



8º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC2014
12 a 14 de agosto de 2014 – Campinas, São Paulo

MANUTENÇÃO DE PLÂNTULAS TUBEROSAS POR MEIO DE MICROPROPAGAÇÃO: 1-SELEÇÃO DE MEIOS DE CULTURA PARA MANDIOCA E DIOSCOREA

Beatriz Ferraz **Napolitano**¹; Paulo Sérgio da Silva **Coelho**²; José Carlos **Feltran**³

Nº 14143

RESUMO – A coleção de plantas do IAC contém diversas espécies, que são mantidas em campo e expostas a fatores ambientais. Assim, a estratégia da manutenção de cópias em laboratório é importante apoio para a manutenção dessas coleções. O trabalho objetivou obter e manter mudas *in vitro* de mandioca e barbasco. Foram testadas combinações do meio MS, com variações de macro e micronutrientes e de sacarose, combinados com os fitohormônios NAA, BAP e IBA. Foram feitos 2 grupos de experimentos, um para mandioca e um para barbasco, dispostos em DIC com 10 repetições, sendo aplicado esquema fatorial para barbasco. Os frascos com os explantes plaqueados foram colocados em câmara de crescimento com controle de temperatura e fotoperíodo. Foram avaliadas a formação de brotos e de raízes a cada 15 (mandioca) e 30 dias (barbasco). Os tratamentos T4, T5 e T6 proporcionaram maior número de brotos por explante, enquanto o maior número de raízes foi obtido em T4 e T6. Assim, T4 e T6 podem ser utilizados para a obtenção e manutenção de plantas de mandioca *in vitro*. Com relação aos barbascos, os tratamentos M4 e M6 proporcionaram maior número de brotos por explante em *D. Floribunda*, entretanto não ocorreu formação de raízes em nenhum tratamento. Houve contaminação dos meios de cultivo dos explantes de *D. composita*. Desta forma, novos estudos são necessários para avaliar efeitos de antibióticos e suas interações no meio de cultivo e para verificar o potencial de enraizamento de explantes derivados de hastes maduras com idades fisiológicas diferentes.

Palavras-chaves: mandioca, barbasco, micropropagação, NAA, IBA, BAP.

¹ Autor, Bolsista CNPq (PIBIT): Graduação em Ciências Biológicas, PUCC, Campinas-SP; bea_fn@hotmail.com

² Colaborador, Oficial de apoio às pesquisas agrícolas do Instituto Agrônomo (IAC), Campinas-SP

³ Orientador, Pesquisador Científico do Instituto Agrônomo (IAC), Campinas-SP; feltran@iac.sp.gov.br



ABSTRACT - The collection of plants IAC contains several species that are maintained in the field and exposed to environmental factors. Thus, the strategy of keeping copies in the laboratory is important to support the maintenance of these collections. This study aimed to obtain and maintain in vitro clones of cassava and barbasco. MS medium combinations were tested, with variations of macro and micronutrients and sucrose combined with NAA, BAP and IBA. Two groups of experiments, one for cassava and one for barbasco, were arranged in CRD with 10 replications, factorial design being applied to barbasco. The flasks with the explants were placed in a growth chamber with controlled temperature and photoperiod. The formation of shoots and roots every 15 (cassava) and 30 days (barbasco) were evaluated. T4, T5 and T6 treatments produced higher number of shoots per explant, while the highest number of roots was obtained in T4 and T6. Thus, T4 and T6 can be used for the procurement and maintenance of cassava plants in vitro. Regarding barbascos, M4 and M6 treatments produced more shoots per explant in *D. floribunda*, however there was no root formation on any treatment. Was contamination of the culture media of explants *D. composita*. Thus, further studies are needed to assess the effects of antibiotics and their interactions in the MS and to verify the potential of rooting explants derived from mature stems with different physiological ages

Key-words: cassava, barbasco, micropropagation, NAA, IBA, BAP.

