taro e de mandioca

Raízes tuberiformes de mandioca e microrizomas de taro obtidos nos experimentos foram submetidas a análises anatômicas sob luz normal e polarizada.

Amostras de microrizomas de taro, e raízes tuberiformes de mandioca foram fixadas em FAA<sub>70</sub> (Johansen, 1940) e estocadas em etanol 70%. Após desidratação em série etílica, os fragmentos foram incluídos em metacrilato e os blocos cortados em micrótomo rotativo. Secções transversais, com 10 µm de espessura, foram corados em Azul de Toluidina pH 4,0 (O'Brien e McCully, 1981), para caracterização estrutural ou submetidos a reação com PAS - Ácido Periódico/Reagente de Schiff (McManus, 1948), para detecção de polissacarídeos neutros. As lâminas foram montadas em Permount. A análise do material, e a captura de imagens foram realizadas em microscópio de luz (modelo Olympus AX70TRF) equipado com sistema U-Photo e com câmera digital acoplada.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. Microtuberização de Taro

No primeiro experimento objetivou-se a formação de microrizomas das cultivares Chinês e Japonês de taro sob efeito do regulador de crescimento BAP e das diferentes concentrações de sacarose na resposta morfogênica que foi avaliada após 60 dias. Verificou-se que, de maneira geral, a cultivar Japonês aparenta ser mais responsiva aos tratamentos a ela submetidos, a exemplo da característica CPA, onde se obteve desenvolvimento de parte aérea e rizomas reduzidos (Tabelas 9 e 10). Fato esse, provavelmente, decorrente da ação do BAP, o qual controla a orientação do fluxo de carboidratos solúveis e, desta forma, intervém no desenvolvimento dos microtubérculos (Villafranca et al., 1998) tendo, por consequência, maior desenvolvimento na parte aérea das plantas cultivadas em meio desprovido de BAP (T1), em ambas cultivares.

Da mesma forma, obteve-se diferença significativa na característica DR, no qual o tratamento T4 apresentou microrizomas de maior tamanho quando comparados ao tratamento T1 (Tabela 10), como também, na característica NB (Tabela 10), o qual apresentou maior número nos tratamentos que continham BAP e níveis elevados de sacarose.

Tabela 9: Médias do comprimento (cm) da parte aérea de plantas (CPA) de cultivares de taro desenvolvidas em meios de cultura visando à formação de microrizomas

TRATAMENTO	CPA (cm)	
	CHINÊS	JAPONÊS
T1 = MS0* + 3 % (p/v) sacarose	5,48 a	6,35 a
T2 = 8,88 µM BAP + 3% sacarose	2,06 b	2,12 b
T3 = 8,88 µM BAP + 6% sacarose	1,86 b	2,50 b
T4 = 8,88 µM BAP + 8% sacarose	2,12 b	2,10 b

\*MSO = meio de MS, na ausência de reguladores de crescimento.

Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Tabela 10: Médias do número de brotações (NB) e do diâmetro médio (cm) dos rizomas (DR) de cultivares de taro desenvolvidas em meios de cultura visando a formação dos microrizomas

TRATAMENTO	CHINÊS		JAPONÊS	
	NB	DR	NB	DR
T1= MS0* + 3% (p/v) sacarose	0,30 b	0,30 b	0,10 c	0,40 b
T2= 8,88 µM BAP + 3% sacarose	2,80 a	0,42 b	3,80 a	0,40 b
T3= 8,88 µM BAP + 6% sacarose	2,70 a	0,49 b	2,30 b	0,42 b
T4= 8,88 µM BAP + 8% sacarose	0,40 b	1,30 a	0,20 c	0,95 a

\*MSO = meio de MS, na ausência de reguladores de crescimento.

Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Com relação ao fotoperíodo, foi sugerido que dias longos promovem a formação do bulbo de cebola, e que isto pode estar relacionado ao processo fotossintético, pois a bulbificação é considerada, principalmente, pela acumulação de carboidratos, que é facilmente observada através da expansão basal da planta (Kahane et al., 1992).

Anatomicamente, observa-se a presença marcante de grãos de amido em rizomas diferenciados em T4 (Figuras 2B e 2D), em contraste com T1, onde não houve acúmulo de amido (Figuras 2A e 2C).

Do mesmo modo, verificou-se diferença no acúmulo de polissacarídeos em T1 (Figuras 3A e 3C) com relação ao T4 (Figuras 3B e 3D), onde se detectou amiloplastos repletos de grão de amido. Os resultados constatados mediante as análises estruturais (Figuras 2 e 3) comprovam a importância da aplicação de reguladores de crescimento no processo de microtuberização, como o observado em batata (Nowak & Colborne, 1989; Kim et al., 2003), como aspecto favorável na elucidação dos fenômenos bioquímicos envolvidos na formação do tubérculo, juntamente, com elevados níveis de sacarose (Lauzer et al., 1992; Omokolo et al., 2003), tendo como consequência a presença de grãos de amido.

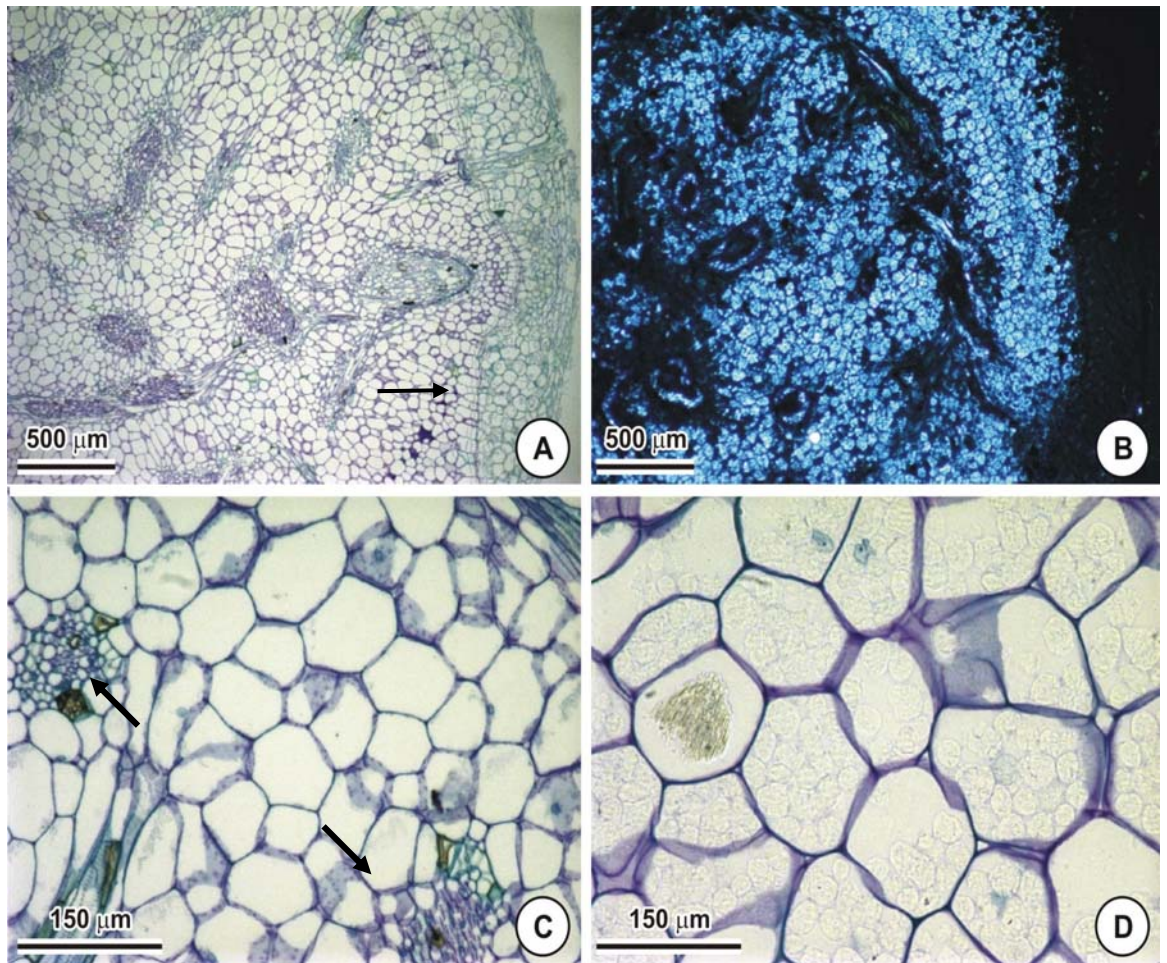


Figura 2: Fotomicrografias de secções transversais do microrizoma de taro (*Colocasia esculenta*) coradas com azul de toluidina, obtidas *in vitro* mediante o cultivo em meio MSO e 3% (p/v) de sacarose (T1) e meio MS com 8,88  $\mu$ M BAP e 8% de sacarose (T4). **A** - Rizoma de taro em T1, evidenciando a região cambial (seta); **B** - Microrizoma diferenciado em T4, visualizado sob luz polarizada, comprovando a presença de grãos de amido; **C** - Células do parênquima medular do rizoma em T1, evidenciando a ausência de acúmulo de amido e presença de feixes vasculares (setas); **D** - Detalhe das células do parênquima medular de microrizomas formado em T4, evidenciando numerosos amiloplastos.

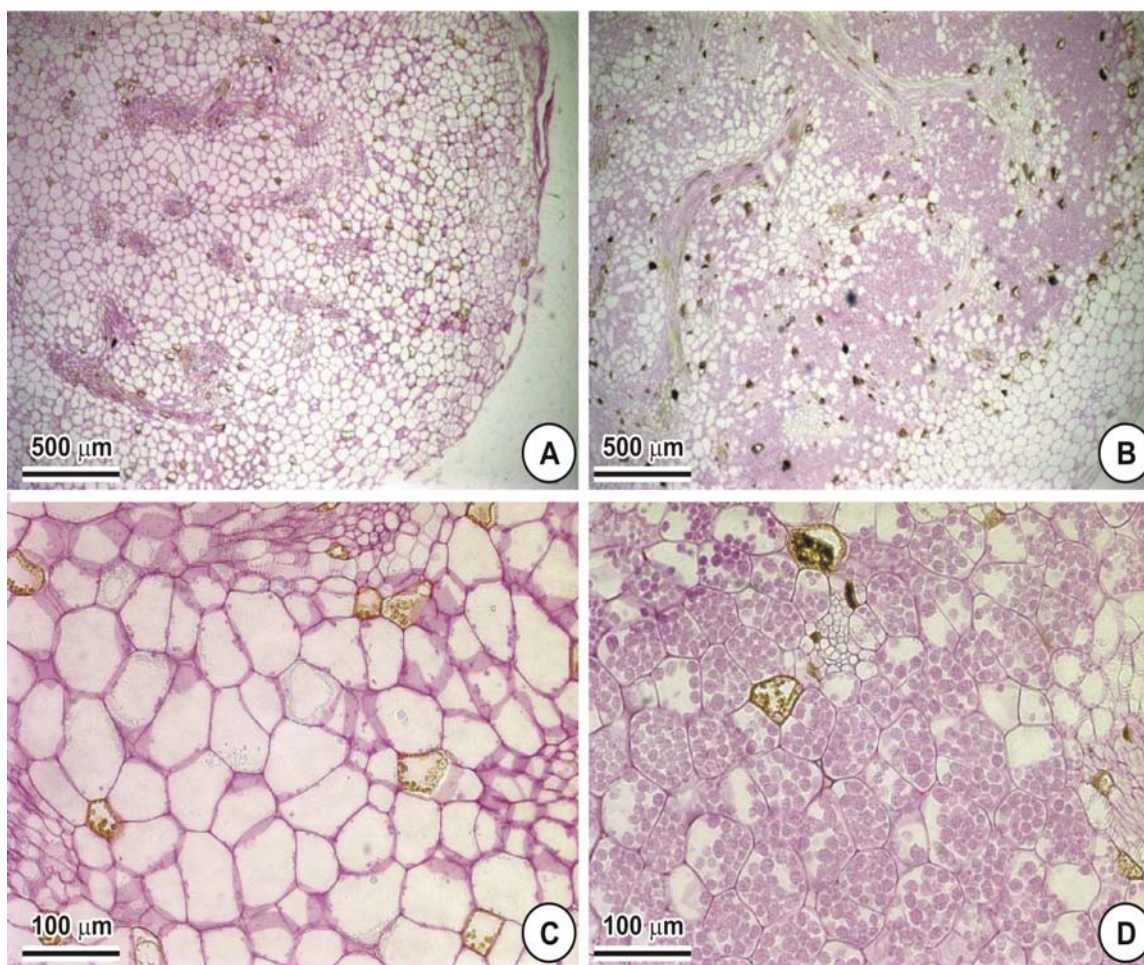


Figura 3: Fotomicrografias de secções transversais de microrizomas de taro (*Colocasia esculenta*) submetidas ao PAS, obtidas *in vitro* mediante o cultivo em meio MSO e 3% (p/v) de sacarose (T1) e meio MS com 8,88  $\mu\text{M}$  BAP e 8% de sacarose (T4). **A** - Rizoma de taro em T1; **B** - Microrizoma de taro diferenciado em T4; **C** - Detalhe das células do parênquima medular do rizoma em T1; **D** - Detalhe das células do parênquima medular repletas de grãos de amido em microrizomas formados em T4.

No experimento 2, que constou de duas fases, foi possível observar maior crescimento da parte aérea nos tratamentos desprovidos de BAP, em relação aos demais tratamentos, tanto na cultivar Chinês como na Japonês (Tabela 11). Além disso, observou-se que não houve diferença significativa entre as cultivares, nas demais características analisadas, inferindo que esta distinção de fases (indução e formação) e concentração diferenciada de BAP, não interferiu no processo de formação de microrizomas de taro. Acredita-se que a

concentração de 4,88  $\mu\text{M}$  de BAP é baixa para promover antecipadamente a formação do microrizoma em taro, e portanto não alterou os resultados. A formação dos microrizomas, provavelmente foi devido a maior concentração de BAP (26,64  $\mu\text{M}$  BAP). As citocininas estimulam a tuberização através da indução da divisão celular, tendo uma importante função na mobilização de fotoassimilados e de nutrientes para os drenos (Omokolo et al., 2003).

Tabela 11: Médias do comprimento da parte aérea de plantas (CPA) em centímetros de cultivares de taro desenvolvidas em meios de cultura visando à formação de microrizomas

TRATAMENTO (FORMAÇÃO)	CPA	
	CHINÊS	JAPONÊS
T1= MS0*+ 3% (p/v) sacarose	13,35 a	12,89 a
T2= 26,64 $\mu\text{M}$ BAP + 3% sacarose	2,95 b	2,59 b
T3= 26,64 $\mu\text{M}$ BAP + 6% sacarose	2,52 b	2,26 b
T4= 26,64 $\mu\text{M}$ BAP + 8% sacarose	2,36 b	2,56 b

\*MSO = meio de MS, na ausência de reguladores de crescimento.  
Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

No experimento 3, formulado a partir de uma única fase, foi possível observar que a cultivar Japonês apresentou os melhores resultados, principalmente, na característica CPA, que é evidenciado sua eficiência no crescimento da parte aérea (Tabela 12). Da mesma forma, foi possível observar respostas semelhantes tanto em DR como NB, isto, provavelmente, decorrente da ação conjunta do BAP e elevada concentração de sacarose. Em geral, a aplicação de reguladores de crescimento pode manter o balanço hormonal e a eficiente relação fonte-dreno e, desta forma, aumentar a produtividade da cultura (Kim et al., 2003). Ainda, constatou-se em *Dioscorea* e *Solanum* que elevados níveis de sacarose são determinantes no processo de microtuberização (Lauzer et al., 1992; Ranalli et al., 1994).

Tabela 12: Desempenho das cultivares de taro Japonês e Chinês durante o processo de formação de microrizomas avaliado pelas médias no comprimento de parte aérea (CPA), diâmetro das raízes (DR) em centímetros e número de brotações (NB)

TRATAMENTO	CPA (cm)	DR (cm)	NB
JAPONÊS			
T1= MS0 * + 3% (p/v) sacarose	7,07 a	0,36 b	0,20 b
T2= 22,2 µM BAP + 3% sacarose	2,78 b	0,42 b	2,20 a
T3= 22,2 µM BAP + 6% sacarose	3,25 b	0,67 b	2,40 a
T4= 22,2 µM BAP + 8% sacarose	2,83 b	1,15 a	1,40 ab
CHINÊS			
T1= MS0 + 3% sacarose	5,50 a	0,34 b	0,30 b
T2= 22,2 µM BAP + 3% sacarose	1,73 b	0,42 b	2,80 a
T3= 22,2 µM BAP + 6% sacarose	1,76 b	0,49 b	2,70 a
T4= 22,2 µM BAP + 8% sacarose	1,72 b	1,25 a	0,80 b

\*MSO = meio de MS, na ausência de reguladores de crescimento.

Médias seguidas pela mesma letra nas colunas para cada cultivar não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Observou-se, em T1 desenvolvimento normal da parte aérea, porém com rizoma reduzido (Figura 4A). Em contraste, em T4 houve comprometimento do desenvolvimento da parte aérea, no entanto, destacou-se a formação de microrizomas e a presença de brotos (Figuras 4B e C).

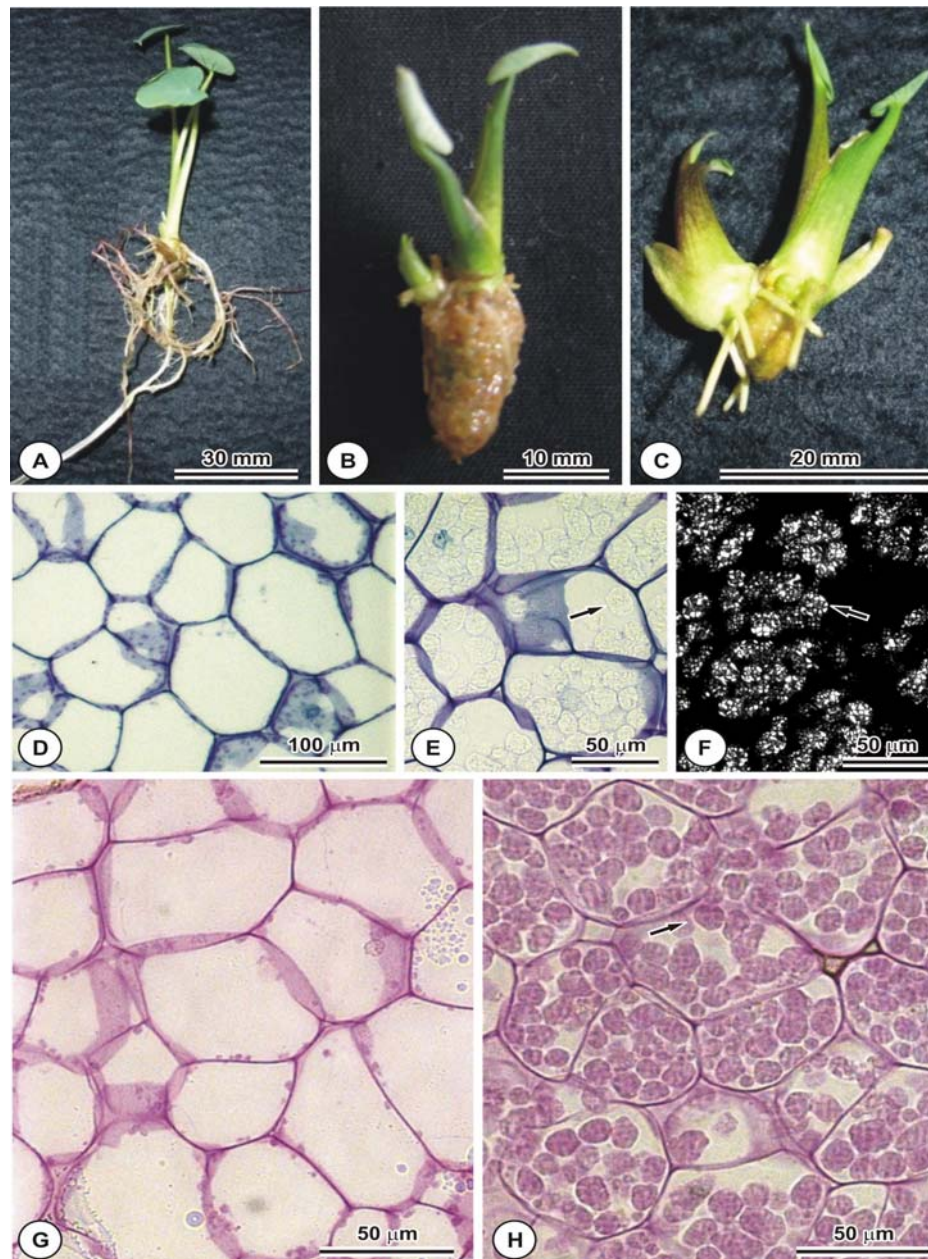


Figura 4: Plantas de taro (*Colocasia esculenta*) obtidas *in vitro* mediante o cultivo em meio MSO e 3% (p/v) de sacarose (T1) e meio MS com 22,2  $\mu$ M BAP e 8% sacarose (T4). **A** - Rizoma em T1; **B** - Microrizoma formado em T4; **C**. Brotos axilares obtidos em T4; **D** - Células do parênquima medular do rizoma em T1; **E** - Células do parênquima medular repletas de grãos de amido (seta) em T4; **F** - Microrizoma de T4 submetido à luz polarizada comprovando a presença de grãos de amido (seta); **G** - Detalhe das células do parênquima medular do rizoma (T1), coradas com PAS; **H** - Secção transversal de microrizoma formado em T4, evidenciando amiloplastos repletos de grão de amido (seta) em células do parênquima medular coradas com PAS.

