



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
CURSO DE MESTRADO**

**MICROPROPAGAÇÃO E EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM  
VARIEDADES CULTIVADAS DE MANDIOCA**

**ÁDILA MELO VIDAL**

**CRUZ DAS ALMAS - BAHIA  
SETEMBRO – 2009**

MICROPROPAGAÇÃO E EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM  
VARIEDADES CULTIVADAS DE MANDIOCA

**ÁDILA MELO VIDAL**

Engenheira Agrônoma

Universidade Federal da Bahia, 2005

Dissertação submetida ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Agrárias, Área de Concentração: Fitotecnia.

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Angélica Pereira de Carvalho Costa**

**Co-orientadora: Dr<sup>a</sup>. Fernanda Vidigal Duarte Souza**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
CRUZ DAS ALMAS - BAHIA - 2009

## FICHA CATALOGRÁFICA

V648

Vidal, Ádila Melo

Micropropagação e embriogênese somática em variedades cultivadas de mandioca/ Ádila Melo Vidal .- Cruz das Almas, BA, 2009.

59 f.: il.

Orientadora: Maria Angélica Pereira de Carvalho Costa

Co-Orientadora: Fernanda Vidigal Duarte Souza

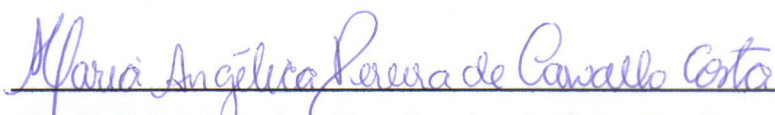
Dissertação (Mestrado) – . Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia

1. Mandioca – cultura de tecidos 2. Mandioca – micro propagação. 3. Mandioca – embriogênese. I. Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II. Título.

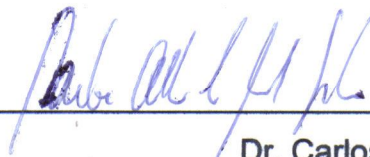
CDD 633.682

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS**

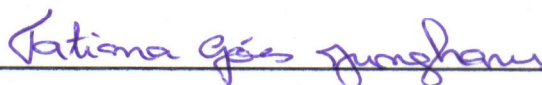
**COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE  
ÁDILA MELO VIDAL**



Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Angélica Pereira de Carvalho Costa  
Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas – UFRB  
(Orientadora)



Dr. Carlos Alberto da Silva Ledo  
Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical



Dr<sup>a</sup>. Tatiana Góes Junghans  
Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical

Dissertação homologada pelo Colegiado do Curso de Mestrado em Ciências Agrárias em.....  
Conferindo o Grau de Mestre em Ciências Agrárias em.....

“A dúvida é o sal do espírito,  
sem uma pitada de dúvida, todos  
os conhecimentos em breve  
apodreceriam”  
*(Émile-Auguste Chartier)*

A todos que estiveram presentes em minha vida durante essa importante caminhada.

## **DEDICO**

Aos meus pais Dirce Mário Vidal e Dulce Melo Vidal (*in memoriam*)

Ao meu amor Jefferson

## **OFEREÇO**

## **AGRADECIMENTOS**

A DEUS que é o todo de tudo, permitindo durante toda a minha vida, superar os obstáculos, vencer os desafios e acreditar que tudo tem solução quando se confia nEle.

A Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Angélica Pereira de Carvalho Costa, pela oportunidade, orientação e confiança na realização deste trabalho.

A Pesquisadora Dr<sup>a</sup>. Fernanda Vidigal Duarte Souza que esteve presente durante toda a trajetória deste trabalho, contribuindo com sugestões, tirando dúvidas, além da amizade, compreensão e confiança. Meus sinceros, muito obrigada!

Ao Pesquisador Dr. Antônio da Silva Souza pela importante colaboração na realização deste trabalho, confiança e amizade.

Ao Pesquisador Dr. Carlos Alberto da Silva Ledo pela realização das análises estatísticas.

Ao Pesquisador Dr. Alfredo Augusto Cunha Alves por disponibilizar o material vegetal para esta pesquisa.

A Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, pelo suporte técnico na realização deste trabalho.

A FAPESB pela concessão da bolsa.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Ciências Agrárias da UFRB.

Aos amigos e funcionários do Laboratório de Cultura de Tecidos, Tânia, Fiuza e Keuder que estiveram presentes em minha vida desde a graduação, contribuindo com seus ensinamentos, disposição, carinho e amizade.