1 INTRODUÇÃO

A coleção de germoplasma do Instituto Agrônomo (IAC) foi iniciada na década de 1930. Constam dessa diversas espécies produtoras de raízes e tubérculos, destacando-se batata (*Solanum tuberosum* L.), batata-doce (*Ipomoea batatas*), inhame (*Dioscorea alata* L.), barbascos (*Dioscorea floribunda*, *Dioscorea composita* e *Dioscorea spiculiflora*) e mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). Todas de propagação vegetativa, onde ocorre acúmulo de patógenos e vírus na “semente” e tem-se a necessidade de sua manutenção em campo.

A mandioca é cultivada em todo o país, para consumo humano ou para a produção de tendo farinha e fécula (amido). Embora seja planta rústica tem na bacteriose (*Xanthomonas campestris* pv. *Manihotis*) a principal doença, causando queda de produção e de qualidade das raízes. As cultivares utilizadas nos sistemas de produção têm resistência à bacteriose porém, estão



8º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC2014 12 a 14 de agosto de 2014 – Campinas, São Paulo

contaminadas e de forma assintomática. A principal forma de controle é pelo plantio de cultivares resistentes e pelo uso de material de plantio sadio.

A *Dioscorea* é o maior gênero da família Dioscoreaceae com 600 espécies (COURSEY, 1967) e ocorrência no Brasil (Pedralli, 2002). Dessas são importantes na alimentação humana: *D. cayenensis* Lam., *D. alata* L., *D. bulbifera* L., *D. esculenta* Burk., *D. rotundata* Poir. e *D. trifida* L. Outras dioscoreas (barbasco) têm propriedades medicinais, presença de sapogeninas esteroidais, utilizadas na produção de cortisona e hormônios sintéticos (Pedralli, 2002). A importância medicinal começou na década de 1940, quando Russel E. Marker, especialista em esteróides, iniciou estudos prospectivos das sapogeninas (molécula semelhante aos hormônios sexuais). A presença de diosgenina foi identificada em *D. mexicana* Guill., porém pelo menos 60 outras espécies silvestres contêm esse metabólito e apenas a *D. Composita* Hemsl., a *D. floribunda* Mart. & Gal. e a *D. spiculiflora* Hemsl. têm potencial para exploração comercial. A principal fonte de matéria-prima é o extrativismo na flora mundial. Na década de 1980 foram quantificados os teores e a produção de diosgenina na coleção do IAC (Zullo et al., 1987). Atualmente o cultivo comercial no Brasil é inexpressivo, devido ao longo ciclo de produção (± 3 anos) e à falta de mudas para o plantio. Assim o uso de plântulas micropropagadas pode auxiliar no processo de cultivo garantindo a produção de mudas clonadas e sadia. Desta forma, a estratégia de guardar cópias (plântulas), in vitro, em unidade de micropropagação é importante apoio para a manutenção das coleções do IAC e pode favorecer a produção de mudas (clones) com alta qualidade fitossanitária. Com relação a esses procedimentos, as técnicas de micropropagação para batata tem metodologias já estabelecida porém, os protocolos para a micropropagação de mandioca e de dioscoreas necessitam de ajustes específicos.

Assim, o trabalho objetivou a selecionar e ajustar meios de cultivo para a micropropagação in vitro de mandioca e de barbasco.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos de multiplicação in vitro foram realizados em Campinas-SP, no Instituto Agrônomo (IAC), com barbasco (*D. floribunda* e *D. composita*) e mandioca (*Manihot esculenta*). Esses constaram de 3 grupos experimentais: 1 com mandioca e 2 com barbasco. Nesses utilizou-se o meio de cultivo MS (Murashige & Skoog, 1962), com pH ajustado a 5,8, acrescido de sacarose e agar, sendo autoclavado a 120°C por 20 minutos, e por fim acrescido de fitormônios.