Anatomicamente, observou-se presença acentuada de grãos de amido no T4 (Figuras. 4E e 4F), em oposição ao T1 (Figura 4D). Além disso, constatou-se diferença no acúmulo de polissacarídeos em T1 (Figura 4G) comparativamente ao T4 (Figura 4H), onde se detectou amiloplastos repletos de grão de amido. As diferenças anatômicas apresentadas na Figura 4 ratificam os resultados da ação conjunta do BAP e dos níveis mais altos de sacarose (Lauzer et al., 1992; Omokolo et al., 2003), que favorece o surgimento de brotos (Figura 4C), como também, no acúmulo de grãos de amido (Figuras 4E, 4F e 4H). Resultado semelhante foi obtido no estudo de microtuberização de batata, onde foi verificada a ação da cinetina durante o processo de tuberização (Villafranca et al., 1998).

### 3.2. Microtuberização de Mandioca

Nos tratamentos que produziram raízes tuberiformes observou-se marcante redução da altura da plantas, possivelmente em decorrência do desenvolvimento de raízes tuberiformes (Tabela 13).

No experimento 1, onde as três cultivares foram cultivadas em meio MS líquido com 0,4  $\mu$ M de BAP e 1,6  $\mu$ M de ANA, e três concentrações de sacarose 3% (T2), 6% (T3), 8% (T4), verificou-se que 'Mantiqueira' apresentou melhores respostas nas características CPA, CR e NR, no tratamento T1, seguida por 'Vassourinha' (Tabela 13). No entanto, neste tratamento não foi constatado a formação de raiz tuberiforme em nenhuma das cultivares. Provavelmente, isto se deve a ausência tanto de reguladores de crescimento, principalmente citocininas, como também os níveis elevados de sacarose, que são fatores que favorecem o processo de microtuberização em *Xanthosoma sagittifolium* (Omokolo et al., 2003), não havendo, assim, interferência no crescimento da planta (Tabela 13).

Tabela 13: Desempenho de cvs. de mandioca Mantiqueira, Vassourinha e Parazinha na formação de raízes tuberiformes *in vitro* avaliado pelas médias do comprimento da parte aérea (CPA), comprimento da raiz mais longa (CR) em centímetros e número de raízes (NR)

<b>Mantiqueira</b>			
TRATAMENTO	CPA	CR	NR
T1= MS0* + 3% (p/v) sacarose	25,37 a	14,62 a	21,50 a
T2= 0,4 µM BAP + 1,6 µM ANA + 3% sacarose	11,00 b	5,12 b	7,25 b
T3= 0,4 µM BAP + 1,6 µM ANA + 6% sacarose	6,12 c	4,75 b	12,50 ab
T4= 0,4 µM BAP + 1,6 µM ANA + 8% sacarose	6,25 c	3,50 b	4,50 b

<b>Vassourinha</b>			
TRATAMENTO	CPA	CR	NR
T1= MS0 + 3% (p/v) sacarose	18,41 a	10,40 a	8,90 a
T2= 0,4 µM BAP + 1,6 µM ANA + 3% sacarose	9,40 b	3,92 b	4,90b
T3= 0,4 µM BAP + 1,6 µM ANA + 6% sacarose	6,98 b	5,53 b	9,12 b
T4= 0,4 µM BAP + 1,6 µM ANA + 8% sacarose	8,11 b	2,70 b	8,12 b

<b>Parazinha</b>			
TRATAMENTO	CPA	CR	NR
T1= MS0 + 3% (p/v) sacarose	13,56 a	5,51 a	11,90 a
T2= 0,4 µM BAP + 1,6 µM ANA + 3% sacarose	8,22 b	2,36 b	3,25 b
T3= 0,4 µM BAP + 1,6 µM ANA + 6% sacarose	6,16 c	4,12 ab	5,75 b
T4= 0,4 µM BAP + 1,6 µM ANA + 8% sacarose	5,35 c	3,67 ab	4,62 b

\*MSO = meio de MS, na ausência de reguladores de crescimento.

Médias seguidas pela mesma letra nas colunas, para cada cultivar, não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

No tratamento T4, o desenvolvimento das raízes tuberiformes foi mais eficiente, apresentando uniformidade tanto no aspecto, como na textura na cultivar Parazinha (Figura 5B). Entretanto, nas cultivares Vassourinha e Mantiqueira verificaram-se indícios do processo de formação de raiz tuberiforme, porém com desenvolvimento irregular ao longo das raízes (Figuras 5D e 5F). Esta resposta pode estar associada diretamente às diferenças genótípicas específicas das cultivares, e por esta razão apresentaram respostas distintas. Em estudo realizado em batata sugere-se

que a formação do tubérculo pode sofrer um balanço diferenciado na rota de sinalização que pode ser afetada por fitocromos ou fitormônios e isto pode comprometer o desenvolvimento, e o ponto convergente que media esta rota parece ser a relação fonte-dreno (Peres et al., 2005), e que pode ser genótipo-dependente.



Figura 5: Resposta das cultivares no tratamento controle [MS0] e submetidas ao processo de formação de raiz tuberiforme *in vitro* induzida pelo tratamento T4 [0,4  $\mu$ M BAP, 1,6  $\mu$ M ANA e 8% (p/v) de sacarose], respectivamente. **A e B** - Parazinha; **C e D** - Vassourinha; **E e F** - Mantiqueira.

No experimento 2, foram analisados outros meios de cultivo, baseando-se em estudos conduzidos em batateiras por Lopez-Delgado & Scoot (1997), Ulloa et al. (1997) e Silva et al. (2001), com o objetivo de induzir o processo de formação de raiz tuberiforme *in vitro* em meio sólido. Neste experimento verificou-se também as respostas diferenciadas das três cultivares aos tratamentos. Foi observado que 'Vassourinha' apresentou melhores resultados no tratamento T4 (Figuras 6A e 6B), onde se verificou a presença de raízes tuberiformes, concordando com resultados prévios (Estrada et al., 1986; Ulloa et al., 1997), que relatam que o BAP é um dos fatores estimulantes do processo de tuberização. Nas demais cultivares houve indícios deste processo, porém foi constatado a formação de calo adjacente ao sistema radicular. A possível causa da resposta diferenciada entre as cultivares pode estar ligada à considerável variabilidade genotípica na tuberização em resposta aos reguladores de crescimento (Delgado & Scott, 1996). Além disso, é pertinente ressaltar que no tratamento T1 todas as cultivares tiveram desenvolvimento normal e resposta significativa das características analisadas (Tabela 14).

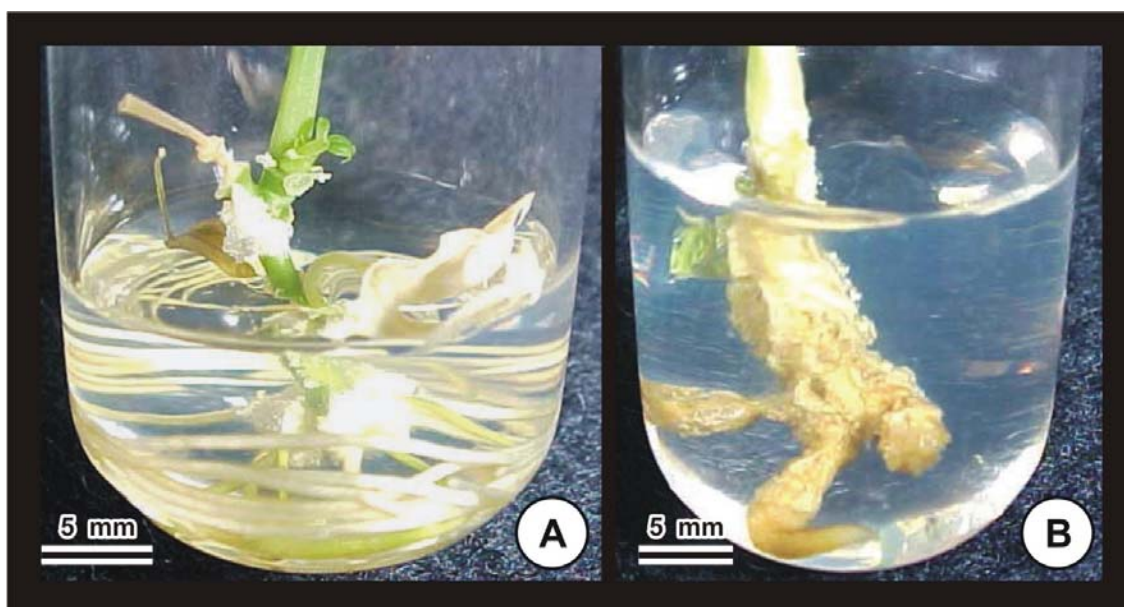


Figura 6: Formação de raízes tuberiformes de mandioca 'Vassourinha' *in vitro* em meio semisólido. **A** - tratamento T1 (MS0 + 3% de sacarose); **B** - tratamento T4 (22,2  $\mu$ M BAP + 8% de sacarose).

Tabela 14: Desempenho de cvs. de mandioca Parazinha, Mantiqueira e Vassourinha na formação de raízes tuberiformes *in vitro* avaliado pelas médias do comprimento da parte aérea (CPA), comprimento da raiz mais longa (CR) e número de raízes (NR)

<b>Parazinha</b>			
Tratamentos	<b>CPA (cm)</b>	<b>CR (cm)</b>	<b>NR</b>
T1	14,22 a	8,99 a	14,92 a
T2	3,10 b	0,67 b	1,08 b
T3	3,77 b	0,21 b	1,31 b
T4	3,05 b	0,11 b	0,92 b

<b>Mantiqueira</b>			
Tratamentos	<b>CPA (cm)</b>	<b>CR (cm)</b>	<b>NR</b>
T1	12,42 a	6,90 a	14,23 a
T2	3,60 b	0,31 b	0,77 b
T3	4,15 b	0,5 b	0,54 b
T4	3,30 b	0,4 b	0,46 b

<b>Vassourinha</b>			
Tratamentos	<b>CPA (cm)</b>	<b>CR (cm)</b>	<b>NR</b>
T1	17,54 a	5,70 a	16,61 a
T2	4,54 b	0,41 b	1,85 b
T3	3,81 b	0,77 b	2,87 b
T4	3,55 b	0,67 b	2,23 b

Médias seguidas pela mesma letra nas colunas, para cada cultivar, não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

No experimento 3, utilizou-se a cultivar Mantiqueira por apresentar dificuldade no processo de formação de raiz tuberiforme em meio sólido. Com base nos dados obtidos verificou-se que a cultivar Mantiqueira melhorou seus resultados somente para a característica CPA, principalmente em relação ao tratamento T1 (Figura 7), este resultado está de acordo com obtido por Chagas et al. (2005), que constatou a eficiência do

carvão ativado no crescimento da parte aérea quando utilizou a concentração de 0,2% de carvão ativado, devido a sua capacidade de adsorver substâncias tóxicas liberadas pelos próprios explantes ou impurezas de outros componentes, como sacarose e sais, e assim, contribuindo para o maior comprimento da parte aérea.

Objetivou-se com ensaio minimizar o efeito da luz que incide no sistema radicular da planta, pois estudos revelam que o fotoperíodo, principalmente dias longos podem inibir ou retardar a tuberização (Allemamm & Hammes, 2006). Uma vez que, a principal função do carvão ativado é a absorção de substâncias inibidoras, liberadas pelo meio de cultura ou pelo explante, durante o crescimento, especialmente compostos fenólicos (Figueiredo, 1996).

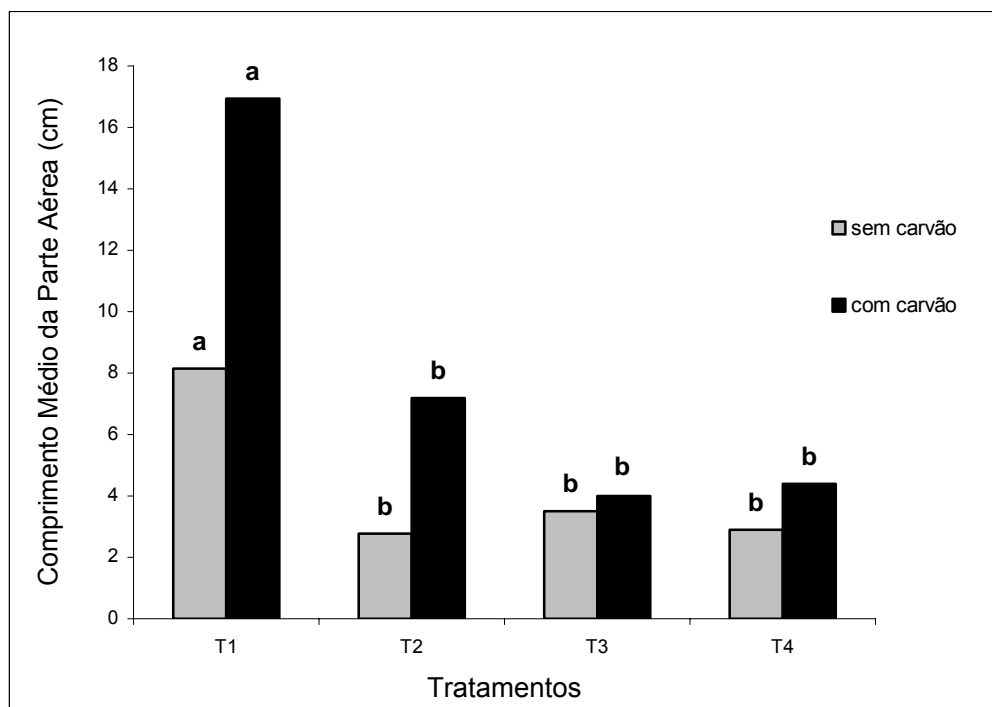


Figura 7: Comprimento médio da parte aérea (CPA) de mandioca cv. Mantiqueira, *in vitro*, após tratamentos com (0,2%; p/v) ou sem carvão ativado. T1: MS0 + 3% sacarose; T2: 22,2  $\mu$ M BAP e 3% sacarose; T3: 22,2  $\mu$ M BAP e 6% sacarose; T4: 22,2  $\mu$ M BAP e 8% sacarose. Médias dos tratamentos seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

É sabido que um dos fatores físicos necessários para o crescimento e desenvolvimento dos órgãos vegetativos subterrâneos é a ausência de luz, pois sugere-se que a ausência de luz no crescimento e no desenvolvimento das raízes, possui um forte efeito para a obtenção de raízes tuberosas, e que as prováveis características seria a ação da luz no desenvolvimento dos cloroplastos, inibindo a ontogênese de amiloplastos (Figueiredo, 1996). Diante disto, o carvão ativado tem sido utilizado em meios de cultura para estimular o enraizamento, devido a sua alta habilidade de excluir a luz do meio e também por diminuir a intoxicação das culturas pela presença de fenóis produzidos pelos próprios tecidos que, por sua vez, inibem o enraizamento (Corrêa et al., 2003).

Quanto ao aspecto de microtuberização, este ensaio não alterou de forma significativa a indução de raízes tuberiformes, evidenciando que a presença de carvão ativado não influencia este processo ou pelo menos não proporcionou a formação destas raízes, resultado semelhante foi obtido por Figueiredo (1996) e Chagas et al. (2005), os quais relatam, inclusive, inibição do crescimento radicular.

No experimento 4, objetivou-se analisar os diferentes meios testados juntamente com as três cultivares Mantiqueira, Parazinha e Vassourinha em meio MS líquido, e desta forma, verificar e inferir qual o melhor tratamento, e qual cultivar é mais responsiva ao processo de formação de raízes tuberiformes.

Diante dos resultados pode-se constatar que houve diferenças significativas no efeito do tratamento nas três características analisadas. Isto pode ser evidenciado no desempenho das cultivares, para o tratamento T1, a cultivar Mantiqueira foi a que apresentou melhores respostas ao desenvolvimento da planta em relação à Vassourinha e Parazinha para as características CR e NR (Tabela 15).

Tabela 15: Desempenho das cultivares de mandioca Mantiqueira, Vassourinha e Parazinha no processo de formação de raízes tuberiformes *in vitro* induzido pelo tratamento T1 e avaliado pelas médias do comprimento da parte aérea (CPA), comprimento da raiz mais longa (CR), em centímetros e Número de Raízes (NR).

<b>TRATAMENTO T1 (MS0 +3% sacarose)</b>			
<b>Cultivar</b>	<b>CPA</b>	<b>CR</b>	<b>NR</b>
Mantiqueira	25,38 a	14,62 a	21,50 a
Vassourinha	15,27 b	9,23 b	11,75 b
Parazinha	12,82 b	5,29 c	7,38 b

Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Em relação aos tratamentos testados pode-se verificar que o tratamento T1 apresentou melhor resultado entre as cultivares, ainda sobre este aspecto, a cultivar Mantiqueira é a que apresenta melhores respostas, mesmo sob os diferentes tratamentos, principalmente nas características CR e NR (Tabela 16).

Quanto ao processo de formação de raízes tuberiformes, de acordo com os dados preliminares observou-se que o tratamento T4 foi o que apresentou a melhor resposta nas três cultivares (Figura 16). Contudo, a cultivar mais responsiva a formação de raiz tuberiforme é a Parazinha (Figura 16B), apresentando uniformidade no aspecto e na textura da raiz tuberosa e ainda verificou-se regularidade e constância da cultivar na formação de raízes tuberiformes. A cultivar Vassourinha também responde ao processo de formação de raiz tuberiforme (Figura 16C), porém com certa irregularidade tanto na frequência, como também, na formação da raiz tuberosa propriamente dita, pois o processo não foi uniforme como na Parazinha. Já na cultivar Mantiqueira (Figura 16D) verificou-se apenas indícios do processo, entretanto com desenvolvimento irregular ao longo das raízes. Apesar de apresentar os melhores resultados com relação as diferentes características analisadas (CPA, CR e NR), diante dos tratamentos a qual foi submetida, a cultivar Mantiqueira, pode ser considerada recalcitrante ao processo de formação de raízes tuberiformes.

Esta resposta pode estar associada diretamente às diferenças genóticas específicas das cultivares, e por esta razão apresentaram respostas distintas ao processo de formação de raiz tuberiforme.

Tabela 16: Desempenho de cultivares de mandioca Vassourinha, Mantiqueira e Parazinha na formação de raízes tuberiformes *in vitro* avaliado pelas médias do comprimento da parte aérea (CPA), comprimento da raiz mais longa (CR) e número de raízes (NR)

CPA (cm)							
Cultivar	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
Vassourinha	15,27 a	8,30 b	6,62 b	6,64 b	6,62 b	6,02 b	4,84 b
Parazinha	12,82 ab	8,57 bc	8,21 bc	9,21 abc	5,04 c	6,35 bc	5,09 c
Mantiqueira	25,38 a	11,00 b	6,12 bc	6,25 bc	3,38 c	4,50 c	3,88 c
CR (cm)							
Cultivar	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
Vassourinha	9,23 a	0,4 b	1,40 b	1,77 b	0,8 b	0,50 b	0,55 b
Parazinha	5,29 ab	0,76 b	0,47 b	1,52 b	1,82 ab	1,86 ab	2,05 ab
Mantiqueira	14,62 a	5,12 b	4,75 b	3,50 b	4,00 b	4,38 b	5,12 b
NR							
Cultivar	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
Vassourinha	11,75 a	0,38 b	1,62 b	1,62 b	0,38 b	0,75 b	2,38 b
Parazinha	7,38 ab	3,12 ab	1,25 b	2,38 ab	3,12 ab	4,62 ab	5,62 ab
Mantiqueira	21,50 a	7,25 bc	12,50 b	4,50 bc	4,62 bc	3,75 bc	5,25 bc

Médias seguidas pela mesma letra nas linhas não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.



Figura 8: Processo de formação de raízes tuberiformes em cultivares de mandioca *in vitro*. **A**- Parazinha cultivada em meio MS, na ausência de reguladores de crescimento (controle -T1); **B** - Parazinha; **C** - Vassourinha; **D** - Mantiqueira. B, C e D - submetidas ao tratamento T4 (0,4  $\mu$ M BAP, 1,6  $\mu$ M ANA e 8% (p/v) de sacarose).

Anatomicamente, observa-se em T1 que as raízes apresentam epiderme unisseriada, córtex com células isodiamétricas, porém de menor calibre que T4 (Figuras 9A, 9B e 9C). Além disso, as raízes do T4 apresentaram aumento considerável dos espaços intercelulares nas camadas mais periféricas do córtex, como também a presença de grãos de amido na região do córtex (Figura 9D).

Verificou-se, ainda, diferença no acúmulo de polissacarídeos o T1 (Figura 9C) em oposição ao T4 (Figura 9D, 9E e 9F), onde se detectou amiloplastos repletos de grão de amido. As diferenças anatômicas apresentadas na Figura 9 ratificam os resultados da ação conjunta do BAP e dos níveis mais altos de sacarose (Estrada et al., 1986; Omokolo et al., 2003) favorece o acúmulo de grãos de amido, como o relatado por Ross et al. (1994) e Veramendi et al., (1999).