Ao meu grande amigo Honorato que com sua experiência em estabelecimento de meristemas, esteve disposto a me ensinar e colaborar com a realização deste trabalho. Muito obrigada!

Aos amigos e colegas do Laboratório, Juracy, Sandra, Moema, Hilo, Taliane, Mariane, Meire, João Paulo, Karine, Kelly, Nagela, Frederico, Mariana, Helder e Vânia, pela ajuda, convívio, bons momentos de descontração, troca de experiências e companheirismo. Obrigada por tudo!

Ao meu primo Paulo Vidal por coletar o material para plantio e a funcionária Zara (setor de campo) por ceder material e informações sobre algumas variedades.

Aos colegas do curso de mestrado em Ciências Agrárias (Turma 2007) pelo convívio e amizade, em especial, Vânia, Fabíola, Cícera e Denis.

Ao meu pai e irmãos pelo carinho, apoio e paciência.

A minha família Melo e Vidal pelo incentivo, confiança e apoio.

A meu Amor Jefferson pela cumplicidade, paciência, amizade, amor e carinho.

Aos amigos Jamile e sua mãe Dona Vilma, Daniela, Marise Caribé, Luciano, Edilene, Anais, Marta, Lícia, Márcio, Aurivan, Lerciano, Marise Marques, pela constante força, incentivo, apoio e carinho.

Por fim, agradeço todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho. A todos os meus sinceros e profundos agradecimentos.



## SUMÁRIO

	Página
RESUMO	
ABSTRACT	
INTRODUÇÃO.....	01
<b>Capítulo 1</b>	
RESPOSTA MORFOGENÉTICA <i>IN VITRO</i> DE DIFERENTES GENÓTIPOS DE MANDIOCA.....	14
<b>Capítulo 2</b>	
EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM EXPLANTES ORIUNDOS DE PLANTAS DE MANDIOCA CULTIVADAS <i>IN VITRO</i> .....	35
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	57

# MICROPROPAGAÇÃO E EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM VARIEDADES CULTIVADAS DE MANDIOCA

**Autora:** Ádila Melo Vidal

**Orientadora:** Maria Angélica Pereira de Carvalho Costa

**Co-Orientadora:** Fernanda Vidigal Duarte Souza

**Resumo** - Apesar da grande importância, a mandioca (*Manihot esculenta*) ainda apresenta alguns fatores limitantes, tanto nos aspectos nutricionais, como no de cultivo, pois algumas variedades são bastante afetadas por fatores bióticos e abióticos. A Biotecnologia vem contribuindo com o uso de diferentes técnicas, destacando-se a micropropagação para a produção de material propagativo sadio e a embriogênese somática como um sistema de regeneração de plantas, pré-requisito básico para as técnicas de transformação genética. Este trabalho teve como objetivos a avaliação da resposta morfogênica *in vitro* e a indução da embriogênese somática em variedades cultivadas de mandioca. Após 30 dias em meio de estabelecimento, 92% dos meristemas formaram plantas que foram subcultivadas por três períodos em meio de multiplicação. O melhor resultado foi obtido com a variedade Mocotó. O protocolo usado neste trabalho não foi eficiente para as variedades Rosa e Amansa Burro. Para o estudo da embriogênese somática utilizou-se ápices caulinares e folhas jovens de plantas cultivadas *in vitro* da variedade Cigana Preta, cultivados em meio de indução suplementado com 2,4-D ou picloram, ambos nas concentrações 8 e 12 mg L<sup>-1</sup>. Os resultados mostram que a indução de embriões somáticos foi influenciada pelo tipo e concentração dos reguladores vegetais. Houve diferença significativa entre as auxinas quanto à frequência de calos com embriões e número médio de embriões por explante ao final de 75 dias de indução. Dois meios de cultura foram testados para o desenvolvimento dos embriões. Embriões, em estágio cotiledonar foram incubados em meio de germinação constituído de sais e vitaminas do MS, 2 µM de sulfato de cobre, 2,4 g L<sup>-1</sup> de Phytigel<sup>®</sup>, e 1,77 µM de BAP. Num período mínimo de quatro semanas as plantas regeneradas foram transferidas para meio convencional de multiplicação de mandioca.