2.1. experimento com mandioca

O experimento com mandioca foi iniciado aos 8/01/2014. Nesse momento foram retirados explantes (ápices caulinares e segmentos nodais com uma ou duas gemas) de hastes maduras derivadas plantas de mandioca, cv IAC 576-70. Os explantes foram lavados em água corrente e deixados em solução de de hipoclorito de sódio (5%) por 3 minutos, sendo em seguida lavados 3 vezes em água destilada dentro de câmara de isolamento. Em sequência, os explantes foram plaqueados em meio de cultivo MS acrescido de sacarose (30g/L) e agar (4g/L). Após os frascos foram acondicionados em câmara de crescimento com controle de temperatura (27°C +/- 2°C) e fotoperíodo (16 horas luz e 8 horas escuro).

Tabela 1. Disposição dos tratamentos aplicados para a mandioca

tratamentos*	macro	micro	NAA	BAP	IBA
T1	1	1	0,2mg/L	0,2 mg/L	1,0162 mg/L
T2	1	1	0,1mg/L	0,1 mg/L	1,0162 mg/L
T3	½	½	0,2mg/L	0,2 mg/L	0
T4	½	½	0,1mg/L	0,1 mg/L	0
T5	1	½	0,2mg/L	0,1 mg/L	0
T6	½	1	0,1mg/L	0,2 mg/L	0

* todos acrescidos de 4g/L de agar e 30g/L de sacarose.

Foram testadas 6 combinações do meio de cultivo MS com variações nas quantidades de macronutrientes (macro) e micronutrientes (micro) e dos fitohormônios: ácido naftaleno acético (NAA), 6-benzil aminopurina (BAP) e ácido indol-butírico (IBA), totalizando 6 tratamentos com 10 repetições. Os tratamentos foram dispostos em delineamento internamente casualizado (DIC) e as combinações estão apresentadas na tabela 1.

2.2. experimentos com barbasco

Os experimentos com barbasco foram instalados aos 6/01/2014. Foram feitos dois experimentos com 12 tratamentos e 10 repetições, dispostos em DIC com arranjo fatorial 3 x 4, ou seja 3 meios de cultivo base MS (Meio 1: ½ macro +1 micro + 0,931mg/L NAA+1,126 mg/L 6-BAP+1,0162 mg/L de IBA; Meio 2: 1 macro + 1 micro + 0,931mg/L NAA+1,126 mg/L 6-BAP+1,0162 mg/L de IBA e Meio 3: 1 macro + ½ micro + 0,931mg/L NAA+1,126 mg/L 6-BAP+1,0162 mg/L de IBA) e 4 doses de sacarose (0, 2,5, 5 e 10 % m/v). Todos os meios de cultivo foram acrescidos com agar (8g/L). Foram coletadas hastes vigorosas das plantas de barbasco da coleção do IAC para a retirada de explantes. Os explantes foram lavados em água corrente e deixados em solução de hipoclorito de sódio (5%) por 3 minutos, sendo em seguida lavados 3 vezes em água destilada em câmara de isolamento. Em sequência, os explantes foram plaqueados nos tratamentos, sob câmara de fluxo laminar, em seguida os



frascos foram transferidos para câmara de crescimento com controle de temperatura ($25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) e fotoperíodo (16 horas de luz e 8 de escuro).

2.3. Obtenção dos dados e análise estatística

Foram avaliadas a formação brotos e de raízes a cada 15 dias em mandioca e a cada 30 em barbasco. Os dados obtidos foram transformados em $\sqrt{x + 0,5}$ e submetidos à análise de variância. Foi aplicado o teste f à 5% de probabilidade, o teste t (LSD) para as médias e análise de regressão para as doses de sacarose. As médias são apresentadas sem transformação.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Experimento com mandioca

Na tabela 2 estão apresentados os resultados do número de explantes brotados. Os tratamentos T1 e T2 não apresentaram brotações, enquanto nos demais tratamentos houve brotação dos explantes. No tratamento T6 os explantes iniciaram a emissão de brotações apenas 29 dias após o plaqueamento (DAPL), enquanto a emissão de brotações ocorreu aos 14 DAPL para os tratamentos T3, T4 e T5, os quais não diferiram entre si. Analisando os dados em todas as 7 épocas nota-se que os tratamentos T4, T5 e T6 apresentaram os maiores números de brotos por explante.