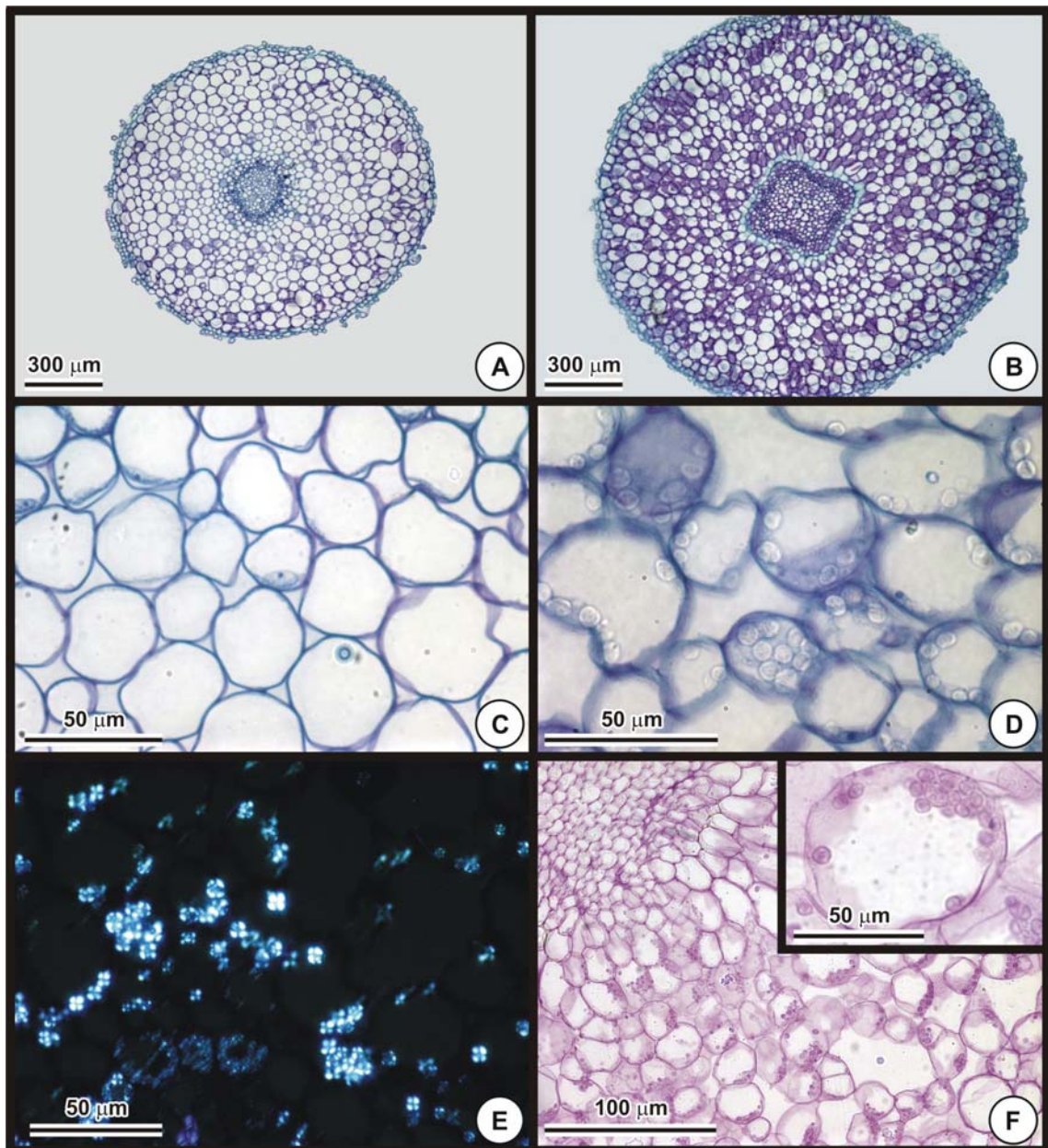


Figura 9: Fotomicrografias de secções transversais de raízes de mandioca cv. Parazinha, obtidas *in vitro* mediante o cultivo em meio MSO e 3% (p/v) de sacarose (T1) e meio MS com 0,4  $\mu\text{M}$  BAP, 1,6  $\mu\text{M}$  ANA e 8% de sacarose (T4). **A** - Visão geral de raízes cultivadas em meio T1; **B** - Visão geral de raízes tuberiformes cultivadas em meio T4; **C** - Detalhe das células do parênquima medular de raízes cultivadas em T1; **D** - Detalhe das células do parênquima cortical de raízes cultivadas em T4, evidenciando células repletas de grãos de amido; **E** - Visão geral de raiz tuberiforme diferenciada em meio T4 submetida à luz polarizada, comprovando a presença de grãos de amido; **F** - Detecção de polissacarídeos com PAS em raízes tuberiformes diferenciadas em T4, com detalhe dos amiloplastos na região do córtex.

O experimento 5, realizado com a finalidade de obtenção de raízes tuberiformes em meio MS semisólido e sete tratamentos, na tentativa de englobar todos os tratamentos em um único ensaio. Por meio da análise dos dados obtidos verificou-se que o tratamento T1 distinguiu-se de forma significativa dos demais tratamentos em todas as características analisadas: CPA, CR e NR, como também nas três cultivares estudadas (Tabela 17). Ainda, com relação ao efeito dos tratamentos podemos observar que a cultivar Parazinha apresentou melhores respostas quanto ao CR, isto corrobora com a sua habilidade de responder ao processo de formação de raízes tuberiformes que ocorreram no tratamento T4 (Figuras 10A e 10B).

Tabela 17: Desempenho de cultivares de mandioca quanto ao comprimento da parte aérea (CPA), comprimento da raiz mais longa (CR) e número de raízes (NR) na formação de raízes tuberiformes *in vitro*.

CPA (cm)							
Cultivar	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
Mantiqueira	9,15 a	4,02 b	4,06 b	3,64 b	2,85 b	3,49 b	2,88 b
Vassourinha	21,40 a	5,84 b	6,04 b	5,01 b	5,17 b	3,86 b	3,84 b
Parazinha	14,61 a	8,16 b	8,27 b	9,07 b	2,92 c	3,74 c	3,05 c
CR (cm)							
Cultivar	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
Mantiqueira	6,50 a	0,46 b	0,30 b	0,72 b	0,20 b	0,00 b	0,00 b
Vassourinha	7,44 a	0,66 b	0,54 b	1,14 b	0,37 b	0,30 b	0,20 b
Parazinha	9,49 a	0,81 bc	0,78 bc	1,72 bc	0,79 bc	0,34 c	0,41 c
NR							
Cultivar	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
Mantiqueira	7,90 a	0,60 bc	2,70 bc	3,20 bc	0,00 c	0,00 c	0,00 c
Vassourinha	11,50 a	4,00 bc	1,30 bc	2,90 bc	0,20 c	0,50 c	0,30 c
Parazinha	14,90 a	3,00 b	1,30 bc	2,30 b	1,20 bc	1,20 bc	0,80 bc

Médias seguidas pela mesma letra nas linhas não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

No aspecto visual, efeito das cultivares submetidas ao meio semisólido foi constatado que no tratamento T4, em 'Parazinha', novamente, apresentou melhores respostas nos diferentes tratamentos, ratificando os resultados prévios, e a condição de melhor cultivar no processo de formação de raízes tuberiformes observada neste experimento (Figura 10B). A combinação do ANA com BAP foi importante para a indução do processo de formação de estruturas semelhantes a raízes tuberosas *in vitro* em *Ipomoea batatas* (Corrêa et al., 2003). Além disso, evidenciou-se que 'Vassourinha' também exibiu bons resultados ao processo de tuberização *in vitro* sob o mesmo tratamento (Figura 10C), porém não foi uniforme, e ainda apresenta menor comprimento e número de raízes quando comparado com 'Parazinha'. Já 'Mantiqueira' apresentou um elevado percentual de calos (Figuras 10 D e 11), impedindo ou interferindo na formação de raízes tuberiformes, principalmente nos tratamentos que continham somente o BAP na concentração de 22,2  $\mu$ M (Tabela 17). Possivelmente, a explicação para a calogênese seja devido a ausência da auxina (ANA) que favorece ao alongamento celular (Taiz & Zeiger, 2004), a concentração elevada da citocinina (Figueiredo, 1996), quando comparada aos outros tratamentos, e a especificidade do genótipo (Lopez-Delgado & Scott, 1997), sugerindo que a cultivar Mantiqueira apresenta menor potencialidade a formação de raiz tuberiforme *in vitro*.



Figura 10: Processo de formação de raízes tuberiformes de mandioca *in vitro*. **A** - Parazinha (controle -T1); **B** - Parazinha; **C** - Vassourinha; **D** – Mantiqueira, submetidas ao tratamento T4 (0,4  $\mu$ M BAP, 1,6  $\mu$ M ANA e 8% (p/v) de sacarose).

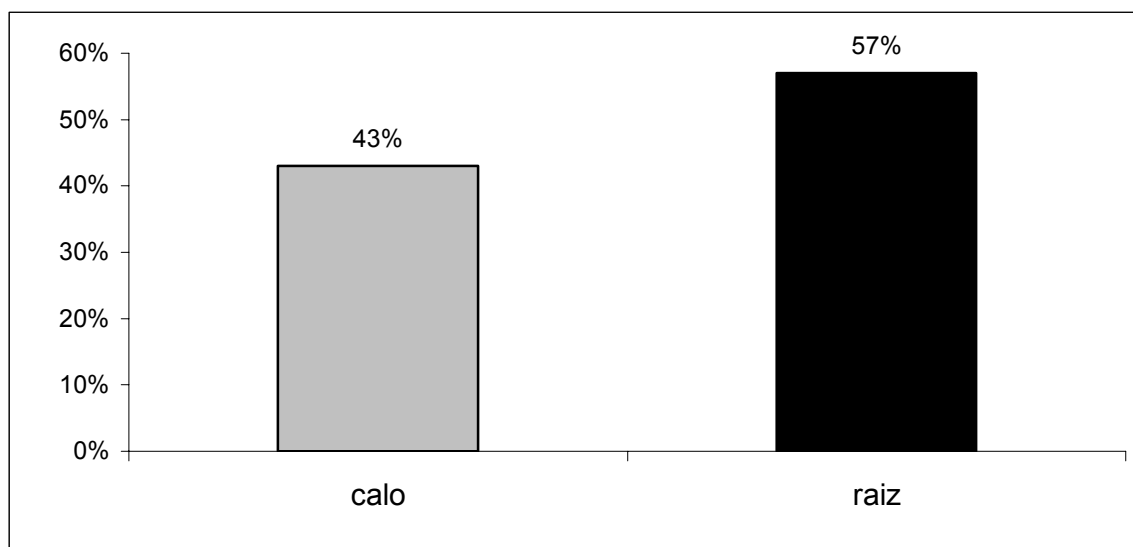


Figura 11: Porcentagem de calos obtidos mediante o processo de formação de raízes tuberiformes, *in vitro*, na cv. Mantiqueira sob tratamento T4: 0,4  $\mu$ M BAP, 1,6  $\mu$ M ANA e 8 % (p/v) de sacarose.

#### 4. CONCLUSÕES

- Houve especificidade nas respostas genótípicas no processo de microtuberização de cultivares de taro e de mandioca;
- A cultivar de taro Japonês respondeu melhor ao processo de indução de microrizomas;
- O uso do tratamento com 22,2  $\mu\text{M}$  BAP e 8% (p/v) de sacarose, permite maior formação de microrizomas de taro;
- Em mandioca, a cultivar Parazinha respondeu melhor à indução de raiz tuberiforme;
- O tratamento com 0,4  $\mu\text{M}$  BAP, 1,6  $\mu\text{M}$  ANA e 8% de sacarose, induziu a formação de raiz tuberiforme em mandioca, tanto em meio semisólido como em meio líquido;
- O comprimento médio da parte aérea, comprimento médio da raiz mais longa (cm) e número médio de raízes, foi maior na cultivar de mandioca Mantiqueira, porém, em meio de indução de raiz tuberiforme esta cultivar é considerada recalcitrante;
- A microtuberização *in vitro* é caracterizada pela presença de grãos de amido nos microrizomas e raízes tuberiformes de taro e mandioca, respectivamente.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEMANN, J. & HAMMES, P.S. Effect of photoperiod on tuberization in the Livingstone Potato (*Plectranthus esculentus* N.E.Br Lamiaceae). **Field Crops Research**, 98: 7-81, 2006.

CAMARGO FILHO, W.P., MAZZEI, A.R., ALVES, H.S. Mercado de raízes e tubérculos: análise e preços. **Informações econômicas**, 31: 36-44, 2001.

CARVALHO, E.F. Propagação de inhame (*Colocasia esculenta* (L.) Schott) pelo método de divisão de rizomas. **Ciência Agrônômica de Fortaleza**, 22: 61-66, 1991.

CENTRO INTERNACIONAL DE AGRICULTURA TROPICAL (CIAT). Yuca: Lo ultimo acerca de um cultivo milenario. Cali. **Boletim informativo**, CIAT, 2004.

CHAGAS, E.A., PASQUAL, M., RAMOS, J.D., PIO, L.A.S., DUTRA, L.F., CAZETTA, J.O. Cultivo de embriões imaturos de citros em diferentes concentrações de carvão ativado e ácido giberélico. **Ciência e Agrotecnologia**, 29: 1125-1131, 2005.

CORRÊA, R.M., PINTO, J.E.B.P., BERTOLUCCI, S.K.V., REIS, E.S., SOUZA, A.V. Potencial do carvão ativado, filtro amarelo e interação fotoperíodo/temperatura na formação de raízes tuberosas de batata-doce *in vitro*. **Ciência Rural**, 33: 423-430, 2003.

DEBON, S.J.J., TESTER, R.F., MILLAM, S., DAVIES, H.V. Effect of temperature on the synthesis, composition and physical properties of potato microtubers starch. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 76: 599-607, 1998.

ESTRADA, R., TOVAR, P., DODDS, J.H. Induction of in vitro tubers in a broad range of potato genotypes. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 7:3-10, 1986.

EWING, E.E. & STRUIK, P.C. Tuber formation in potato: induction, initiation, and growth. **Horticultural Reviews**, 14: 89-198, 1992.

FIGUEIREDO, L.F.A. **Indução de raízes tuberiformes de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz.) in vitro e em hidroponia**. Lavras, 1996. 105p. (Tese – Mestrado em Fisiologia Vegetal, Universidade Federal de Lavras, MG).

FOOD AND AGRICULTURE OF THE UNITED NATIONS (FAO). **A new strategy for cassava**. FAO: Rome, 2000.

HAN, Y., GÓMEZ-VÁSQUEZ, R., REILLY, K., LI, H., TOHME, J., COOPER, R.M., BEECHING, J.R. Hydroxyproline-rich glycoproteins expressed during stress responses in cassava. **Euphytica**, 120: 59-70, 2001.

HUSSEY, G. & STACEY, N.J. Factors affecting the formation of in vitro tubers of potato (*Solanum tuberosum* L.). **Annals Botany**, 53: 565-578, 1984.

IAS, INTERNATIONAL AROID SOCIETY. 2003 [Online]. **The genera Araceae**. Homepage: <http://www.aroid.org/genera/index.html#a>

JOHANSEN, D.A. **Plant Microtechnique**. New York: McGraw- Hill, 1940. 523p.

JOHN, J.L., COURTNEY, W.H., DECOTEAU, D.R. The influence of plant growth regulators and light on microtuber induction and formation in *Dioscorea alata* L. cultures. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 34: 245-252, 1993.

JUNQUEIRA, C.S. **Micropropagação de cultivares de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz.): embriogênese somática e multibrotação.** Viçosa, 2001. 52p. (Tese – Mestrado em Fitotecnia, Universidade Federal de Viçosa, MG).

KAHANE, R., DE LA SERVE, B.T., RANCILLAC, M. Bulbing in long-day onion (*Allium cepa* L.) cultured in vitro: comparison between sugar feeding and light induction. **Annals of Botany**, 69: 551-555, 1992.

KIM, S.K., LEE, S.C., KIM, K.M., LEE, B.H., LEE, I.J. Possible residual effects of gibberellic acid and gibberellin biosynthesis inhibitors on sprouting, early bulbil formation and tuber yield in Chinese yam. **Journal of Agronomy & Crop Science**, 189: 428-432, 2003.

LAUZER, D., LAUBLIN, G., VINCENT, G., CAPPADOCIA, M. *In vitro* propagation and cytology of wild yams, *Dioscorea abyssinica* Hoch. and *D. mangenotiana* Miège. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 28: 215-223, 1992.

LEONEL, M. & CEREDA, M.P. Caracterização físico-química de algumas tuberosas amiláceas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 22: 65-69, 2002.

LOPEZ-DELGADO, H. & SCOTT, I. Induction of *in vitro* tuberization of potato microplants by acetylsalicylic acid. **Journal of Plant Physiology**, 151: 74-78, 1997.

McMANUS, J. F. A. Histological and histochemical uses of periodic acid. **Stain Technology**, 23: 99-108, 1948.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, 15: 473-497, 1962.

NHUT, D.T., HUONG, N.T.D., KHIRM, D.V. Direct microtuber formation and enhanced growth in the acclimatization of in vitro plantlets of taro (*Colocasia esculenta* spp.) using hydroponics. **Scientia Horticulturae**, 101: 207-212, 2004.

NOWAK, J. & COLBORNE, D. *In vitro* tuberization and tuber proteins as indicators of heat stress tolerance in potato. **American Potato Journal**, 66: 35-45, 1989.

O'BRIEN, T.P. & McCULLY, M.E. **The study of plant structure principles and select methods**. Melbourne: Termarcarphi Pty. Ltda, 1981. 45p.

OMOKOLO, N.D., BOUDJEKO, T., TSAFACK TAKADONG, J.J. *In vitro* tuberization of *Xanthosoma sagittifolium* L. Shott: effects of phytohormones, sucrose, nitrogen and photoperiod. **Scientia Horticulturae**, 98: 337-345, 2003.

PEDRALLI, G., CARMO, C.A.S., CEREDA, M., PUIATTI, M.. Uso de nomes populares para as espécies de Araceae e Dioscoreaceae no Brasil. **Horticultura Brasileira**, 20: 530-532, 2002.

PEREIRA, F.H.F.P., PUIATTI, M., MIRANDA, G.V., SILVA, D.J.H., FINGER, F.L. Caracterização agrônômica da produção de rizomas de clones de taro. **Horticultura Brasileira**, 21: 99-105, 2003.

PERES, L.E.P., CARVALHO, R.F., ZSÖGÖN, A., BERMÚDEZ-ZAMBRANO, O.D., ROBLES, W.G.R., TAVARES, S. Grafting of tomato mutants onto potato rootstocks: an approach to study leaf-derived signaling on tuberization. **Plant Science**, 169: 680-688, 2005.

PÉREZ, E., SCHULTZ, F.S., DELAHAYE, E.P. Characterization of some properties of starches isolated from *Xanthosoma sagittifolium* (taioba) e *Colocassia esculenta* (taro). **Carbohydrate Polymers**, 60: 139-145, 2005.

PUIATTI, M., KATSUMOTO, R., PEREIRA, F.H.F., BARRELLA, T.P. Crescimento de plantas e produção de rizomas de taro 'Chinês' em função do tipo de muda. **Horticultura Brasileira**, 21: 110-115, 2003.

RANALLI, P., BASSI, F., RUARO, G., DEL RE, P., DI CANDILO, M., MANDOLINO, G. Microtuber and minituber production and field performance compared with normal tubers. **Potato Research**, 37: 383-391, 1994.

REILLY, K, HAN, Y., TOHME, J., BEECHING, J.R. Isolation and characterization of a cassava catalase expressed during post-harvest physiological deterioration. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1518: 317-323, 2001.

REIS, A.J. Aspectos Econômicos da Mandioca. **Informe Agropecuário**, (EPAMIG), Belo Horizonte, MG. 145: 3-8, 1987.

ROSS, H.A., DAVIES, H.V., BURCH, L.R., VIOLA, R., MCRAE, D. Developmental changes in carbohydrate content and sucrose degrading enzymes in tuberising stolons of potato (*Solanum tuberosum*). **Physiologia Plantarum**, 90: 748-756, 1994.

SILVA, J.A.B., OTONI, W.C., MARTINEZ, C.A. DIAS, L.M., SILVA, M.A.P. Microtuberization of Andean potato species (*Solanum* spp.) as effected by salinity. **Scientia Horticulturae**, 89: 91-101, 2001.

SOARES, J.G. **Crescimento do inhame (*Colocasia esculenta* (L.) Schott) em duas condições agroclimáticas, em seis níveis de água e cobertura morta**. Viçosa, 1991. 85p. (Tese – Mestrado em Fitotecnia, Universidade Federal de Viçosa, MG).

TAIZ, L. & ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Artmed Editora Ltda. Porto Alegre, 3 ed., p 346-481, 2004.

ULLOA, R.M., MAC INTOSH, G.C., MELCHIORRE, M., MENTABERRY, A.N., DALLARI, P., MORICONI, D.N., TÉLLEZ-IÑÓN, M.T. Protein kinase activity in different stages of potato (*Solanum tuberosum* L.) microtuberization. **Plant Cell Reports**, 16: 426-429, 1997.

VERAMENDI, J., WILLMITZER, L., TRETHERWEY, R.N. *In vitro* grown potato microtubers are a suitable system for the study of primary carbohydrate metabolism. **Plant Physiology and Biochemistry**, 37: 693-697, 1999.

VILLAFRANCA, M.J., VERAMENDI, J., SOTA, V., MINGO-CASTEL, A.M. Effect of physiological age of mother tuber and number of subcultures on *in vitro* tuberization of potato (*Solanum tuberosum* L.). **Plant Cell Reports**, 17: 787-790, 1998.

XU, X., VAN LAMMEREN, A.M., VERMEER, E., VREUGDENHIL, D. The role of gibberellin, abscisic acid, and sucrose in the regulation of potato tuber formation *in vitro*. **Plant Physiology**, 117: 575-584, 1998.

WOICIECHOWSKI, A.L., NITSCHKE, S., PANDEY, A., SOCCOL, C.R. Acid and enzymatic hydrolysis to recover reducing sugars from cassava bagasse: an economic study. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 45: 393-400, 2002.

ZOBAYED, S.M., ARMSTRONG, J., ARMSTRONG, W. Micropropagation of potato: evaluation of closed, diffusive and forced ventilation on growth and tuberization. **Annals of Botany**, 87: 53-59, 2001.