**Palavras-chave:** *Manihot esculenta*, cultura de tecidos, regeneração, auxina.

# MICROPROPAGATION AND SOMATIC EMBRYOGENESIS IN CASSAVA CULTIVARS

**Author:** Ádila Melo Vidal

**Adviser:** Maria Angélica Pereira de Carvalho Costa

**Co-Adviser:** Fernanda Vidigal Duarte Souza

**Abstract** - Despite the great importance of cassava (*Manihot esculenta*), this crop still has some limiting factors regarding nutritional aspects, as well as its cultivation, because some varieties are quite affected by biotic and non biotic factors. Biotechnology has contributing with the use of different techniques, like micropropagation for the large plant production and somatic embryogenesis as a system of plant regeneration, a basic requirement to use the genetic transformation techniques. This work aimed the evaluation of the '*in vitro*' morphogenetic response and the induction of the somatic embryogenesis in cultivated varieties of cassava. After 30 days in the establishment medium, 92% of the meristems formed plants that were subcultured three times in a multiplication medium. The best result was obtained with the Mocotó variety. The protocol used in this work was not efficient for the varieties Rose and Amansa Burro. For the study of the somatic embryogenesis, stem apexes and young leaves of '*in vitro*' cultivated plants of the Cigana Preta variety, cultivated in a induction medium supplemented with 2,4-D or picloram, both in the concentrations of 8 and 12 mg L<sup>-1</sup>. The results showed that in a period of 30 days the explants formed callus, and that the induction of somatic embryos was influenced by the type and concentration of the plant regulators. There was significant difference among the auxins regarding the frequency of calluses with embryos and average number of embryos per explant, at the end of 75 days of induction. Two culture media were tested for the development of the embryos. Embryos at the cotyledonary stage were incubated in a germination medium constituted of MS salts and vitamins, 2 µM copper sulfate, 2,4 g L<sup>-1</sup> of Phytigel<sup>®</sup>, and 1,77 µM of BAP. In a minimum period of four weeks the regenerated plants were transferred to conventional medium for cassava multiplication.

**Key-words:** *Manihot esculenta*, tissue culture, regeneration, auxin.

## INTRODUÇÃO

### A Cultura da Mandioca

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) pertence à família das euforbiáceas, é uma espécie originária do continente americano e provavelmente do Brasil central (OTSUBO; LORENZI, 2004). Seu cultivo apresenta grande relevância econômica como principal fonte de carboidratos para milhões de pessoas, essencialmente nos países mais pobres e em desenvolvimento (MACHADO, 2004). Adicionalmente, tem grande importância na indústria alimentícia, na fabricação de amido, rações concentradas para animais, dentre outros produtos (SOUZA et al., 2008).

A expansão da cultura ocorreu principalmente em áreas de solos pobres, o que lhe deu uma característica de cultura de subsistência de pequenos agricultores, que por sua vez não utilizavam práticas mais rentáveis, por meio de um manejo fitotécnico adequado e recomendado (MATTOS et al., 2002).

Com uma produção de 228.138,068 toneladas, a mandioca constitui uma das principais explorações agrícolas do mundo. Entre os continentes, a África é o maior produtor mundial, seguido pela Ásia, América Latina e Oceania (FAO, 2008).

O Brasil é o segundo maior produtor de mandioca, com uma produção de 26.541.200 toneladas de raízes no ano de 2007. Dentre os principais estados produtores, destacam-se: Pará (5.216.955 t), Bahia (4.481.355 t), Paraná (3.365.003 t), Maranhão (1.765.586 t), Rio Grande do Sul (1.371.895 t) e São Paulo (1.026.732 t) que, em conjunto, são responsáveis por 64,9% da produção do país. Quanto à distribuição da produção nas diferentes regiões fisiográficas brasileiras, ainda na safra 2007, a região Nordeste apesar de contribuir com uma participação de 36,7% da produção, apresentou um rendimento médio de apenas 10,76 t/ha. Quanto às demais regiões, as participações na produção nacional

foram: Norte (28,48%), Sul (20,23%), Sudeste (8,88%) e Centro-Oeste (5,69%) (IBGE, 2008).

A cultura da mandioca tem um importante papel no Brasil, tanto como fonte de energia para alimentação humana e animal, quanto como geradora de emprego e renda, notadamente nas áreas pobres da Região Nordeste (CARDOSO; SOUZA, 2002).

Entretanto, apesar de toda importância, o valor nutricional da mandioca está muito aquém do ideal, principalmente pelos baixos níveis de proteínas, gordura, fibras e minerais, somados ao teor de glicosídeos cianogênicos (COCK, 1985). Além disso, o cultivo tem grandes limitações, como o grande número de pragas, doenças e vírus, aos quais as principais variedades são suscetíveis (BELLOTTI et al., 1999; MATTOS et al., 2002) demandando, dessa forma, o desenvolvimento de novas variedades que não apresentem tais características.