Tabela 2. Número de explantes de mandioca (cv IAC 576-70) com brotações em função dos tratamentos avaliados em sete épocas (Y1=22 de Janeiro, Y3=6 de Fevereiro, Y5=21 de fevereiro, Y7=12 de março, Y9=26 de março, Y11=9 de abril, Y13=23 de abril). Instituto Agrônômico (IAC), Campinas-SP (2014).

Tratamentos **	Y1	Y3	Y5	Y7	Y9	Y11	Y13
T1	0,0 a	0,0 c	0,0 c	0,0 c	0,0 c	0,0 b	0,0 b
T2	0,0 a	0,0 c	0,0 c	0,0 c	0,0 c	0,0 b	0,0 b
T3	0,2 a	1,4 bc	1,4 b	0,9 ab	0,9 ab	1,0 ab	1,3 ab
T4	0,8 a	4,9 a	2,6 ab	1,7 a	1,7 a	2,2 a	2,7 a
T5	0,7 a	6,3 a	4,0 a	4,3 a	2,6 a	3,0 a	3,3 a
T6	0,0 a	3,8 ab	3,3 ab	1,9 a	1,5 a	1,9 a	2,3 a
dms (teste t 0,05)	0,464	0,879	0,574	0,624	0,596	0,653	0,758

médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo teste t (LSD), a de 5% de probabilidade.

*T1- MS+0,2mg/L NAA+0,2 mg/L 6-BAP+1,016 mg/L IBA; T2- MS+0,1mg/L NAA+0,1 mg/L BAP+1,016 mg/L IBA; T3- MS ($\frac{1}{2}$ macro+ $\frac{1}{2}$ micro)+0,2mg/L NAA+0,2 mg/L BAP; T4- MS ($\frac{1}{2}$ macro + $\frac{1}{2}$ micro)+0,1mg/L NAA+0,1 mg/L BAP; T5- MS (1 macro+ $\frac{1}{2}$ micro)+0,2mg/L NAA+0,1 mg/L BAP; T6- MS ($\frac{1}{2}$ macro+1 micro)+0,1mg/L NAA+0,2 mg/L BAP).

Na tabela 3 estão apresentados os resultados do número de raízes por explantes. Aqui também nota-se que os tratamentos T1 e T2 não apresentaram enraizamento, enquanto nos demais tratamentos houve a formação de raízes. Provavelmente a presença de meio com maior



8º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC2014
12 a 14 de agosto de 2014 – Campinas, São Paulo

concentração de macronutrientes nos tratamentos T1, T2 e T5 pode ter tido efeito negativo na formação de raízes, já que a presença de macronutrientes em concentrações elevadas pode reduzir a capacidade de enraizamento mesmo com a presença de auxinas (Grattapaglia & Machado, 1998). No tratamento T4, T5 e T6 os explantes iniciaram a emissão de raízes aos 29 DAPL. Essa emissão de raízes ocorreu aos 14 DAPL para o tratamento T3. Dos tratamentos o T4 foi o que apresentou maior enraizamento no final do período avaliado (105 DAPL) porém, não diferiu estatisticamente do T6. Desta forma, pode-se considerar que os tratamentos T4 e T6 foram superiores aos demais.

Tabela 3. Número de explantes de mandioca (cv IAC 576-70) com raízes em função dos tratamentos avaliados em sete épocas (Y1=22 de Janeiro, Y3=6 de Fevereiro, Y5=21 de fevereiro, Y7=12 de março, Y9=26 de março, Y11=9 de abril, Y13=23 de abril). Instituto Agrônomo (IAC), Campinas-SP (2014).

Tratamentos*	Y1	Y3	Y5	Y7	Y9	Y11	Y13
T1	0,0 b	0,0 b	0,0 c	0,0 c	0,0 c	0,0 c	0,0 d
T2	0,0 b	0,0 b	0,0 c	0,0 c	0,0 c	0,0 c	0,0 d
T3	2,3 a	5,2 a	4,5 ab	4,0 b	5,5 b	4,2 b	4,4 c
T4	0,0 b	4,6 a	7,8 a	10,0 a	10,9 a	11,2 a	12,3 a
T5	0,0 b	3,0 ab	3,3 b	5,1 b	5,3 b	5,3 b	5,7 bc
T6	0,0 b	5,1 a	5,2 ab	5,6 b	6,3 b	6,8 b	8,8 ab
dms (teste t 0,05)	0,689	1,332	0,740	0,769	0,765	0,651	0,702

médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo teste t (LSD), a de 5% de probabilidade.