## CAPÍTULO II

---

### Efeito dos Estresses Salino e da Baixa Temperatura *in vitro* em Cultivares de Mandioca e Taro

#### RESUMO

Objetivou-se estudar as alterações que ocorrem no comportamento morfo-fisiológico *in vitro* de cultivares de mandioca e taro, quando submetidas a estresses salino e de baixa temperatura. Plantas de taro e mandioca tuberizadas em meio MS foram transferidas para meio com diferentes concentrações salinas (0, 50, 75 e 100 mmol L<sup>-1</sup> de NaCl). Já, os experimentos de estresse térmico constaram dos seguintes tratamentos: 5°, 10° e 25°C, por um período de 7 dias. Foram mensurados os níveis de etileno aos 5, 20 e 40 dias de cultivo para o experimento de estresse salino, e 3 e 7 dias para o térmico. Também foram realizadas análises bioquímicas (POD, PPO e CAT) e isoenzimas, além da análise das características morfológicas decorrentes do estresse abiótico. A adição de NaCl ao meio de cultivo induziu o estresse oxidativo, caracterizado pelo aumento da atividade de enzimas antioxidantes POD e CAT e por elevada concentração de etileno. Houve diferença de tolerância aos estresses térmico e salino entre as cultivares de mandioca e taro. A presença de NaCl em meio líquido aumentou produção de etileno e a atividade da catalase. A baixa temperatura, por sua vez, ocasionou aumento da atividade de POD e CAT e da produção de etileno em mandioca. Em taro, o estresse oxidativo foi caracterizado pelo aumento da atividade de enzimas antioxidantes POD e PPO, a 5°C. Houve diferença na atividade de enzimas em diferentes partes da planta de mandioca e taro, ocorrendo duas isoenzimas para POD e PPO nos microrizomas e, ainda, uma para POD e duas para PPO na parte aérea de taro; já em mandioca observou-se duas isoenzimas para POD e uma para PPO no sistema radicular.

## CAPÍTULO II

### EFEITO DOS ESTRESSES SALINO E DA BAIXA TEMPERATURA *in vitro* EM CULTIVARES DE MANDIOCA E TARO

#### 1. INTRODUÇÃO

Na natureza, as plantas geralmente estão sujeitas à severas condições ambientais de estresse como seca, salinidade e frio, que podem retardar o crescimento e o desenvolvimento, reduzir a produção e, em casos extremos, induzir injúria letal para a planta. Para assegurar a sobrevivência, as plantas desenvolvem estratégias de respostas para os vários tipos de estresse abióticos (Morsy et al., 2007).

Vários genes que se expressam após estímulos de estresse, como de salinidade, de seca e de frio, têm sido estudados em nível transcricional. Os produtos destes genes induzidos pelo estresse foram classificados em dois grupos, primeiro: protegem diretamente contra o estresse ambiental; segundo: regulam a expressão de genes e transdução de sinal em resposta ao estresse (Seki et al., 2003).

A baixa temperatura é considerada fator de influência no comportamento e desenvolvimento das espécies vegetais. A aclimação de espécies ao frio é acompanhada por alterações bioquímicas e fisiológicas, que por sua vez, são controladas pela expressão gênica. As propriedades das membranas são afetadas por baixas temperaturas, ocorrendo alteração no fluxo de água e íons, interferindo nas atividades de diversas enzimas (DaMatta & Ramalho, 2006), e ocorrendo, ainda, a produção de oxigênios reativos (ROS). Uma vez que o dano na integridade da membrana é um efeito comum do estresse, especificamente no caso de baixa temperatura, os ROS apresentam importante função na peroxidação de lipídeos e dano da membrana e, conseqüentemente, na senescência da planta (Morsy et al., 2007).

O grau e duração de frio podem ser letais a maioria dos organismos, devido à desidratação intracelular pelo ambiente e dano físico ocasionado pela formação de cristais de gelo (Jacobsen et al., 2005). Apesar disso, a

resposta para um tipo específico de estresse pode variar com o genótipo, ainda assim, algumas das reações são comuns em todos os genótipos (Morsy et al., 2007).

Uma importante e comum resposta ao estresse de frio e seca encontrada em *Avena sativa* L., parece ser o aumento na acumulação de açúcares solúveis; o conteúdo de prolina e sacarose também aumentam com a duração do estresse. Por outro lado, a raiz é uma parte crítica da planta, apresentando maior resistência ao frio (Kerepesi et al., 2004; Jacobsen et al., 2005). Além disso, as mudanças na composição de lipídeos da membrana plasmática, em consequência a aclimação ao frio, representa o resultado de um dos muitos e diferentes tipos de cascata de sinalização. O ponto inicial de todas essas cascatas sensíveis à temperatura pode ter um ou vários mecanismos desconhecidos, que resultam na reprogramação da transcrição (Bohn et al., 2007).

Outro ponto chave, na proteção das plantas a temperaturas de congelamento sempre foi atribuído às membranas celulares, em particular à plasmalema. O decréscimo da temperatura e da hidratação pode ser contrabalançado por mudanças tanto no interior da membrana hidrofóbica, como na superfície da membrana hidratada, respectivamente, para garantir a impermeabilidade a íons, bem como adequadas funções de enzimas ligadas à membrana (Bohn et al., 2007).

A cultura de tecidos evita as complexidades fisiológicas e estruturais da planta, podendo controlar a homogeneidade do estresse e suas implicações, e então fornecer importante ferramenta para o estudo dos efeitos do frio e da salinidade e seus mecanismos (Kerepesi et al., 2004). Assim, esta técnica torna-se conveniente para investigar as relações entre resposta celular e planta inteira ao NaCl (Bajji et al., 1998).

O estresse salino resulta em inúmeros processos prejudiciais que incluem acumulação de níveis tóxicos de íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$ , redução na disponibilidade de nutrientes, inibição do crescimento e da fotossíntese na maioria das plantas, modificação no status de água nos tecidos, e secundariamente, como o estresse oxidativo ligado à produção de espécies de oxigênios reativos (Bajji et al., 1998; Chen et al., 1998).

Importante aspecto na tolerância à salinidade é a habilidade das plantas de excluir ou compartimentar íons tóxicos, como  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$ . A tolerância não está simplesmente relacionada à compartimentação de  $\text{NaCl}$  nos vacúolos celulares, mas também à diferente distribuição de certos íons entre as células, resultando em importante atributo nas plantas tolerantes (Morales et al., 1998).

Algumas das mudanças morfológicas são a redução do crescimento da parte aérea, no comprimento da raiz e restrições no enraizamento. Entre a indução das respostas bioquímicas estão as mudanças na síntese de proteínas solúveis, decréscimo no conteúdo de proteína, geralmente é relacionado com a resposta das plantas a salinização. Outro marcador bioquímico frequentemente usado quando se estuda estresse ou processos fisiológicos é a atividade de peroxidases (Evers et al., 1997). Peroxidases são amplamente distribuídas em plantas superiores. Uma de suas funções mais importantes é de atuar como complexa enzima de defesa nas células. As mudanças na atividade de peroxidases estão relacionadas à influência de fatores ambientais, que inclui o estresse salino (Radic et al., 2006).

As peroxidases (EC 1.11.7, POD) são enzimas que catalisam a oxidação de grande número de estruturas aromáticas, utilizando peróxido de hidrogênio como aceptor de elétrons (Neves, 2003). As POD são glicoproteínas que apresentam átomos de ferro como grupo prostético e diferentes quantidades de resíduos de carboidratos. Dois grupos principais de isoperoxidases têm sido distinguidos (ácido e básico), com ponto isoelétrico variando de 3,5 a 9,5. Localizam-se, principalmente, na parede celular e nos vacúolos das células de plantas superiores, podendo sua localização variar de acordo com a idade, espécie e grau de diferenciação (Radic et al., 2006).

De ampla ocorrência em plantas superiores, as POD atuam na remoção de átomos de hidrogênio dos grupos álcoois, combinando-se com o peróxido de hidrogênio para formar moléculas de água (Radic et al., 2006); e estão envolvidas em processos como biossíntese de lignina, na suberização de parede celular e no metabolismo de auxinas. Podem, ainda, desempenhar função chave em processos relacionados a estresses de

variadas naturezas, incluindo resistência a patógenos, abscisão, produção de etileno e escurecimento de tecidos (Neves, 2003).

As polifenoloxidasas (EC 1.14.18.1, PPO) são monooxigenases do grupo das óxido-redutases que contêm cobre em sua estrutura e que se localizam nas membranas celulares, nas quais se encontram inativas, tornando-se ativas quando liberadas. As PPO, por sua vez, promovem a oxidação enzimática de compostos fenólicos produzindo, inicialmente, quinona que rapidamente se condensa, formando pigmentos insolúveis e escuros denominados melanina, ou reagem não-enzimaticamente com aminoácidos, proteínas ou outros compostos (Marri et al., 2003).

A catalase (EC 1.11.1.6, CAT) é outra classe de enzimas que tem tido sua atividade associada aos danos, principalmente, pela injúria por frio. A remoção do peróxido de hidrogênio pela catalase pode estar diretamente envolvida com a regulação da resposta a este estresse nas plantas, pois a produção de ROS tem sido evidenciada em processos oxidativos induzidos durante condições de estresse abiótico, assim como, injúria por frio, déficit hídrico e salinidade (Anderson, 2002).

A CAT é encontrada em todos os organismos aeróbicos e, em plantas superiores, é uma das principais enzimas responsáveis pela defesa contra o estresse oxidativo, pois promove a formação de oxigênio e de água a partir do peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). Esta enzima está localizada em microcorpos (peroxissomos, glioxissomos e organelas relacionadas) onde enzimas oxidativas, produtoras de  $H_2O_2$ , estão presentes (Willekens et al., 1995).

A ação da CAT pode diminuir a peroxidação dos lipídios das membranas. O prejuízo que a peroxidação causa a plasmalema promove a alteração de sua estrutura e função, podendo ocorrer vazamento do conteúdo celular, desidratação rápida e morte da célula. Quando o dano ocorre nas membranas intracelulares, pode afetar a atividade respiratória nas mitocôndrias, causar degradação de pigmentos e perda da habilidade dos cloroplastos em fixar carbono (Neves, 2003).

Etileno ( $C_2H_4$ ) é o fitohormônio envolvido em grande número de processos fisiológicos, como amadurecimento de frutos e flores, crescimento e, desenvolvimento, diferenciação de pelos radiculares, abscisão e

senescência em plantas, além de regular a expressão de vários genes, incluindo aqueles relacionados ao amadurecimento e a patógenos (Adachi et al., 1996; Taiz & Zeiger, 2004).

É formado em muitos órgãos dos vegetais superiores. Tecidos senescentes e frutos em amadurecimento produzem mais etileno que tecidos jovens ou maduros (Taiz & Zeiger, 2004). A rota de biossíntese de etileno é bem estabelecida em plantas, onde o etileno é sintetizado a partir da metionina via S-adenosilmetionina (SAM) e ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC). Há ainda, duas importantes enzimas, sintase do ACC e a oxidase do ACC (formalmente denominada enzima de formação de etileno), que são essenciais na regulação da biossíntese do etileno. A primeira enzima, catalisa a síntese de ACC a partir de SAM e, a segunda, a conversão de ACC a etileno (Kasai et al., 1996). A síntese de etileno é desencadeada por vários processos de desenvolvimento, pelas auxinas e pelo estresse ambiental.

Geralmente, o etileno está presente nas condições de estresse, como doenças, danos, baixas temperaturas e, em locais de armazenamentos de frutos e hortaliças. O etileno aumenta a atividade de fenilalanina amônioliase (PAL), POD e da PPO. O aumento da atividade da PAL promove a síntese do ácido cinâmico e derivados via rota do ácido shikímico. Estes compostos se tornam, então, disponíveis para a síntese de lignina. Indução de etileno e atividade de POD é correlacionada com o aumento e formação de lignina e espessamento da parede celular. Outros produtos da rota do shikimato, os flavonóides e ácido clorogênico, são oxidados pela PPO (Fan & Mattheis, 2000).

Este trabalho teve como objetivo estudar as alterações fisiológicas que ocorrem em cultivares de mandioca e taro, *in vitro*, quando submetidas a condições de estresses salino e de baixa temperatura.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Material Vegetal

As cultivares de taro (*Colocasia esculenta* L. Schott) Chinês (BGH 5928) e Japonês (BGH 5925), foram obtidos da área experimental da Horta de Pesquisas da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, Minas Gerais. Seus rizomas foram submetidos ao processo de assepsia no Laboratório de Progênes de Hortaliças/UFV e, logo após, inoculados em meio MS. As cultivares de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz.) utilizadas foram: Mantiqueira, obtida do Laboratório de Cultura de Tecidos, BIOAGRO/UFV e Parazinha e Vassourinha oriunda da EMBRAPA/CERNAGEN, Brasília, todas já em condições assépticas.

### 2.2. Estabelecimento e Manutenção das Culturas

As plantas de taro foram estabelecidas *in vitro* a partir das gemas apicais obtidas do rizoma mãe. Foi utilizado meio de cultura constituído do sais MS (Murashige e Skoog, 1962), mio-inositol (0,01%; p/v; Sigma Chem. Co., USA ) e sacarose (0,3%; p/v), suplementado com 8,88  $\mu\text{M}$  de BAP (6-Benzilaminopurina; Sigma Chem. Co., USA), solidificado com Fitagel (0,23%, p/v; Sigma Chem. Co., USA). O pH dos meios foi corrigido para  $5,7 \pm 0,1$ , antes da autoclavagem, sendo utilizado 12 mL por tubo de ensaio (25 x 150 mm), vedados com tampa de poliestireno. Os meios foram autoclavados a 120°C, a 1,5 atm, durante 15 minutos. As culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura controlada e irradiância de 50-60  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

Os segmentos nodais dos genótipos de mandioca foram cultivados *in vitro* em meio MS, mio-inositol (0,01%) e sacarose (3%), desprovido de reguladores de crescimento, e solidificado com Fitagel (0,23%). O pH dos meios também foram corrigidos para  $5,7 \pm 0,1$ , utilizando 12 mL por tubo de ensaio, vedados com tampa de poliestireno. A autoclavagem dos meios foi a 120°C e a 1,5 atm, durante 15 minutos. As culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura controlada e irradiância de 50-60  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

Esta etapa teve como meta a micropropagação dos genótipos, constituindo a fonte de material vegetal que foi utilizado durante todo o trabalho.

### 2.3. Condições de Cultura

Primeiramente, tanto as cultivares de taro quanto de mandioca foram submetidas ao meio de microtuberização, conforme capítulo I. Em taro o meio indutor de microrizomas foi constituído de sais de MS, suplementado de mio-inositol (0,01%), vitaminas de MS, acrescido de 22,2  $\mu\text{M}$  BAP e 8% de sacarose, e solidificado com Fitigel (0,23%). O pH do meio foi corrigido para  $5,7 \pm 0,1$ , antes da autoclavagem. O experimento foi conduzido sob regime luminoso de 16 horas de luz e oito horas diárias de escuro, à temperatura de  $27 \pm 1^\circ\text{C}$  e irradiância de  $50\text{-}60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

Nas cultivares de mandioca, o meio de indução de raízes tuberiformes foi o MS semisólido, suplementado de mio-inositol (0,01%), vitaminas de MS 0,4  $\mu\text{M}$  BAP, 1,6  $\mu\text{M}$  ANA, 8% de sacarose, sendo solidificado com Fitigel (0,23%). O pH do meio foi corrigido para  $5,7 \pm 0,1$ , antes da autoclavagem. O experimento foi conduzido sob dois fotoperíodos: o primeiro, denominado indução, com 16 horas de luz e oito horas diárias de escuro, por quatro dias; o segundo regime luminoso constou de 16 horas escuro e 8 horas diárias de luz (dia curto), todos à temperatura de  $27 \pm 1^\circ\text{C}$  e irradiância de  $50\text{-}60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

Após a obtenção dos microrizomas de taro e raízes tuberiformes de mandioca *in vitro*, com aproximadamente 40 e 30 dias, respectivamente, as estruturas foram submetidas às condições de estresse, detalhadas a seguir:

#### 2.3.1. Estresse Salino

Após a fase de microtuberização as plantas foram submetidas a níveis de salinidade de 0, 50, 75 e 100  $\text{mmol L}^{-1}$  de NaCl, durante o período de 40 dias.

#### 2.3.1.1. Experimento 1

Microrizomas de taro Japonês e Chinês foram submetidas aos seguintes tratamentos: 22,2  $\mu\text{M}$  BAP, 8% sacarose + 0  $\text{mmol L}^{-1}$  NaCl (**T1**); 22,2  $\mu\text{M}$  BAP, 8% p/v sacarose + 50  $\text{mmol L}^{-1}$  NaCl (**T2**); 22,2  $\mu\text{M}$  BAP, 8% sacarose + 75  $\text{mmol L}^{-1}$  NaCl (**T3**); 22,2  $\mu\text{M}$  BAP, 8% sacarose + 100  $\text{mmol L}^{-1}$  NaCl (**T4**).

#### 2.3.1.2. Experimento 2

As cultivares de mandioca Parazinha, Vassourinha e Mantiqueira, foram submetidas aos seguintes tratamentos: 0,4  $\mu\text{M}$  BAP, 1,6  $\mu\text{M}$  ANA, 8% sacarose + 0  $\text{mmol L}^{-1}$  NaCl (**T1**); 0,4  $\mu\text{M}$  BAP, 1,6  $\mu\text{M}$  ANA, 8% sacarose + 50  $\text{mmol L}^{-1}$  NaCl (**T2**); 0,4  $\mu\text{M}$  BAP, 1,6  $\mu\text{M}$  ANA, 8% sacarose + 75  $\text{mmol L}^{-1}$  NaCl (**T3**); e 0,4  $\mu\text{M}$  BAP, 1,6  $\mu\text{M}$  ANA, 8% sacarose + 100  $\text{mmol L}^{-1}$  NaCl (**T4**).

#### 2.3.1.3. Experimento 3

Somente a cultivar Parazinha foi submetida ao meio de salinização (conforme descrito em 2.3.1.3), porém em meio de cultura líquido.

### 2.3.2. Estresse por Baixa Temperatura

Posteriormente ao processo de microtuberização as plantas, tanto de taro, como as de mandioca, foram condicionadas as temperaturas 5, 10 e 25°C, por períodos de 3 e 7 dias.

#### 2.3.2.1. Experimento 1

As cultivares de taro, Japonês e Chinês, foram submetidas ao meio MS adicionado de 22,2  $\mu\text{M}$  BAP, 8% (p/v) sacarose, sob as temperaturas de 5, 10 ou 25 °C, perfazendo 3 tratamentos para cada cultivar.

#### 2.3.2.2. Experimento 2

As cultivares de mandioca Parazinha, Vassourinha e Mantiqueira foram submetidas ao meio MS adicionado de 0,4  $\mu$ M BAP, 1,6  $\mu$ M ANA e 8% sacarose, sob as temperaturas de 5, 10 ou 25 °C, perfazendo 3 tratamentos para cada cultivar.

#### 2.4. Análises das Características das Plantas Submetidas a Tipos de Estresse

A fim de determinar as melhores condições de cultivo para obtenção de plantas normais e resistentes aos tipos de estresse, as plantas em condições assépticas, foram transferidas para o meio de formação de microrizoma (taro) ou de raízes tuberiformes (mandioca). Os meios correspondentes aos tratamentos variaram entre as culturas, como previamente mencionados.

A determinação de etileno foi realizada durante os tratamentos de estresse. Além disso, ao final dos diferentes experimentos foram coletadas amostras para as análises bioquímicas.

##### 2.4.1. Análise Bioquímica

O extrato enzimático bruto para a determinação da atividade de peroxidase (POD), catalase (CAT) e polifenoloxidase (PPO) foi obtido pela homogeneização de 0,3 g de tecidos da parte aérea e raiz ou rizoma (congelados em nitrogênio líquido e mantidos a -80 °C) com 2 mL de solução de extração (NaCl a 150 mM em tampão de fosfato de potássio 0,1 M, pH 6,5), em almofariz de porcelana. Os fragmentos de células foram removidos por centrifugação a 12000g por 30 minutos, utilizando o sobrenadante como fonte de proteínas, de acordo com metodologia descrita por Neves (2003), para POD e com algumas modificações, para polifenoloxidase PPO. Para CAT a metodologia seguida foi de Chan & Tian (2006). Todas as etapas necessárias ao processo foram executadas a 4 °C.

### **Peroxidase (POD EC 1.11.1.7)**

As atividades de PODs, tanto na parte aérea como nas raízes ou rizomas, foram determinadas espectrofotometricamente a 25 °C, pelo aumento da absorbância a 470 nm, a partir da reação de 10 mL do extrato enzimático bruto em uma mistura de reação contendo 1,5 mL de tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 6,5, 0,5 mL de guaiacol, 0,5 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e 0,49 mL de H<sub>2</sub>O, em um volume total de 3 mL (Neves, 2003). Os resultados foram expressos em Unidades de Absorbância (UA) min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de proteína.

### **Catalase (CAT EC 1.11.1.6)**

A atividade das CATs nos tecidos foi determinada após a adição de 0,2 mL do extrato enzimático bruto a 2,9 mL do meio de reação constituído de 50 mM de tampão fosfato de sódio, pH 7,0, com 100 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, como substrato (Chan & Tian, 2006). A decomposição do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi medida espectrofotometricamente pelo declínio na absorbância a 240 nm. A atividade da enzima foi determinada pelo decréscimo na absorbância a 240 nm e expressa em µmoles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de proteína.

### **Polifenoloxidase (PPO EC 1.14.18.1)**

Para a determinação da atividade da PPO, 140 µL de extrato enzimático foram adicionados ao meio de reação contendo 170 µL de catecol, 190 µL de água destilada, 500 µL de tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,0 (Neves, 2003). As reações foram acompanhadas em espectrofotômetro, pela variação da absorbância, no comprimento de onda de 410 nm, a 25°C, imediatamente após a mistura e a atividade da PPO também foi expressa em Unidades de Absorbância (UA) min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de proteína.

### **Quantificação de proteínas**

As determinações da quantidade de proteína presente nos referidos extratos foram feitas pelo método de Bradford (1976), usando Soroalbumina Bovina (BSA) como padrão.

## **Isoenzimas**

Foram utilizadas na análise isoenzimática, amostras de parte aérea e raízes estressadas ou não, previamente congeladas em nitrogênio líquido e mantidas a -80 °C. Para a extração, cerca de 100 mg de tecido para cada mL de solução-tampão foram macerados utilizando almofariz e pistilo, previamente congelados e mantidos sobre barras de gelo (Arimura, 1997).

Os sistemas isoenzimáticos foram caracterizados pela técnica de eletroforese horizontal em géis de amido de milho a 12% em solução tampão (Conkle et al., 1982).

No preparo do gel, foram empregados 350 mL de solução-tampão, dos quais 80 mL foram vertidos em um balão volumétrico de 1000 mL e levados à fervura em fogo brando. Imediatamente após a fervura, o conteúdo do balão volumétrico foi vertido em Erlenmeyer e este retornado à chama, para o cozimento do amido. Em seguida, o conteúdo do Erlenmeyer foi vertido em uma forma de acrílico (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.

Para aplicação das amostras e corrida eletroforética, 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. O tecido vegetal macerado em solução tampão foi aplicado em uma tira de papel cromatográfico Whatman 3 MM (12 x 5 mm), com auxílio de uma pinça, para absorção do filtrado. As amostras absorvidas pelas tiras de papel foram colocadas ao longo da maior face cortada do gel, 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, conectando-se o gel às cubas dos eletrodos, mediante uma ponte de pano tipo Perfex previamente embebida na solução tampão específica para cada sistema enzimático.

Fez-se uma pré-corrida eletroforética durante 15 minutos a 150 volts, a fim de que as proteínas fossem liberadas das tiras de papel Whatman 3 MM para o gel. Desligou-se o aparelho, retirou-se o gel das cubas e, em seguida, removeram-se as tiras com auxílio de pinça cirúrgica. Após este procedimento, conectou-se novamente o gel às cubas e ligou-se o aparelho a 200 volts, segundo metodologia utilizada por Arimura (1997). Após a corrida eletroforética, o gel foi cortado horizontalmente em quatro fatias, com auxílio de guias e mediante o uso de um fio de nylon. 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 POD, as bandejas refratárias foram colocadas em câmara fria a 4°C, até o aparecimento das bandas isoenzimáticas. Já para o sistema isoenzimático da PPO as bandejas refratárias foram colocadas em estufa à temperatura de 37°C, e as bandejas para CAT ficaram em temperatura ambiente, até o aparecimento das bandas isoenzimáticas. Em seguida, as soluções reveladoras foram descartadas pela passagem de água corrente e os padrões nos géis serem 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% (v/v) de álcool etílico, 30% (v/v) de água e 5% (v/v) de glicerina, durante 5 minutos, com o objetivo de se desidratarem os géis. Imediatamente após, os géis foram secados pelo método do bastidor e armazenados em papel-toalha. A avaliação das bandas foi feita de acordo com a sua intensidade.

#### 2.4.2. Mensuração da concentração de etileno

Para a determinação da concentração de etileno produzido no interior dos frascos de cultivo, ao longo do desenvolvimento nos períodos de estresse foram utilizados frascos de 55 mL de capacidade, contendo 12 mL de meio. Os frascos foram tampados com três camadas de filme plástico transparente de PVC (BanPack), no qual foram fixados septos de silicone para retirada das amostras da atmosfera interna, e as culturas foram

aconditionadas em sala de crescimento sob temperatura de  $27 \pm 1^\circ\text{C}$  e irradiância de  $50\text{-}60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , até a formação dos microtubérculos.

Nos ensaios de estresse salino que teve duração de 40 dias, a mensuração de etileno ocorreu 5, 20 e 40 dias de cultivo, tanto para mandioca, como para taro. Os frascos foram abertos em câmara de fluxo laminar, por 30 minutos, para permitir as trocas gasosas com o meio externo e então, vedado novamente e levados à sala de crescimento. Ao final de 24 horas, com auxílio de uma seringa de  $1 \text{ cm}^3$  com agulha tipo 29G de  $\frac{1}{2}$  polegada (B-D, Becten Dickinson Co., EUA), 1 mL do ambiente interno dos frascos foi retirado e utilizado como fonte de amostras para determinação da concentração de etileno produzido em 24 horas, para o período de mensuração.

Nos ensaios de estresse por baixa temperatura, a mensuração de etileno ocorreu após 3 e 7 dias de cultivo para ambos, mandioca e taro; os frascos foram abertos em câmara de fluxo laminar, por 30 minutos, para permitir as trocas gasosas com o meio externo e, então, vedados novamente e levados à sala de crescimento. Após 3 e 7 dias, com auxílio de uma seringa de  $1 \text{ cm}^3$  com agulha tipo 29G de  $\frac{1}{2}$  polegada (B-D, Becten Dickinson Co., EUA), 1 mL do ambiente interno dos frascos foi retirado e utilizado como fonte de amostras para determinação da concentração de etileno acumulado, para o período de mensuração.

A unidade experimental foi composta por 3 frascos, com 3 repetições cada. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, tanto em taro como em mandioca. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), empregando-se o programa SAEG - Sistema de Análises Estatísticas e Genéticas da UFV (Euclides, 1983), e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Dunnett, em nível de 5% de probabilidade.

A mensuração dos níveis de etileno foi realizada utilizando-se o cromatógrafo a gás SHIMADZU, modelo GC-14B, equipado com coluna de aço inoxidável empacotada com Poropak-Q de 1,60 m de comprimento. As temperaturas da coluna e do injetor foram  $50$  e  $100^\circ\text{C}$ , respectivamente. A detecção do etileno foi realizada por detector de ionização de chama a

150°C. O etileno acumulado foi expresso em  $\mu\text{L C}_2\text{H}_4 \text{ ml}^{-1} \text{ g}^{-1}$  de matéria fresca.

## 2.5. Delineamento Experimental e Análise Estatística

Em todos os experimentos foi adotado o delineamento inteiramente casualizado, tanto em taro como em mandioca. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey e Dunnett, a 5% de probabilidade ou foi calculado o erro padrão da média.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. Estresse Salino

##### **Experimento 1:**

Observou-se maior concentração de produção de etileno na cultivar Chinês (656, 60  $\mu\text{L C}_2\text{H}_4 \text{ ml}^{-1} \text{ g}^{-1}$  de matéria fresca em 24 horas, quando comparada à 'Japonês' (116,46  $\mu\text{L C}_2\text{H}_4 \text{ ml}^{-1} \text{ g}^{-1}$  de matéria fresca).

Com relação aos dias de mensuração verificou-se que os dias com maior emissão de etileno foram o tempo inicial (com 5 dias) e final (40 dias) de cultivo, nas cultivares Japonês e Chinês, respectivamente (Figuras 1A e 1B). Provavelmente, isto se deve a indução de estresse mais acentuado nestes períodos, ocasionando maior emissão de etileno. Isto porque, o período inicial (5 dias) com 50  $\text{mmol L}^{-1}$  de NaCl, pode ter favorecido a liberação dos ROS. Já no tempo final (40 dias), o aumento da produção de etileno ocorreu concomitantemente com o aumento da concentração de sal (100  $\text{mmol L}^{-1}$  de NaCl). Poderia estar relacionado com a rota metabólica do etileno que muda conforme os níveis de salinidade, revelando tolerância (baixa produção de etileno sob baixa salinidade) ou sensibilidade (aumento da produção sobre uma concentração de sal) do explantes à salinidade (Roussos et al., 2006), indicando que os explantes de taro foram tolerantes até certo nível de salinidade (50  $\text{mmol L}^{-1}$  de NaCl). Constatou-se ainda, que aos 20 dias a emissão de etileno não foi alterada, independente dos níveis de NaCl, devido a provável tentativa de adaptação das plantas, ocasionando assim menores níveis de etileno em ambas as cultivares, durante este período.

A tolerância ao sal em parte é devido, principalmente, a características bioquímicas e fisiológicas que contribuem para a aquisição da resistência, que é regulada por diferentes níveis de organização via expressão gênica. Em outras palavras, a tolerância ao sal não é conferida por um único fator genético, mas sim por característica de natureza multigênicas (Vinocur & Altman, 2005).

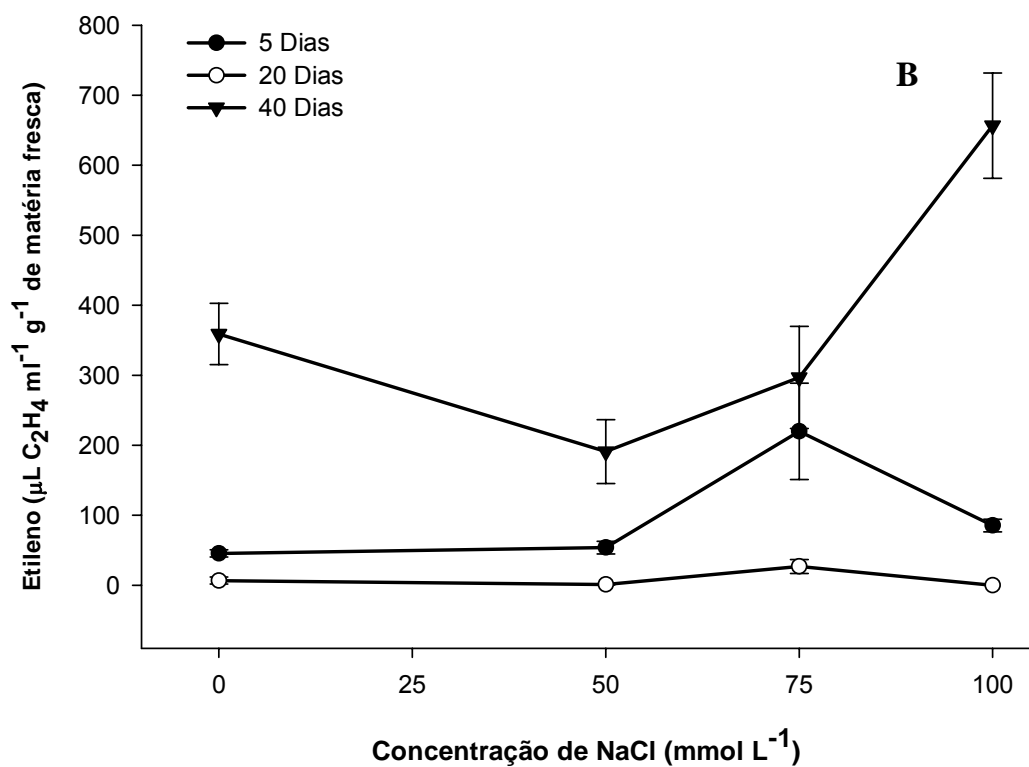
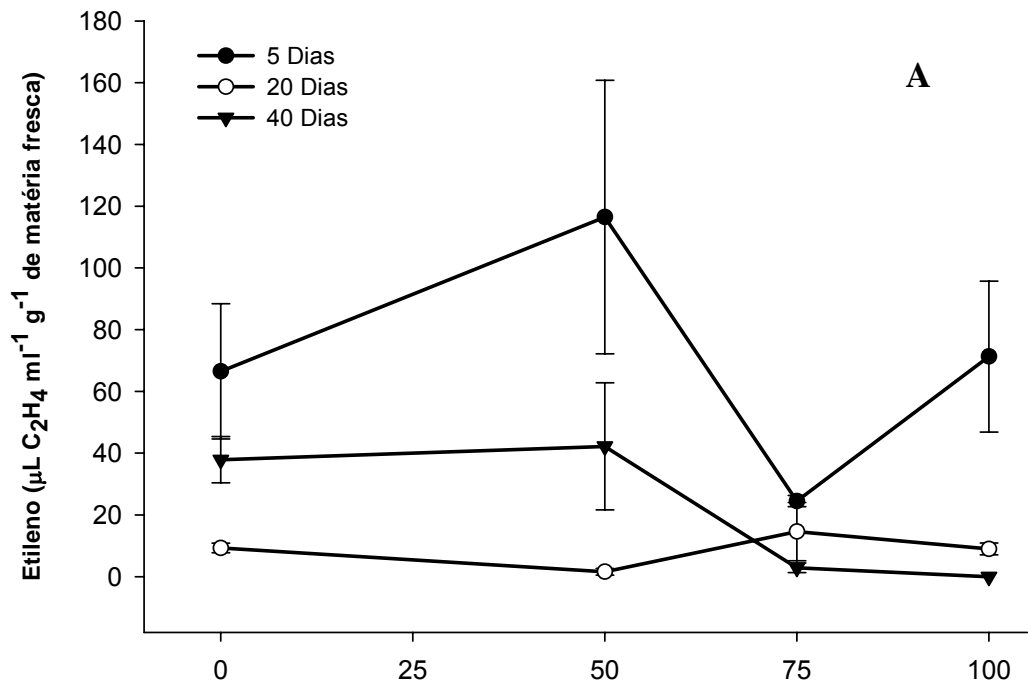


Figura1: Etileno acumulado em 24 horas nos frascos de plantas de taro microtuberizadas, submetidas ao estresse salino, avaliado aos 5, 20 e 40 dias após início do tratamento. A - Japonês; B - Chinês.

## Experimento 2:

Neste ensaio houve diferença significativa, na produção de etileno, entre os genótipos estudados. Observou-se no tempo inicial houve elevada concentração de etileno nas plantas crescidas sob estresse salino (Figuras 2A, 2B e 2C) em todas as cultivares. No entanto, a evolução de etileno decresceu nas doses superiores a  $50 \text{ mmol L}^{-1}$  de NaCl.

As respostas diferenciadas entre as cultivares, devem-se, provavelmente, às diferenças genótípicas, que tem diferenças de tolerância à semelhança do observado em estudos de microtrotuberização em batateiras (Lopez-Delgado & Scott, 1997). Roussos et al. (2006), trabalhando com jojoba, verificaram que a evolução de etileno aumentou significativamente em plantas submetidas ao estresse salino. Além disso, Friedman & Rot (2006) sugeriram que a injúria é devido, principalmente, a formação de radicais livres de oxigênio, que promove a oxidação de proteínas e lipídios. Já aos 20 e 40 dias a emissão de etileno foi muito baixa ou próxima à zero, isto porque em algumas cultivares o efeito da salinidade foi tão grave que ocasionou a morte de grande número de plantas, as quais tiveram ausência na produção de etileno (Figura 3). Por outro lado, este resultado pode ser devido a fato de que a resposta ao estresse parece mediar a rápida produção endógena de etileno, que é retroinibida pelo próprio etileno, subsequentemente, pela inibição da sintase do ACC (Barbosa, 2006).

Ao mesmo tempo, pode-se inferir que a cultivar mais sensível ao NaCl é a Vassourinha, por causa das maiores concentrações de etileno aos 5 dias (Figura 2B) em presença das diferentes doses de sal, as quais ficaram em torno de  $309,32$  a  $1039,30 \mu\text{L C}_2\text{H}_4 \text{ ml}^{-1} \text{ g}^{-1}$  de matéria fresca em 24 horas.

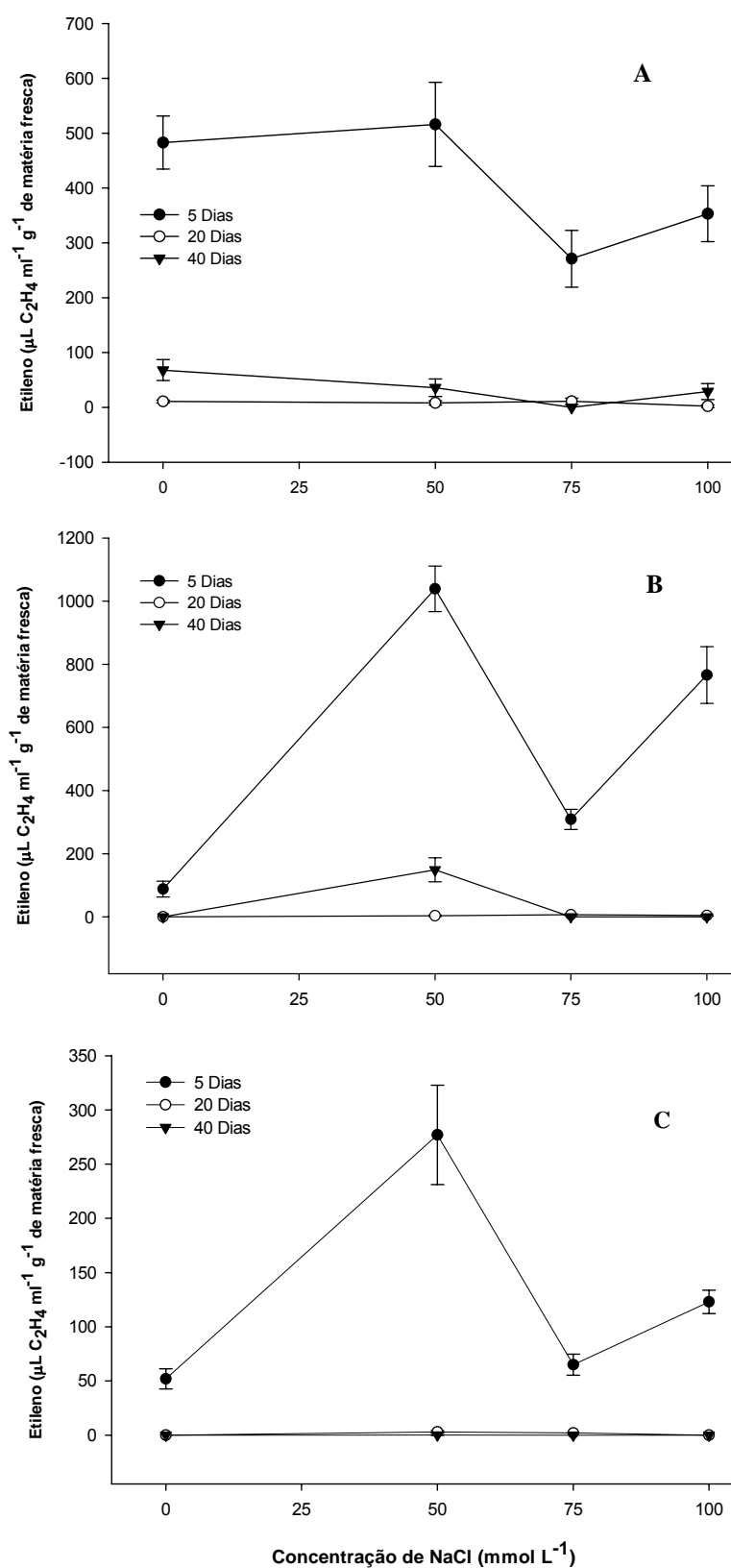


Figura 2: Etileno acumulado em 24 horas em raízes tuberosas de mandioca sob estresse salino em diferentes períodos de cultivo. A - 'Parazinha'; B - 'Vassourinha'; C - 'Mantiqueira'.



Figura 3: Plantas de mandioca cv. Vassourinha. A - Controle; B - 20 dias; C - 40 dias, B e C conduzidas em meio MS com 100 mmol L<sup>-1</sup> de NaCl.

O estresse salino induziu o aumento da atividade das enzimas POD e CAT (Figura 4 e 5; Tabela 1), tanto em raízes tuberiformes, como na parte aérea de plantas de mandioca. Dentre as enzimas analisadas, maiores atividades da POD foram registradas nas raízes tuberiformes *in vitro* do que na parte aérea das plantas, havendo diferença significativa; no entanto na CAT as maiores atividades foram obtidas na parte aérea, todavia, sem diferir da raiz (Figuras 4A e 4B). A salinidade gera um estresse oxidativo nos tecidos das plantas aumentando o nível de ROS, como os radicais superóxido ( $O_2^-$ ), hidroxila ( $\cdot OH$ ) e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) que são constantemente produzidos. Estes, por sua vez, são suprimidos para níveis por pequenas moléculas antioxidantes e enzimas, como CAT e POD, que são enzimas envolvidas na detoxificação dos ROS (Radíc et al., 2006).

Nas três cultivares de mandioca foi observado que a atividade da CAT foi estimulada pela presença de NaCl (Tabela 1), evidenciando que o NaCl afeta o metabolismo da planta e, conseqüentemente, estimula atividade de enzimas que atuam em resposta ao estresse salino (Kuznetsov et al., 2007), no entanto, o grau de resposta varia conforme a cultivar e o meio em que as plantas se encontram (Silva et al., 2001).

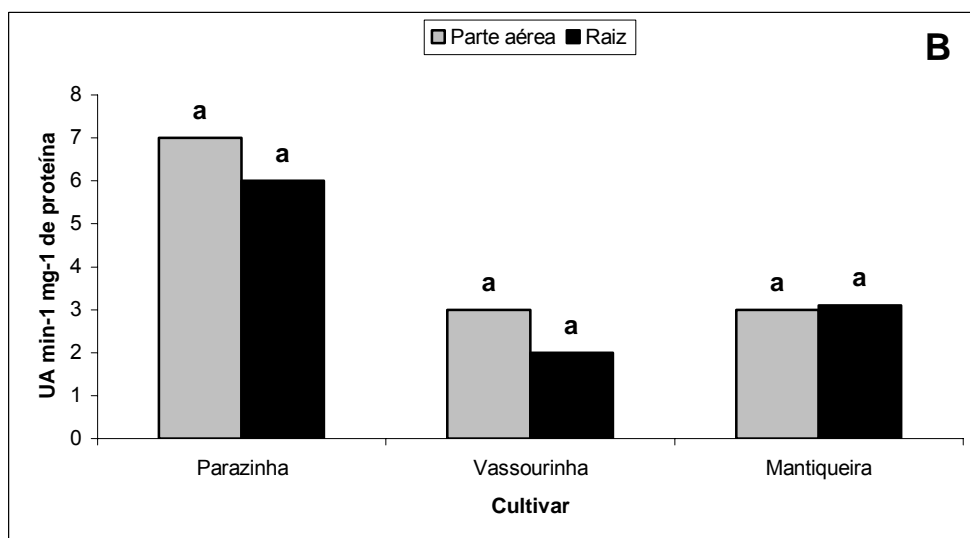
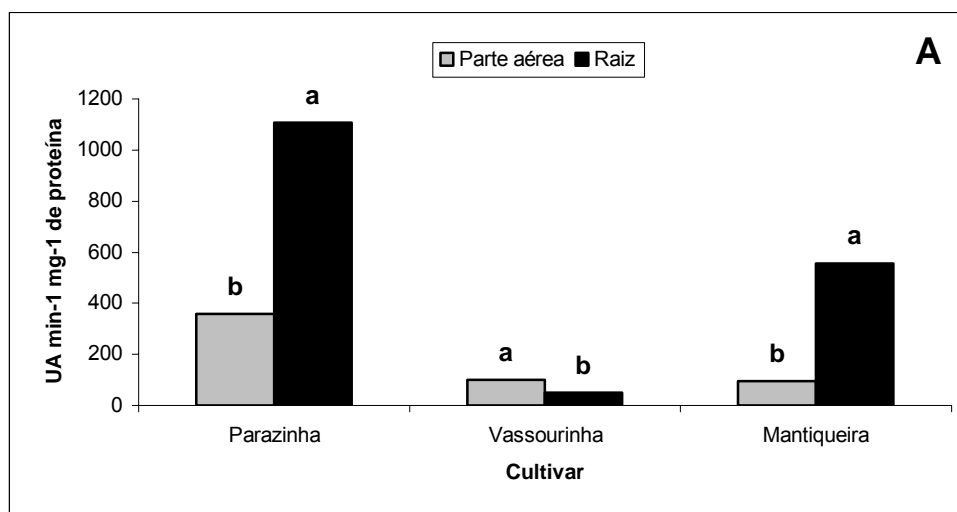


Figura 4: Comportamento das enzimas POD (A) e CAT (B) nas raízes e parte aérea de cultivares de mandioca cultivadas *in vitro* por um período de 40 dias, sob 50 mmol L<sup>-1</sup> de NaCl. Médias com letras iguais, para cada dia de avaliação, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Tabela 1: Atividade da catalase (UA min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de proteína) em cultivares de mandioca com tratamentos na presença ou ausência de NaCl

TRATAMENTOS	Parazinha	Vassourinha	Mantiqueira
1	3,18 b	1,08 b	3,87 b
2	6,11 a	3,30 b	3,07 b
3	6,82 a	34,52 a	5,90 a
4	1,35 b	32,07 a	4,56 ab

Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Em 'Parazinha' a POD apresentou maior atividade em tratamentos com menor dose de NaCl, demonstrando maior sensibilidade desta cultivar quando submetidas a condição de estresse salino (Figura 5). Resultados semelhantes obtidos por Lima et al. (1998), também com mandioca cv. Mcol 22, relatam que plântulas cultivadas no meio contendo 150 mM do sal, apresentaram atividade inferior em relação ao tratamento sem NaCl.