*T1- MS+0,2mg/L NAA+0,2 mg/L 6-BAP+1,016 mg/L IBA; T2- MS+0,1mg/L NAA+0,1 mg/L BAP+1,016 mg/L IBA; T3- MS (½ macro+½ micro)+0,2mg/L NAA+0,2 mg/L BAP; T4- MS (½ macro + ½ micro)+0,1mg/L NAA+0,1 mg/L BAP; T5- MS (1 macro+½ micro)+0,2mg/L NAA+0,1 mg/L BAP; T6- MS (½ macro+1 micro)+0,1mg/L NAA+0,2 mg/L BAP).

3.1. Experimentos com barbascos (dioscoreas)

3.1.1 *Dioscorea floribunda*

Tabela 4. Número de explantes com brotações de *Dioscorea floribunda* em função dos meios de cultivo nas épocas avaliadas (E1=21 de Janeiro e E2=24 de Fevereiro). Instituto Agrônomo (IAC), Campinas-SP (2014).

Tratamentos*	E1	E2
M1	0.6 b	0.0 b
M2	2.3 a	0.5 a
M3	0.6 b	0.3 ab
dms (teste t 0,05)	0,5172	0,1863

médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo teste t (LSD), à 5% de probabilidade.

*M1- ½ macro+1 micro + 0,931mg/L NAA+1,126 mg/L 6-BAP+1,0162 mg/L de IBA; M2- 1 macro+1 micro + 0,931mg/L NAA+1,126 mg/L 6-BAP+1,0162 mg/L de IBA e M3- 1 macro+½ micro + 0,931mg/L NAA+1,126 mg/L 6-BAP+1,0162 mg/L de IBA)

Na tabela 4 estão apresentados os resultados do número de explantes com brotações de *Dioscorea floribunda* em função dos meios de cultivo nas duas épocas avaliadas. Percebe-se



diferença estatística entre os meios de cultivo MS, sendo que na época 1 (48 DAPL) verifica-se maior formação de brotações no tratamento M2 que diferiu estatisticamente dos tratamentos M1 e M4. Na época 2 (82 DAPL) o número de explantes com brotações foi menor, no entanto o tratamento M2 apresentou maior número de explantes brotados não diferindo de M3. Esse menor número de brotos emitidos deve-se à oxidação dos meios e à morte de grande parte dos explantes (dados não apresentados). Em nenhum dos tratamentos ocorreu a emissão de raízes nas duas épocas avaliadas, o que pode ter favorecido a morte dos explantes. Esse resultado contrariou o obtido por (Souza et al., 2011) onde melhores resultados de enraizamento de *D. multiflora* ocorreram com concentrações de 0,1 e 1,0 mg/L de IBA. Com relação às doses de sacarose verifica-se comportamento diferencial entre as épocas, porém ajustados ao modelo polinomial (figura 1).

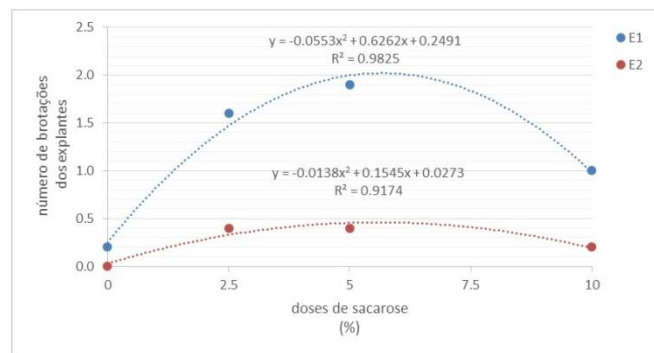


Figura 1. Número de explantes com brotações de *Dioscorea floribunda* em função doses de sacarose aplicadas ao meio de cultivo em duas épocas avaliadas (E1=21 de Janeiro e E2=24 de Fevereiro). Instituto Agrônomo (IAC), Campinas-SP (2014).