A alta atividade da enzima em plantas submetidas a estresse, pode indicar a habilidade de certos genótipos em degradar substâncias tóxicas, como radicais livres (peróxidos) liberados nestas condições. A variação na atividade da POD pode ser uma adaptação útil do vegetal sob efeito da salinidade, podendo este apresentar efeitos fisiológicos, como diminuição do crescimento (Lima et al.,1998). No entanto, a PPO não apresentou diferença significativa nesta característica, indicando que nesta espécie a enzima não participa do processo de dano causado por estresse salino (dados não mostrados). Deste modo, foi observado redução nas plantas mantidas em níveis de NaCl, como também verificado em variedades tolerantes de arroz Mittal & Dubey (1991) e feijoeiro por Rossi et al (1997).

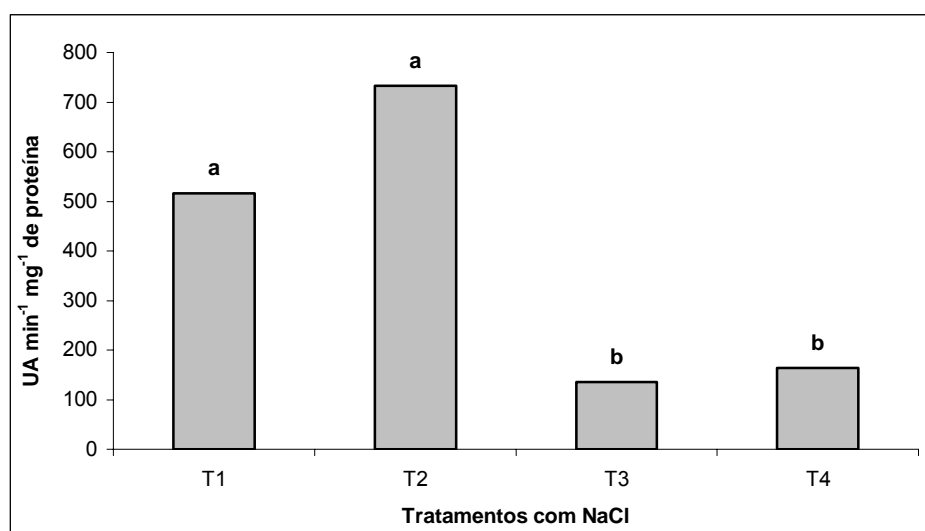


Figura 5: Atividade da peroxidase na cultivar Parazinha sob ação dos tratamentos: 0,4  $\mu\text{M}$  BAP, 1,6  $\mu\text{M}$  ANA e 8% sacarose + 0  $\text{mmol L}^{-1}$  NaCl (T1); 50  $\text{mmol L}^{-1}$  NaCl (T2); 75  $\text{mmol L}^{-1}$  NaCl (T3) e 100  $\text{mmol L}^{-1}$  NaCl (T4). Médias com letras iguais, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

### Experimento 3:

Neste experimento utilizou-se apenas a cultivar Parazinha em meio líquido, em razão dessa cultivar apresentar melhores respostas ao processo de formação de raízes tuberosas. Constatou-se que novamente a maior concentração de etileno foi no tempo inicial, aos 5 dias (Figura 6). À medida que a dose de NaCl aumentou, verificou-se o aumento na concentração de etileno, ocorrendo uma relação direta do sal com a emissão do gás. Este aumento da produção de etileno das plantas submetidas a estresse salino aos cinco dias, pode estar relacionado às alteradas condições ambientais *in vitro*, as quais afetam o metabolismo das plantas sob estas condições, favorecendo a produção de etileno. Resultado semelhante foi obtido com jojoba (Roussos et al., 2006) e *Mesembryanthemum crystallinum in vitro*, onde plantas crescidas sob alta concentração salina apresentaram alta produção de etileno (Kuznetsov et al., 2007). Verificou-se, ainda, que o tratamento T1 (controle) apresentou menor acúmulo de etileno quando comparado com o tratamento T4, havendo diferença significativa entre o T1 e T4, o qual é constituído de 100  $\text{mmol L}^{-1}$  de NaCl (Figura 6), indicando que

maiores doses do sal interferem no desenvolvimento da planta, visto que este tratamento apresentou maior síntese de etileno. Ao mesmo tempo, foi possível observar, por meio de determinações visuais que o crescimento da planta foi afetado, mostrando alterações nas folhas como enrugamento e clorose (Figuras 7A, 7B e 7C).

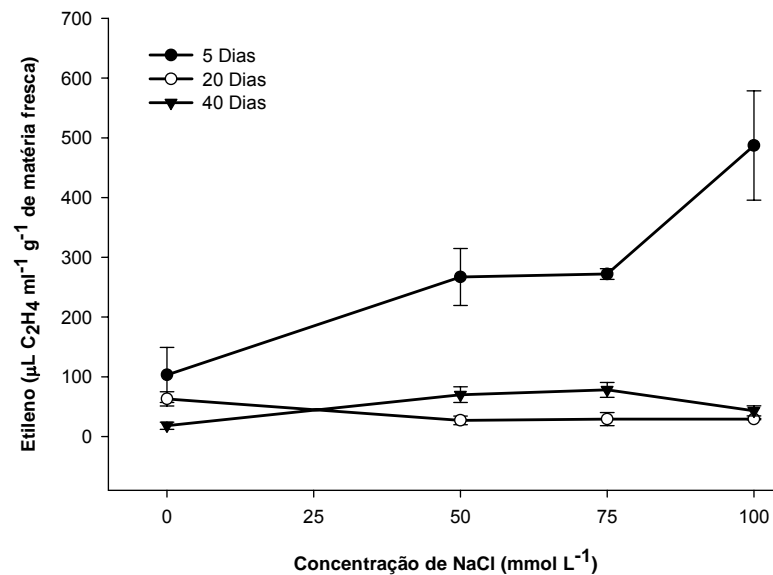


Figura 6: Acúmulo de etileno durante 24 horas nas concentrações de NaCl em raízes tuberiformes da cultivar Parazinha aos 5, 20 e 40 dias de cultivo.

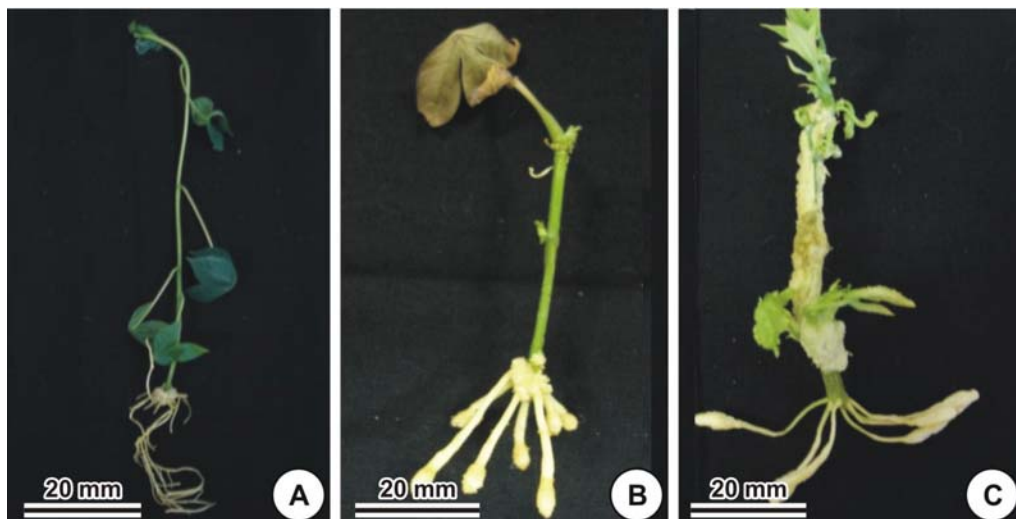


Figura 7: Danos causados pela presença de NaCl em culturas *in vitro* de mandioca, submetidas a níveis de salinidade. A - controle; B - Clorose com 50  $\text{mmol L}^{-1}$  de NaCl; C - enrugamento observado no tratamento com 100  $\text{mmol L}^{-1}$  de NaCl.

Estes resultados são semelhantes aos verificados por Lima et al. (1998), os quais também observaram redução no crescimento em mandiocas cultivadas *in vitro* sob estresse salino. Além disso, os danos nas plântulas, também podem ser em consequência da redução do potencial osmótico devido ao aumento dos níveis de sal nas células em ambos, parte aérea e raízes tuberiformes (Silva et al., 2001).

Com relação às enzimas estudadas foi observado que a CAT, novamente, apresentou elevada atividade no tratamento com baixa dose de NaCl (2,30 UA min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de proteína em T2), e menor atividade nos tratamentos com doses superiores (1,4 UA min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de proteína no T4). Isto pelo fato de que a concentração de 50 mmol L<sup>-1</sup> de NaCl, provavelmente, já seja suficiente para ativar a enzima, em decorrência da sensibilidade da cultivar Parazinha ao NaCl.

### 3.2. Estresse por Baixa Temperatura

#### **Experimento 1:**

Foram analisados microrizomas de taro Chinês e Japonês, acondicionados em diferentes temperaturas 5°, 10° e 25°C. A mensuração de etileno ocorreu no terceiro e sétimo dia de condicionamento. No terceiro dia de acondicionamento térmico, verificou-se maiores concentrações de etileno acumulado a 25°C, não sendo detectado etileno nas demais temperaturas. Do mesmo modo, no sétimo dia de exposição observou-se a temperatura de 25°C as maiores concentrações de etileno (Figura 8A e 8B). Possivelmente, o tempo de acondicionamento tenha sido insuficiente para mensurar acúmulo de etileno, sob baixas temperaturas para as cultivares de taro Chinês e Japonês.

Resultado semelhante obtido por Woolf et al. (2003) com abacate, onde foi observado pouca ou nenhuma mudança na produção de etileno sob baixas temperaturas (4° ou 6°C) pelo período de dez dias. Estudo de armazenamento de rabanete em condições de baixa temperatura, verificou

baixa produção de etileno a 5°C, aumentando a produção com o aumento da temperatura (Aguila et al., 2006).

Estes dados comprovam que o tempo de três dias de exposição ao frio não foi suficiente para induzir a produção de etileno. Entretanto, a produção observada a 25°C está relacionada à alta temperatura que também favorece a produção de etileno e acelera a senescência dos tecidos (Fan & Mattheis, 2000).

Quanto à resposta das cultivares pode-se inferir que 'Japonês' foi mais tolerante à condição de estresse por baixa temperatura (5°C) do que 'Chinês', visto ela apresentou concentrações menores (3,57  $\mu\text{L C}_2\text{H}_4 \text{ ml}^{-1} \text{ g}^{-1}$  de matéria fresca em 24 horas) que a Chinês (16,85  $\mu\text{L C}_2\text{H}_4 \text{ ml}^{-1} \text{ g}^{-1}$  de matéria fresca em 24 horas) de etileno durante sete dias de acúmulo. Esses resultados evidenciam a capacidade de resposta das cultivares de taro a condição de estresse por baixa temperatura.

Estudos realizados com *Solanum tuberosum* e *Brassica rapa* mostraram inerente e específica aclimação ao frio, que estão sob controle genético específico (Jacobsen et al., 2005). Além disso, pode-se ressaltar que as plantas variam muito sua habilidade de superação de restrições impostas pelos ambientes. O nível de diversidade com que uma planta pode resistir varia com a espécie, o que indica estreita relação com os mecanismos genéticos de tolerância e o processo de seleção natural (Silva, 1999).

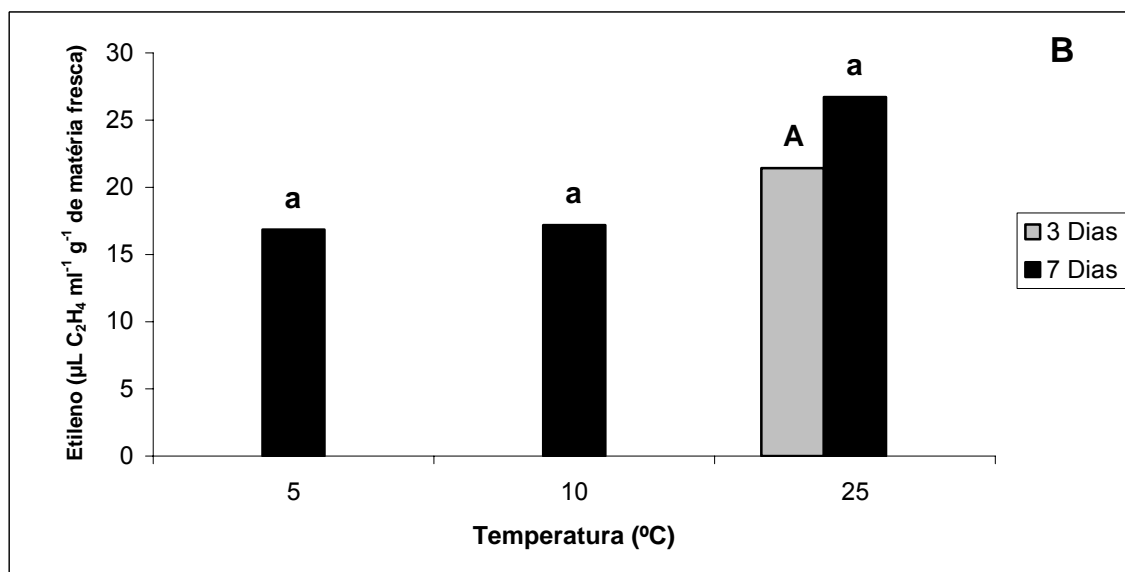
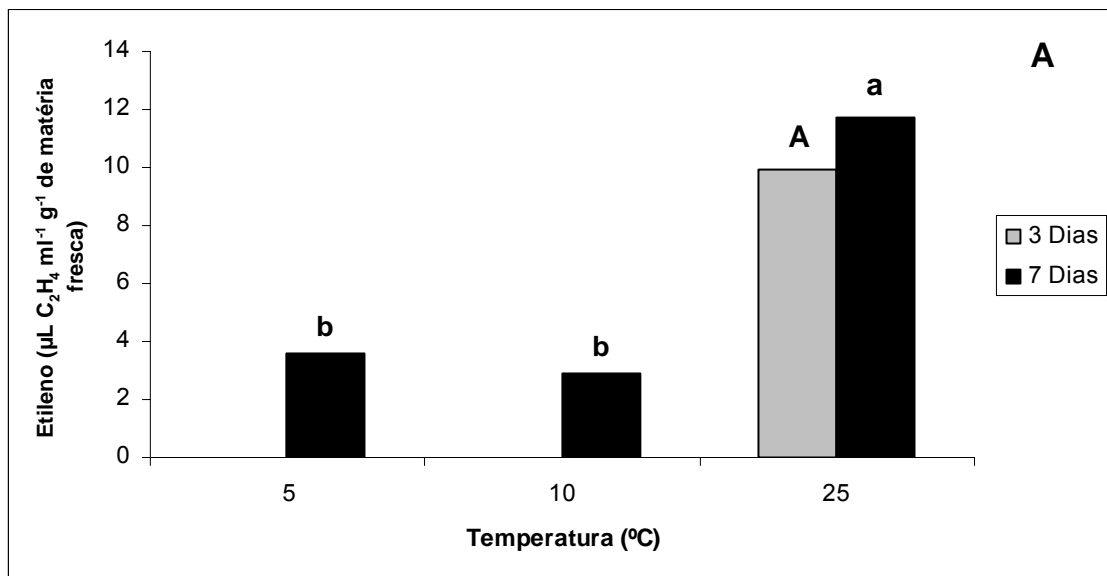


Figura 8: Acúmulo de etileno em diferentes temperaturas de 5, 10 e 25 $^{\circ}\text{C}$  aos três e sete dias de acondicionamento de microrizomas de taro. A - Japonês; B - Chinês. Médias com letras iguais, para cada dia de avaliação, não diferem estatisticamente pelo teste de Dunnett, a 5% de probabilidade.

O armazenamento sob baixas temperaturas, geralmente, causa indução de várias enzimas, como a POD, PPO e CAT. Nesse experimento, em taro armazenados sob baixas temperaturas (5° e 10°C) foi possível constatar maior atividade da POD que a temperatura de 25°C (Tabela 2). Isto porque a peroxidase é considerada uma enzima de estresse estimulada por baixas temperaturas, em espécies sensíveis ao frio (Kuk et al., 2003). Nessas condições, há aumento desordenado na taxa respiratória causando formação de espécies reativas de oxigênio (ROS); a enzima aumenta atividade para reduzir os danos causados pelos ROS, removendo átomos de hidrogênio dos grupos álcoois, combinando-os com peróxidos de hidrogênio para formar moléculas de água protegendo assim os tecidos (Menolli, 2006).

Tabela 2: Atividade da POD (UA min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de proteína) em três temperaturas durante sete dias de armazenamento *in vitro* de dois cultivares de taro.

Temperatura (°C)	JAPONÊS	CHINÊS
5	37,1 ab	87,92 a
10	41,67 a	46,9 ab
25	14,6 b	17,36 b

Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

A PPO é uma enzima que tem sua atividade aumentada a injúria “chilling” que pode ser ocasionado por baixas temperaturas (Marri et al., 2003). Avaliando-se as temperaturas (5°, 10° e 25°C) pode-se observar que a atividade máxima da polifenoloxidase foi a 5°C, tanto em ‘Chinês’ como em ‘Japonês’ (Tabela 3), dados que corroboram com Menolli (2006), em raízes de batata-baroa armazenadas a 5°C e a 10°C, ocorrendo o aumento da atividade da PPO, nos primeiros sete dias de armazenamento.

Tabela 3: Atividade da PPO (UA min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de proteína) sob diferentes temperaturas durante sete dias de armazenamento *in vitro* de cultivares de taro.

Temperatura (°C)	JAPONÊS	CHINÊS
5	48,27 a	27,14 a
10	7,26 b	4,30 b
25	4,0 b	7,47 b

Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Temperaturas que causam “chilling” também podem induzir estresse oxidativo em tecidos vegetais. Por isso, a atividade da enzima CAT vem sendo associada ao desenvolvimento dos sintomas de “chilling” (Willekens et al., 1995). No entanto, verificou-se que não houve diferença significativa na atividade da CAT nos diferentes experimentos realizados para a enzima, apresentando atividade máxima de 1,14 UA min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de proteína a 10°C em taro ‘Chinês’.

Os géis relativos aos sistemas isoenzimáticos POD e PPO em taro são mostrados nas Figuras 9A e 9B. A migração das bandas ocorreu no sentido do pólo positivo, apesar de se tratar de propagação clonal, os sistemas apresentaram variação de presença ou mesmo de intensidade das bandas obtidas.

Foi possível observar na Figura 9, a presença de bandas difusas, mas que permitem identificar diferentes isoenzimas, pois mostraram similar tendência entre as cultivares. Desta forma, observaram-se duas isoenzimas nos rizomas para POD e PPO. No entanto, na parte aérea constatou-se apenas uma isoenzima para POD e duas para PPO. Algumas reações de resposta ao estresse ocorrem nos dois genótipos, como a produção de ROS, por exemplo, que causam dano na integridade da membrana, comum efeito do estresse por baixa temperatura, ativando assim enzimas como a POD (Morsy et al., 2007). Da mesma forma, Marri et al. (2003) relatou o aumento da atividade da enzima durante o armazenamento de tubérculos de batata em baixa temperatura o que favorece a transcrição de isoformas da PPO.

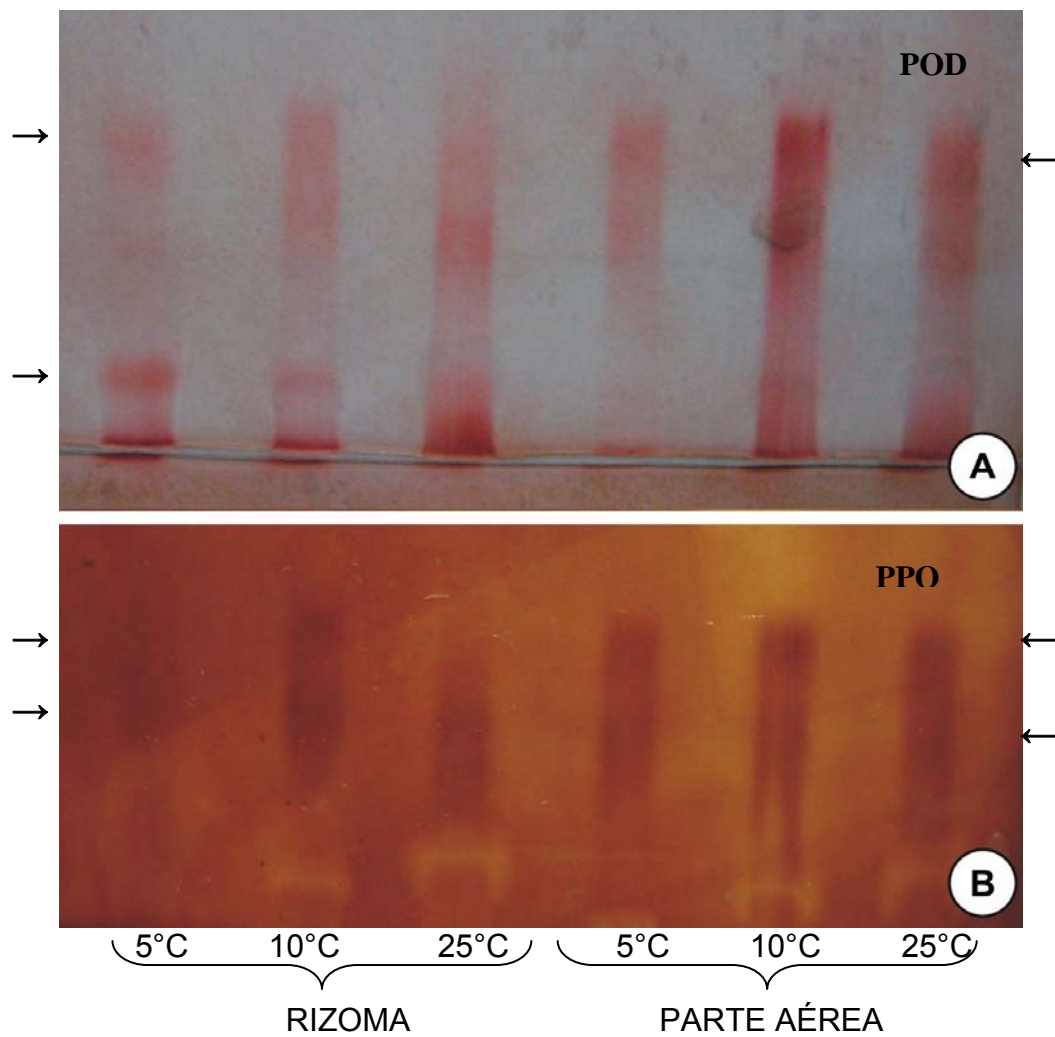


Figura 9: Análise isoenzimática pelo sistema da peroxidase (POD) (A) e polifenoloxidase (PPO) (B) de rizoma e parte aérea de taro cv. Chinês, submetidas às temperaturas de 5, 10 e 25°C.

## **Experimento 2:**

Neste ensaio analisou-se a resposta das cultivares de mandioca Parazinha, Vassourinha e Mantiqueira sob temperaturas de 5°, 10° e 25°C em resposta ao acúmulo de etileno, em dois períodos (3 e 7 dias). Foi possível observar acúmulo de etileno durante o crescimento *in vitro*, onde as cultivares apresentaram maiores concentrações de etileno (25 a 100  $\mu\text{L C}_2\text{H}_4 \text{ ml}^{-1} \text{ g}^{-1}$  de matéria fresca em 24 horas) sob baixa temperatura (5° e 10°C), quando comparado com os tratamentos controle (25°C), independente da cultivar (Figuras 10A, 10B e 10C).

No entanto, com três dias de acúmulo observou-se que 'Parazinha' apresentou maiores concentrações de etileno (Figura 10A), ocorrendo diferença significativa dos tratamentos de baixa temperatura com o controle. Contudo, em 'Vassourinha' verificou-se maiores concentrações de etileno com sete dias de acúmulo a temperatura de 5° e 10°C e 'Mantiqueira' a 10°C. Essa resposta diferenciada pode ser devido às diferenças genotípicas. Estudos realizados com genótipos de batata propõem que relativamente poucos, mas, independentes genes são responsáveis pelo desempenho das plantas a baixas temperaturas (Seppänen et al., 1998).

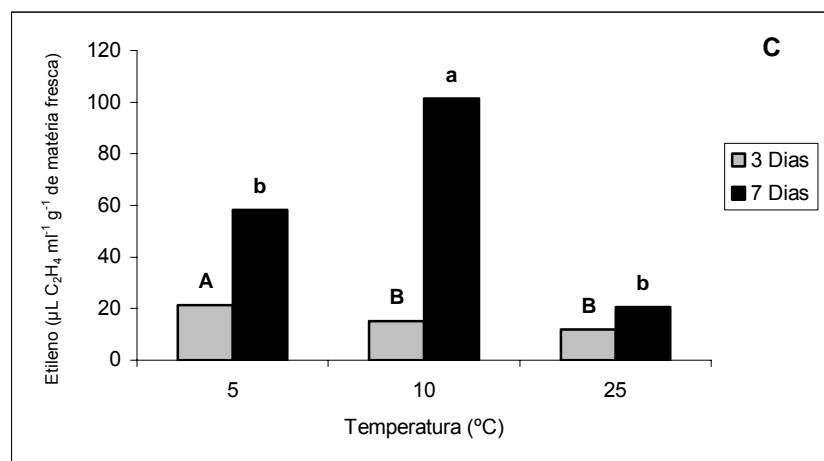
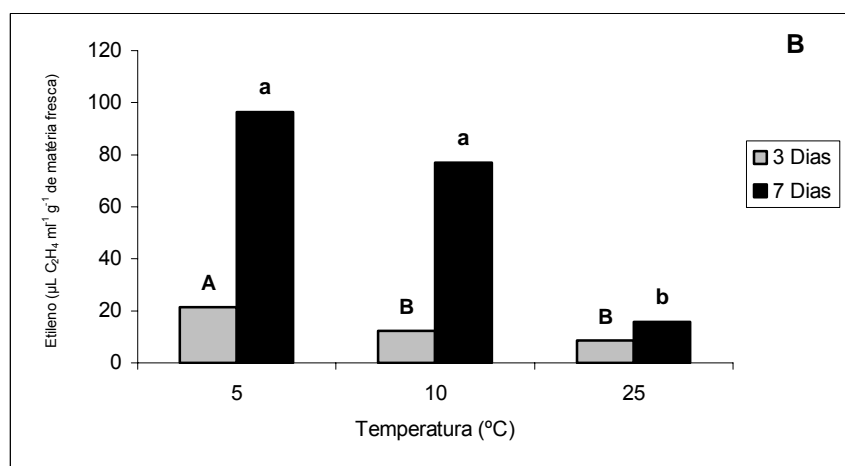
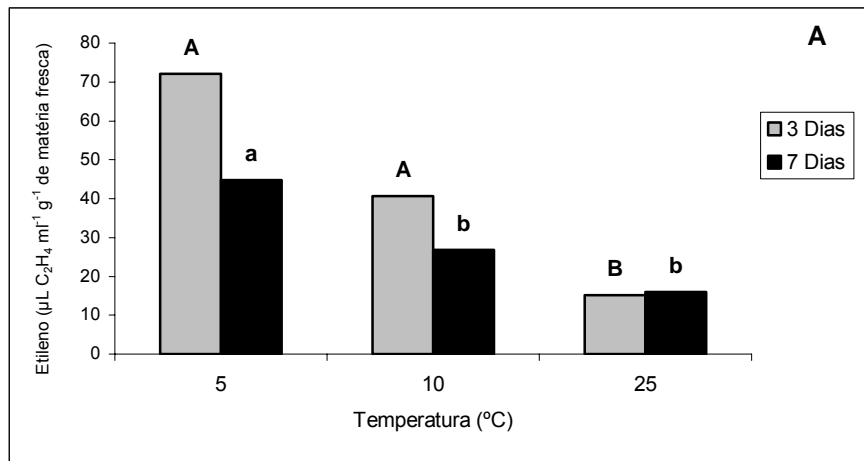


Figura 10: Acúmulo de etileno sob temperaturas de 5°, 10° e 25°C em cultivares de mandioca cultivadas *in vitro*. **A** - Parazinha; **B** - Vassourinha; **C** - Mantiqueira. Médias com letras iguais, para cada dia de avaliação, não diferem estatisticamente do controle (25°C) pelo teste de Dunnett, a 5% de probabilidade.

Foi observado também a ocorrência de injúrias nas plantas (Figura 11B e C), evidenciando indícios de danos ocasionados pelas baixas temperaturas. Estudos realizados com plantas ornamentais de clima tropical sob baixa temperatura ocasionaram desordens morfológicas, porém não apresentou diferença significativa na produção de etileno; este resultado sugere que diferentes mecanismos de injúria operam em diferentes espécies Friedman & Rot (2006). Além disso, tem sido observado em várias espécies de plantas que a aclimação ao frio ou temperaturas de injúria envolve mudanças bioquímicas e fisiológicas que são controladas por alterações na expressão gênica (Seppänen et al., 1998).



Figura 11: Aspecto das plantas de mandioca cv. Mantiqueira, evidenciando danos ocasionados sob baixa temperatura. **A** - controle 25°C; **B** - 10°C; **C** - 5°C, por um período de 7 dias.

Analisando-se os efeitos das temperaturas nas raízes tuberiformes, bem como, na parte aérea das plantas foi verificado que a atividade da POD foi maior nas raízes (Figura 12). Situação oposta ocorreu na CAT, onde atividades mais elevadas foram detectadas na parte aérea (Figura 13); isto se deve, possivelmente, à modificação do padrão das enzimas em relação aos estádios fisiológicos em que a planta se encontra. Em trabalho com bulbificação *in vitro* de alho houve diferenças na atividade de PODs conforme o grau de desenvolvimento da planta, uma vez que as mudanças morfogênicas como divisão, crescimento e diferenciação celular são, usualmente, associados com as variações na atividade das PODs (Goleniowski et al., 2001). Por outro lado, há isoformas de CAT que são normalmente expressas em órgãos e plantas maduras, sujeitas a certas injúrias que estão envolvidas na ação destas enzimas (Willekens et al., 1995). Entretanto, a PPO não apresentou diferença significativa entre raiz e parte aérea de plantas submetidas a diferentes temperaturas.

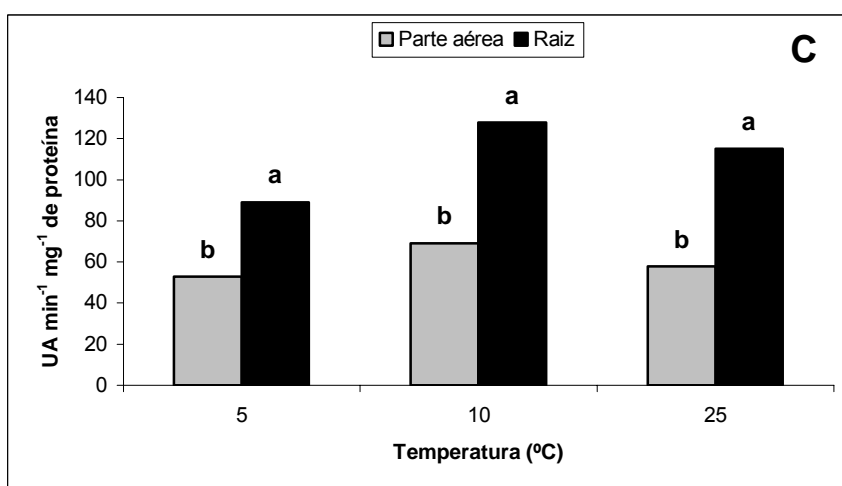
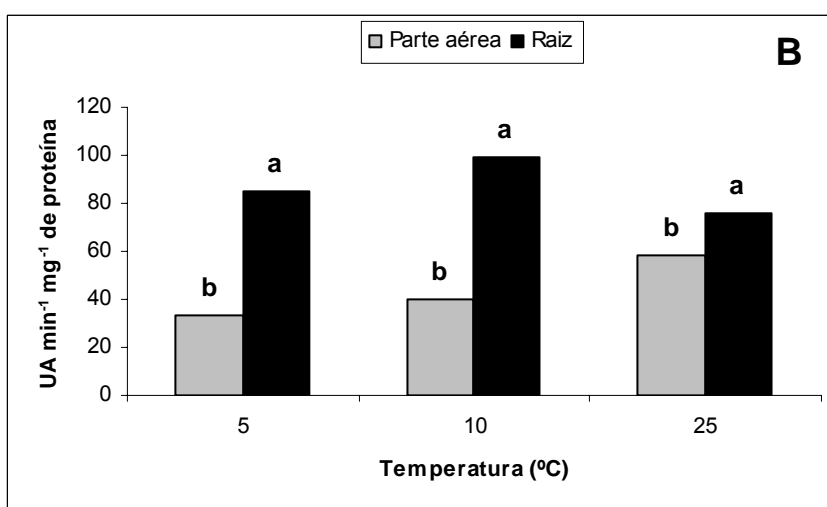
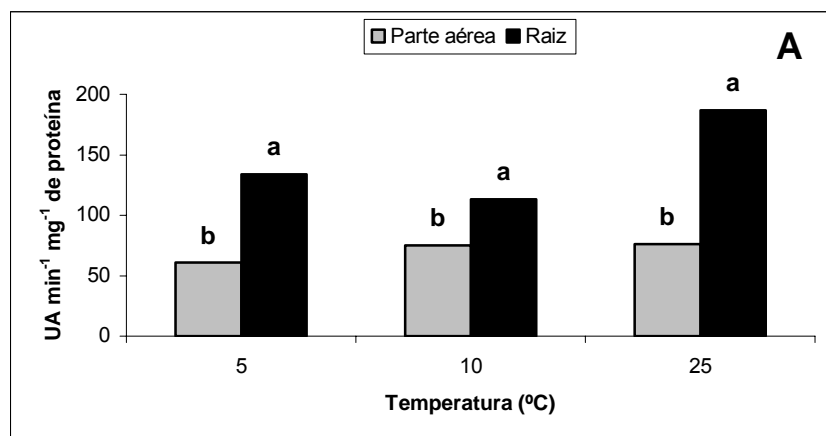


Figura 12: Comportamento da POD nas raízes e parte aérea de cultivares de mandioca cultivadas *in vitro*. A - Parazinha; B - Vassourinha; C - Mantiqueira. Médias com letras iguais, não diferem estatisticamente do controle (25°C) pelo teste de Dunnett, a 5% de probabilidade.

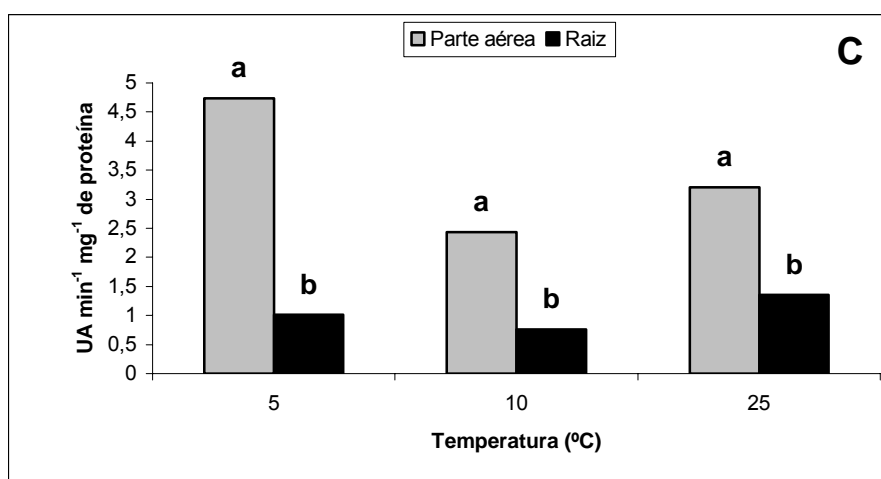
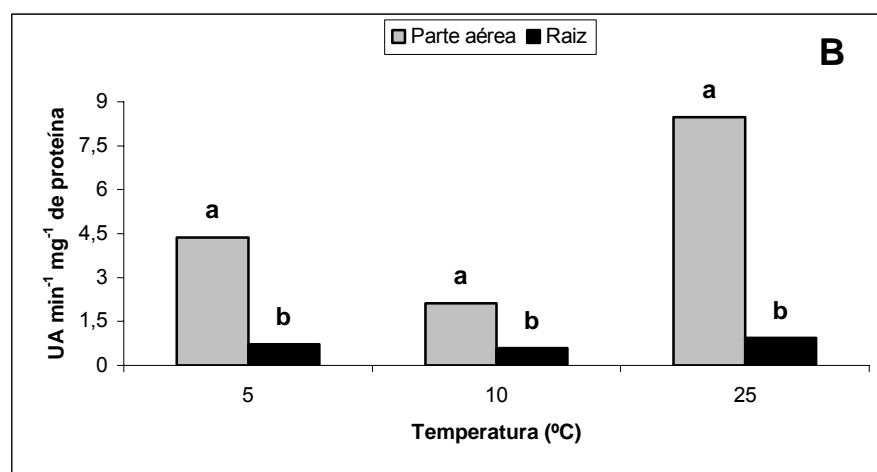
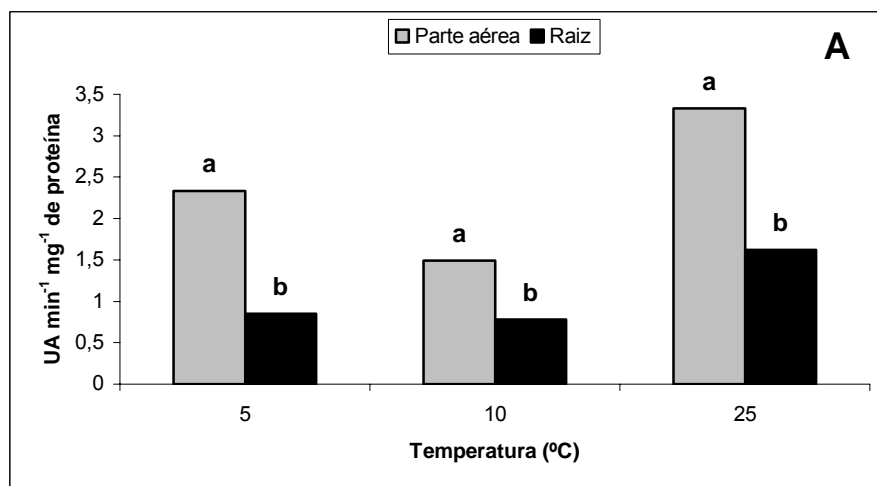


Figura 13: Comportamento da CAT nas raízes e parte aérea de cultivares de mandioca cultivadas *in vitro*. A - Parazinha; B - Vassourinha; C - Mantiqueira. Médias com letras iguais, não diferem estatisticamente do controle (25°C) pelo teste de Dunnett, a 5% de probabilidade.

Nas diferentes temperaturas, a enzima PPO não apresentou diferença significativa entre os tratamentos testados. Já, para POD observou-se que as temperaturas mais elevadas contribuíram para maiores atividades da enzima (Tabela 4). Provavelmente, isto decorre de sua alta termoestabilidade, quando comparada com as outras enzimas, atribuída à presença de açúcares em sua estrutura (Neves, 2003).

Tabela 4: Atividade da POD ( $\text{UA min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  de proteína) sob três temperaturas durante sete dias de armazenamento *in vitro* de cultivares de mandioca.

Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )	Parazinha	Vassourinha	Mantiqueira
5	97,5 b	59,02 b	70,84 b
10	93,62 b	69,84 ab	98,3 a
25	131,47 a	75,95 a	86,53 ab

Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Foi constatado na CAT, principalmente, em ‘Parazinha’ e ‘Vassourinha’, que as atividades máximas foram obtidas a  $25^{\circ}\text{C}$ , com valores de 3,33 e  $8,48 \text{ UA min}^{-1}\text{mg}^{-1}$  de proteína em ‘Parazinha’ e ‘Vassourinha’, respectivamente, semelhante ao ocorrido para a POD. Anderson (2002), relatou que a estabilidade da CAT a elevadas temperaturas em folhas de pimentas aclimatadas, pode estar relacionada à alta estabilidade de suas diversas isoenzimas.

Os géis relativos aos sistemas isoenzimáticos POD e PPO em mandioca são mostrados nas Figuras 14A e 14B. A migração das bandas ocorreu no sentido do pólo positivo e, apesar de se tratar de propagação clonal, os sistemas apresentaram variação de presença ou mesmo de intensidade das bandas obtidas. Ambas as atividades da PPO e POD (Figura 14), em extratos de raiz e parte aérea, mostraram similar tendência nas diferentes cultivares.

Notadamente, POD e PPO (Figura 14), apresentaram marcante variação no comprimento e na intensidade de coloração das bandas formadas após migração, nos tipos de explantes utilizados, uma vez que a atividade das enzimas foi maior nas raízes do que na parte aérea, como

também a presença diferenciada de isoenzimas nas raízes, duas isoenzimas para POD, e uma isoenzima para a PPO (Figura 14). A maior intensidade de bandas do sistema enzimático POD nos diferentes extratos comprova o dano oxidativo, provocado pelo aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (Barbosa, 2006), que possivelmente foram induzidos por meio de baixas temperaturas, principalmente a 5°C. Resultados semelhantes também foram obtidos com a PPO apresentando diferentes isoformas, dados que corroboram com Marri et al (2003), que relatam o aumento da atividade da enzima durante o armazenamento de tubérculos de batata é concomitante a transcrição de diferentes isoformas da PPO.