Com relação às doses de sacarose verifica-se comportamento diferencial entre as épocas, porém ajustados ao modelo polinomial (figura 1). Nesse caso, as doses máximas de sacarose que favoreceram a máxima emissão de brotos pelos explantes de *D. Floribunda* para os tratamentos E1 e E2 foram respectivamente de 5,7 e 5,6 %, diferindo de valores encontrados por Alizadeh et al. (1998) para *D. composita* (8%) e de Souza et al. (2011) para *D. multiflora* (2%). Não ocorreu interação entre os meio de cultivo e as doses de sacarose.

3.1.1 *Dioscorea composita*

Os mesmos tratamentos planejados para *D floribunda* foram aplicados na *D. Composita* porém, em todos os tratamentos ocorreu contaminação dos meios de cultivo MS por agentes bióticos, formando colônias de bactérias. Assim, não houve coleta de dados para a avaliação estatística. Diversos autores relataram como sendo comum a contaminação de meios de cultivo por bactérias no experimentos com dioscoreas em condições assépticas e relatam que as bactéria



8º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC2014 12 a 14 de agosto de 2014 – Campinas, São Paulo

são intrínsecas às estruturas vasculares de dioscoreas (Mantell, 1997; Mbah & Wakil, 2012; Wakil & Mbah, 2012).

Assim pode-se concluir que o meio MS ($\frac{1}{2}$ macro + $\frac{1}{2}$ micro) acrescido de 0,1mg/L de NAA + 0,1mg/L de 6-BAP (T4) juntamente com MS ($\frac{1}{2}$ macro + 1 micro) + 0,1mg/L de NAA e 0,2mg/L de 6-BAP (T6) – podem ser indicados para a produção de mudas de in vitro de mandioca. Com relação aos barbascos novos estudos devem ser feitos avaliando-se o meio de cultivo acrescido de antibióticos e o uso de segmentos nodais de hastas maduras idades fisiológicas diferentes.

4. AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao CNPq pela bolsa PIBITI e ao CH/IAC pela oportunidade de estágio.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALIZADEH, A.; MANTELL, S.H.; VIANA, A.M. In vitro shoot culture and microtuber induction in the steroid yam *Dioscorea composita* Hemsl. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.53, p.107-112, 1998.

COURSEY, D.G. **Yams**. London: Longmans, 1967, 230p.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPq, 1998. v.1, p.43-76. 864p.

MANTELL, S.H. Microbes intimately associated with tissue and cell cultures of tropical *Dioscorea* yams. In: CASSELLS, A.C. (ed.) **Pathogen and microbial contamination management in micropropagation**. Netherlands, 1997, 375p.

MBAH E.I, WAKIL S.M. Elimination of Bacteria from in vitro Yam Tissue Cultures Using Antibiotics. **Journal of Plant Pathology**, v. 94, n. 1, p. 53-58, 2012.

Murashige, Toshio; Skoog, Folke. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiology*, v. 15, p. 473–497, 1962.

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**, Brasília, v.20, n.4, p.530-532, 2002.

SOUZA, A. V. De; Bertoni, B.W.; França, S.de C.; Pereira, A.M.S. Micropropagação de *Dioscorea multiflora* Griseb. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 1, p. 92-98, 2011.

WAKIL S.M; MBAH E.I. Screening Antibiotics for the Elimination of Bacteria from in vitro Yam Plantlets. **AU Journal of Technology**, v. 16, n. 1, p. 7-18, 2012.

ZULLO, M. A. T.; RAMOS, M. T. B.; MONTEIRO, D. A.; GODOY JÚNIOR, G. Extração e isolamento de diosgenina de barbasco. **Bragantia**, Campinas, v. 48, n.1, p. 9-15, 1987.