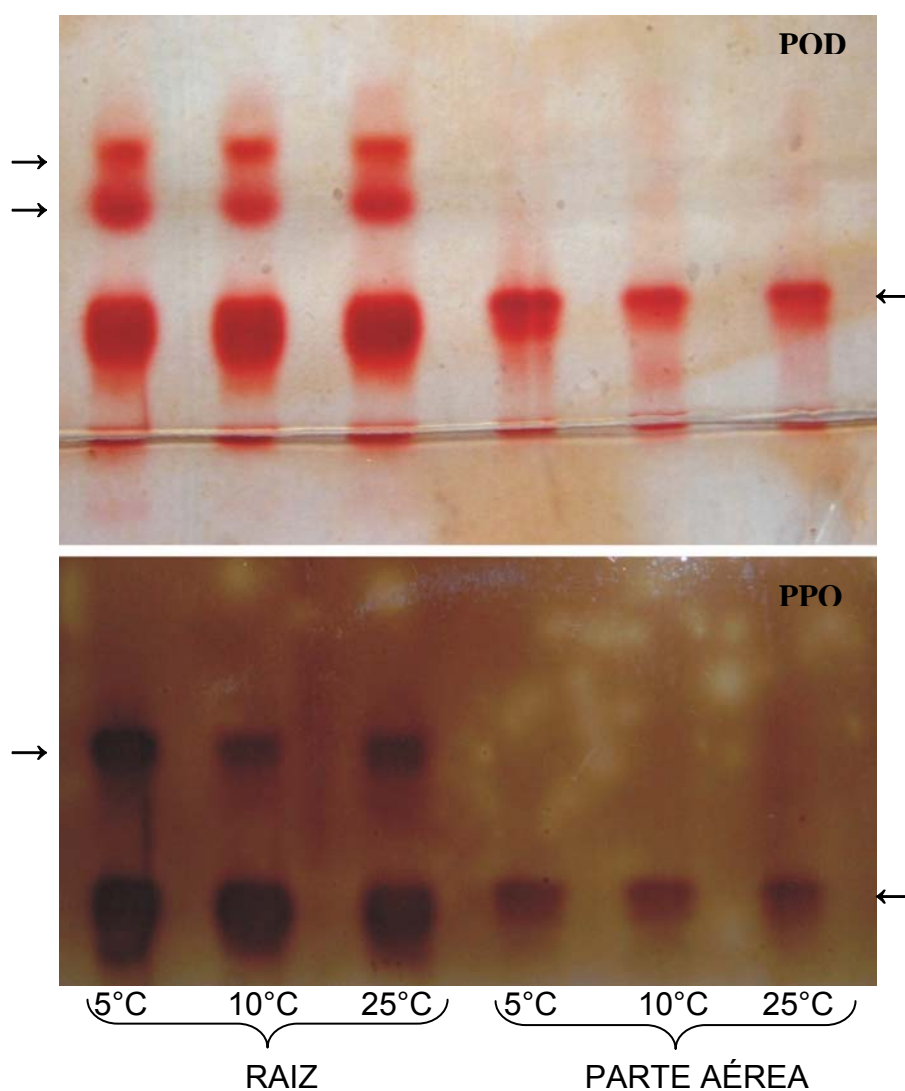


Figura 14: Análise isoenzimática da peroxidase (POD) e polifenoloxidase (PPO), de raiz e parte aérea de mandioca cv. Parazinha, submetidas a temperaturas de 5°, 10° e 25°C. Nas setas, as principais diferenças entre raiz e parte aérea.

#### **4. CONCLUSÕES**

- A adição de NaCl no meio de cultivo induz ao estresse oxidativo, caracterizado pelo aumento da atividade de enzimas antioxidantes POD e CAT, e altas concentrações de produção de etileno;
- Há diferença de tolerância aos estresses térmico e salino entre as cultivares de mandioca e taro;
- A presença de NaCl em meio líquido proporciona a produção de altas concentrações de etileno e aumento da atividade da catalase em mandioca;
- A baixa temperatura ocasiona aumento da atividade de enzimas antioxidantes POD e CAT e aumento da produção de etileno em cultivares de mandioca;
- Em taro há estresse oxidativo caracterizado pelo aumento da atividade de enzimas antioxidantes POD e PPO a 5°C;
- Há diferença na atividade das enzimas POD e CAT entre parte aérea e raiz da planta de mandioca;
- Em taro, há a presença de duas isoenzimas para POD e PPO nos microrizomas, já na parte aérea existe uma para POD e duas para PPO;
- Em mandioca, verifica-se a presença de duas isoenzimas para POD e uma para PPO em suas raízes tuberiformes.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADACHI, M., TSUZUKI, E., SHIMOKAWA, K. Effect of ethylene on degreening of intact radish (*Raphanus sativus* L.) cotyledons. **Scientia Horticulturae**, 65: 1-9, 1996.

AGUILA, J.S.D., SASAKI, F.F., HEIFFIG, L.S., ORTEGA, E.M.M., JACOMINO, A.P., KLUGE, R.A. Fresh-radish using different cut types and storage temperatures. **Postharvest Biology and Technology**, 40: 149-154, 2006.

ANDERSON, J.A. Catalase activity, hydrogen peroxide content and thermotolerance of pepper leaves. **Scientia Horticulturae**, 95: 277-284, 2002.

ARIMURA, C. T. **Propagação *in vitro* de gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) por meio de segmentos nodais estiolados**. Viçosa: UFV, 1997. 62p. (Dissertação - Mestrado em Agronomia, Universidade Federal de Viçosa, MG).

BAJJI, M, KINET, J-M., LUTTS, S. Salt stress effects on roots and leaves of *Atriplex halimus* L. and their corresponding callus cultures. **Plant Science**, 137: 131-142, 1998.

BARBOSA, L.M.P. **Caracterização anatômica e bioquímica da hiperidricidade em morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duch.) e videira (*Vitis vinifera x Vitis rotundifolia*) propagados *in vitro***. Viçosa, 2006, 129p. (Tese – Mestrado em Fisiologia Vegetal, Universidade Federal de Viçosa, MG).

BOHN, M., LÜTHJE, S., SPERLING, P., HEINZ, E., DÖRFFLING, K. Plasma membrane lipid alterations induced by cold acclimation and abscisic acid treatment of winter wheat seedlings differing in frost resistance. **Journal of Plant Physiology**, 164 (2): 146-156, 2007.

BORSOI FILHO, J. L. **Variabilidade isozimática e divergência genética em seis cultivares de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz)**. Viçosa: UFV, 1995. 52p. (Dissertação - Mestrado em Agronomia, Universidade Federal de Viçosa, MG).

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method of the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytic Biochemistry**, 72: 248-254, 1976.

CHAN, Z. & TIAN, S. Induction of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-metabolizing enzymes and total protein synthesis by antagonistic yeast and salicylic acid in harvested sweet cherry fruit. **Postharvest Biology and Technology**, 39: 314-320, 2006.

CHEN, D.M., KEIPER, F.J., FILIPPIS, L.F.D. Physiological changes accompanying the induction of salt tolerance in *Eucalyptus microcorys* shoots in tissue culture. **Journal of Plant Physiology**, 152: 555-563, 1998.

CONKLE, M. T., HODGSKISS, P. D., NUNNALLY, L. B. **Starch gel eletroforesis conifer seeds: a laboratory manual**. Berkeley, USDA: Forest Service, 18p, 1982.

DAMATTA, F.M. & RAMALHO, J.D.C. Impacts of drought and temperature stress on coffee physiology and production: a review. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, 18 (1): 55-81, 2006.

EUCLYDES, R.F. **Sistema de Análises Estatísticas e Genéticas da UFV (SAEG)**. CPD/UFV, Divisão de Pesquisas e Desenvolvimento. Viçosa, Minas Gerais. 74p. 1983.

EVERS, D., SCHMIT, C., MAILLIET, Y., HAUSMAN, J.F. Growth characteristics and biochemical changes of poplar shoots *in vitro* under sodium chloride stress. **Journal of Plant Physiology**, 151: 748-753, 1997.

FAN, X. MATTHEIS, J.P. Reduction of ethylene-induced physiological disorders of carrots and iceberg lettuce by 1-methylcyclopropene. **HortScience**, 35(7): 1312-1314, 2000.

FRIEDMAN, H. & ROT, I. Characterization of chilling injury in *Heliotropium arborescens* and *Lantana camara* cuttings. **Postharvest Biology and Technology**, 40: 244-249, 2006.

GOLENIOWSKI, M., DEL LONGO, O., FORCHETTI DE, S.M., ARGÜELLO, J.A. Relationships between peroxidases and *in vitro* bulbification in garlic (*Allium sativum* L.). **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, 37: 683-686, 2001.

JACBOSEN, S.E., MONTEROS, C., CHRISTIANSEN, J.L., BRAVO, L.A., CORCUERA, L.J., MUJICA, A. Plant responses of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) to frost at various phenological stages. **European Journal of Agronomy**, 22: 131-139, 2005.

KASAI, Y., KATO, M., HYODO, H. Ethylene biosynthesis and its involvement in senescence of Broccoli florets. **Journal of the Japanese Society for Horticultural Science**, 65 (1): 185-191, 1996.

KEREPESI, I., BANYAI-STEFANOVITS, E., GALIBA, G. Cold acclimation and abscisic acid induced alterations in carbohydrate content in calli of wheat genotypes differing in frost tolerance. **Journal of Plant Physiology**, 161: 131-133, 2004.

KUK, Y.I., HIN, J.S., BURGOS, N.R., HWANG, T.E., HAN, O., CHO, B.H., JUNG, S., GUH, J.O. Antioxidative enzymes offer protection from chilling damage in rice plants. **Crop Physiology and Metabolism**, 4: 2109-2117, 2003.

KUZNETSOV, V, SHORINA, M., ARONOVA, E., STETSENKO, L., RAKITIN, V., SHEVYAKOVA, N. NaCl- and ethylene-dependent cadaverine accumulation and its possible protective role in the adaptation of the common ice plant to salt stress. **Plant Science**, 172: 363-370, 2007.

LIMA, G.P.P., FERNANDES, A.A.H., CATÂNEO, A.C., CEREDA, M.P., BRASIL, O.G. Alterações na atividade da peroxidase e do conteúdo de carboidratos em mandioca cultivada *in vitro* sob estresse salino. **Scientia Agricola**, 55 (3): 1-7, 1998.

LOPEZ-DELGADO, H. & SCOTT, I. Induction of *in vitro* tuberization of potato microplants by acetylsalicylic acid. **Journal of Plant Physiology**, 151: 74-78, 1997.

MARRI, C., FRAZZOLI, A., HOCHKOEPLER, A., POGGI, V. Purification of a polyphenol oxidase isoform from potato (*Solanum tuberosum*) tubers. **Phytochemistry**, 63: 745-752, 2003.

MENOLLI, L.N. **Atuação das enzimas oxidativas em raízes de batata-baroa (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft) submetidas a injúria por frio.** Viçosa: UFV, 2006. 63p. (Dissertação - Mestrado em Fisiologia Vegetal, Universidade Federal de Viçosa, MG).

MITTAL, R. & DUBEY, R.S. Behaviour of peroxidases in rice: changes in enzyme activity and isoforms in relation to salt tolerance. **Plant Physiology and Biochemistry**, 29: 31-40, 1991.

MORALES, M.A., SANCHEZ-BLANCO, M.J., OLMOS, E., TORRECILLAS, A., ALARCÓN, J.J. Changes in the growth, leaf water relations and cell ultrastructure in *Argyranthemum cronopifolium* plants under saline conditions. **Journal of Plant Physiology**, 153: 174-180, 1998.

MORSY, M.R., JOUVE, L., HAUSMAN, J.F., HOFFMANN, L., STEWART, J.M. Alteration of oxidative and carbohydrate metabolism under abiotic stress in two rice (*Oryza sativa* L.) genotypes contrasting in chilling tolerance. **Journal of Plant Physiology**, 164 (1): 157-167, 2007.

MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, 15:473-497, 1962.

NEVES, L.M. **Envolvimento de enzimas oxidativas no escurecimento do quiabo (*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench)**. Viçosa, 2003. 72p. (Tese – Doutorado em Fisiologia Vegetal, Universidade Federal de Viçosa, MG).

RADIC, S. RADIC-STOJKOVIC, M., PEVALEK-KOZLINAB. Influence of NaCl and manitol on peroxidases activity and lipid peroxidation in *Centaurea ragusina* L. roots and shoots. **Journal of Plant Physiology**, 16: 1284-1292, 2006.

ROSSI, C., LIMA, G.P.P., HAKVOORT, D.M.R. Atividade de peroxidases (EC1.11.1.7) e teor de prolina em feijoeiro *Phaseolus vulgaris* L. cultivado em condições de salinidade. **Scientia Agricola**, 54: 123-127, 1997.

ROUSSOS, P.A., TSANTILI, E., PONTIKIS, C.A. Responses of jojoba explants to different salinity levels during the proliferation stage *in vitro*. **Industrial Crops and Products**, 23: 65-72, 2006.

SEKI, M., KAMEI, A., YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K., SHINOZAKI, K. Molecular responses to drought, salinity and frost: common and different paths for plant protection. **Current Opinion**, 14: 194-1999, 2003.

SEPPÄNEN, M.M., MAJAHARJU, M., SOMARSALO, S., PEHU, E. Freezing tolerance, cold acclimation and oxidative stress in potato. Paraquat tolerance is related to acclimation but is a poor indicator of freezing tolerance. **Physiologia Plantarum**, 102: 454-460, 1998.

SILVA, J.A.B. **Minituberização, micropropagação e efeitos dos estresses salino e térmico sobre características morfofisiológicas de batateiras cultivadas *in vitro***. Viçosa, 1999. 106p. (Tese – Mestrado em Fisiologia Vegetal, Universidade Federal de Viçosa, MG).

SILVA, J.A.B., OTONI, W.C., MARTINEZ, C.A. DIAS, L.M., SILVA, M.A.P. Microtuberization of Andean potato species (*Solanum* spp.) as affected by salinity. **Scientia Horticulturae**, 89: 91-101, 2001.

TAIZ, L. & ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Artmed Editora Ltda. Porto Alegre, 3 ed., p 346-481, 2004.

WILLEKENS, H., INZÉ, D., VAN MONTAGU, M., VAN CAMP, W. Catalases in plants. **Molecular Breeding**, 1: 207-228, 1995.

WOOLF, A.B., COX, K.A., WHITE, A., FERGUSON, I.B. Low temperature conditioning treatments reduce external chilling of 'Hass' avocados. **Postharvest Biology and Technology**, 28: 113-122, 2003.

## CONCLUSÕES GERAIS

A presença de citocinina e concentrações elevadas de sacarose induzem a microtuberização de taro e mandioca.

Em taro, as concentrações de 22,2  $\mu\text{M}$  BAP + 80 g L<sup>-1</sup> sacarose induz o processo de formação de microrizomas;

O tratamento com 0,4  $\mu\text{M}$  BAP + 1,6  $\mu\text{M}$  ANA + 80 g L<sup>-1</sup> sacarose, induz a formação de raiz tuberiforme em mandioca, tanto em meio sólido como em meio líquido.

As cultivares de taro e mandioca respondem diferentemente à microtuberização *in vitro*.

A microtuberização *in vitro* é caracterizada pela presença de grãos de amido nos microrizomas e raízes tuberiformes de taro e mandioca, respectivamente.

Há diferença de tolerância ao estresse térmico e salino entre as cultivares de mandioca e taro.

Baixa temperatura ou presença de NaCl no meio de cultivo induzem estresse oxidativo, caracterizado pelo aumento da atividade de enzimas antioxidantes POD e CAT e por elevada produção de etileno.

Constatou-se a presença de diferentes isoenzimas da POD e PPO em relação à parte aérea e microrizoma da planta de taro; e verificou-se a presença de isoenzimas apenas no sistema radicular, independente do estresse de baixa temperatura a que as plantas de mandiocas foram submetidas.

## **APÊNDICES**

## APÊNDICE REFERENTE AO EXPERIMENTO 1 DE TARO

Procedimento = Arranjos Fatoriais

Objetivo = Análise de Variância para dados balanceados

Dependentes = CPA DR NB

Efeitos = REP TRA CUL

Valores Observados

CUL = 1 2

TRA = 1 2 3 4

REP = 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

### CPA

Fontes de Variação	GL	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Sig.
Total	79	253.5349			
Total de Redução	7	221.2139	31.60198	70.40	0.0000
TRA	3	215.3614	71.78712	159.92	0.0000
CUL	1	3.003125	3.003125	6.69	0.0117
TRA*CUL	3	2.849375	0.9497917	2.12	0.1057
Resíduo	72	32.32100	0.4489028		

Número de Dados = 80

Média Geral = 3.0737

Coef. de Variação = 21.798

### DR

Fontes de Variação	GL	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Sig.
Total	79	11.16200			
Total de Redução	7	8.576000	1.225143	34.11	0.0000
TRA	3	7.887000	2.629000	73.20	0.0000
CUL	1	0.1445000	0.1445000	4.02	0.0486
TRA*CUL	3	0.5445000	0.1815000	5.05	0.0031
Resíduo	72	2.586000	0.3591667E-01		

Número de Dados = 80  
 Média Geral = 0.58500  
 Coef. de Variação = 32.396

**NB**

Fontes de Variação	GL	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Sig.
Total	79	223.6875			
Total de Redução	7	155.9875	22.28393	23.70	0.0000
TRA	3	149.5375	49.84583	53.01	0.0000
CUL	1	0.1250000E-01	0.1250000E-01	0.01	*****
TRA*CUL	3	6.437500	2.145833	2.28	0.0864
Resíduo	72	67.70000	0.9402778		

Número de Dados = 80  
 Média Geral = 1.5625  
 Coef. de Variação = 62.059

## APÊNDICE REFERENTE AO EXPERIMENTO 2 DE TARO

Procedimento = Arranjos Fatoriais

Objetivo = Análise de Variância para dados balanceados

Dependentes = CPA DR NB

Efeitos = REP TRA CUL

Valores Observados

CUL = 1 2

TRA = 1 2 3 4

REP = 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15

### CPA

Fontes de Variação	GL	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Sig.
Total	119	2627.191			
Total de Redução	7	2524.969	360.7098	395.21	0.0000
TRA	3	2521.582	840.5274	920.92	0.0000
CUL	1	1.430083	1.430083	1.57	0.2133
TRA*CUL	3	1.956250	0.6520833	0.71	*****
Resíduo	112	102.2227	0.9127024		

Número de Dados = 120

Média Geral = 5.1875

Coef. de Variação = 18.416

### T U K E Y

Variável = CPA ( 0.9127024 )

TRA	Descrição	Dados	Médias	Comparações 5%
-----	-----------	-------	--------	----------------

1		30	13.1233	A
2		30	2.7733	B
4		30	2.4633	B
3		30	2.3900	B

Q(.050, 112)= 3.694 Dms = 0.6442

## APÊNDICE REFERENTE AO EXPERIMENTO 3 DE TARO

Procedimento = Arranjos Fatoriais

Objetivo = Análise de Variância para dados balanceados

Dependentes = CPA DR NB

Efeitos = REP TRAT CULT

Valores Observados

CULT = 1 2

TRAT = 1 2 3 4

REP = 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

### CPA

Fontes de Variação	GL	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Sig.
Total	79	332.5195			
Total de Redução	7	267.8595	38.26564	42.61	0.0000
TRAT	3	232.4455	77.48183	86.28	0.0000
CULT	1	34.32200	34.32200	38.22	0.0000
TRAT*CULT	3	1.092000	0.3640000	0.41	*****
Resíduo	72	64.66000	0.8980556		

Número de Dados = 80

Média Geral = 3.3275

Coef. de Variação = 28.480

## APÊNDICE REFERENTE AO EXPERIMENTO 4 DE MANDIOCA

Procedimento = Arranjos fatoriais

Objetivo = Análise de Variância para dados balanceados

Dependentes = CPA CRL NR

Efeitos = REP TRA CUL

Valores Observados

CUL = 1 2 3

TRA = 1 2 3 4 5 6 7

REP = 1 2 3 4 5 6 7 8

### CPA

Fontes de Variação	GL	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Sig.
Total	167	4975.340			
Total de Redução	20	3884.587	194.2294	26.18	0.0000
TRA	6	3016.306	502.7176	67.75	0.0000
CUL	2	25.18905	12.59452	1.70	0.1867
TRA*CUL	12	843.0926	70.25772	9.47	0.0000
Resíduo	147	1090.753	7.420085		

Número de Dados = 168

Média Geral = 8.1012

Coef. de Variação = 33.624

### CRL

Fontes de Variação	GL	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Sig.
Total	167	2868.803			
Total de Redução	20	1948.068	97.40339	15.55	0.0000
TRA	6	1165.122	194.1870	31.00	0.0000
CUL	2	589.9189	294.9595	47.09	0.0000
TRA*CUL	12	193.0269	16.08558	2.57	0.0041
Resíduo	147	920.7350	6.263503		

Número de Dados = 168

Média Geral = 3.2786

Coef. de Variação = 76.335

#### T U K E Y

Variável = CRL ( 6.263504 )

CUL	Descrição	Dados	Médias	Comparações 5%
3		56	5.9286	A
2		56	1.9696	B
1		56	1.9375	B

Q(.050, 147)= 3.310 Dms = 1.1070

#### NR

Fontes de Variação	GL	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Sig.
Total	167	6121.786			
Total de Redução	20	4046.286	202.3143	14.33	0.0000
TRA	6	2138.286	356.3810	25.24	0.0000
CUL	2	1040.250	520.1250	36.84	0.0000
TRA*CUL	12	867.7500	72.31250	5.12	0.0000
Resíduo	147	2075.500	14.11905		

Número de Dados = 168

Média Geral = 5.0357

Coef. de Variação = 74.618

#### T U K E Y

Variável = NR ( 14.11905 )

CUL	Descrição	Dados	Médias	Comparações 5%
3		56	8.4821	A
2		56	3.9286	B
1		56	2.6964	B

Q(.050, 147)= 3.310 Dms = 1.6620