Souza et al. (2005) salienta, que nos países industrializados e em desenvolvimento vários grupos de pesquisa estão integrando todo um conhecimento científico para gerar variedades de mandioca mais produtivas e melhorar as cultivares existentes em relação a aspectos como rendimento de raízes, qualidade de proteínas, teor e qualidade de amido, tolerância às condições ambientais adversas, resistência às doenças e pragas, deterioração pós-colheita das raízes, presença de compostos cianogênicos e biofortificação com zinco, ferro e vitaminas, assim como na redução dos custos de produção. Pela importância da cultura, ações de pesquisa visando todos esses aspectos mencionados acima, são fundamentais para a melhoria tanto do produto gerado, quanto do sistema de produção.

### **Melhoramento Genético e Cultura de Tecidos**

De acordo com Pauls (1995), para a maioria das espécies cultivadas, o tempo necessário para desenvolver, avaliar e liberar uma nova variedade, dentro de um programa de melhoramento genético clássico, leva normalmente 10 - 15 anos. O processo completo inclui as fases de avaliação e manipulação do germoplasma disponível, seleção dos parentais, escolha do método de melhoramento, início do plano de melhoramento, estabilização genética dos novos materiais, experimentação e multiplicação das linhas selecionadas,

proteção da nova variedade, produção comercial e controle de qualidade da nova cultivar.

Diante da complexidade, limitações e longa duração dos programas de melhoramento genético tradicionais, muitos esforços estão sendo efetuados para encontrar enfoques alternativos que simplifiquem a obtenção de resultados, acelerem a execução dos mesmos ou como ocorre em muitos casos, ajudem a superar as barreiras existentes (BLACKHALL et al., 1994).

Entre estas novas alternativas, as mais promissoras são as que oferecem a biotecnologia vegetal, que se apresentam não tanto como ferramentas substitutivas das convencionais (embora às vezes possam o ser, caso o mesmo resultado seja obtido de forma mais rápida e/ou efetiva), mas principalmente como ferramentas complementares (quando os métodos convencionais não podem isoladamente resolver um determinado problema), estendendo, assim, as possibilidades do melhoramento genético como um todo. Estas novas tecnologias usadas em coordenação com o melhoramento genético convencional podem tornar a mandioca um produto muito mais competitivo (SOUZA et al., 2005).

Dentre as técnicas de cultura de tecidos utilizadas para mandioca, podem-se destacar as de regeneração e propagação, tais como cultura de calos, cultura de ápices caulinares, cultura de gemas axilares, isolamento e cultura de protoplastos e embriogênese somática, assim como aquelas usadas diretamente para o melhoramento genético, destacando-se a obtenção de haplóides, cultura de embriões, indução de mutações e transformação genética (SOUZA et al., 2006a).

### **Micropropagação da Mandioca**

A multiplicação da mandioca é feita preferencialmente por propagação vegetativa, ou seja, manivas retiradas da planta-mãe são plantadas no campo, dando origem a novas plantas. Entretanto, a propagação por manivas ocasiona baixa produção por causa de dois fatores principais: o envelhecimento fisiológico provocado pela constante multiplicação e a infestação por doenças que são transmitidas por sucessivas gerações (SILVA et al., 2002). A produção de material de plantio básico sadio e em números elevados é uma das grandes limitações para a expansão e um cultivo produtivo de mandioca (SOUZA et al., 2008).

Dessa forma o uso da cultura de tecidos, por meio da micropropagação, torna-se uma alternativa valiosa na superação dessas limitações. A propagação vegetativa *in vitro*, também denominada micropropagação devido ao tamanho dos propágulos utilizados, é a técnica de cultura de tecidos de aplicação mais prática e de maior impacto na agricultura nas últimas décadas (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Em mandioca, o estabelecimento dos cultivos, *in vitro* para dar início ao processo de micropropagação, se dá pelo cultivo de meristemas, permitindo a produção de mudas sadias para a formação de matrizeiros, que possam sustentar novos plantios com material propagativo de qualidade.

O uso dessas técnicas tem se destacado principalmente, no lançamento de novas variedades, permitindo o rápido acesso dos agricultores às variedades desenvolvidas pelos programas de melhoramento genético (SOUZA, et al., 2006b). Em mandioca a propagação *in vitro*, permite superar o problema da baixa taxa de multiplicação, que pelo método convencional é de 1 para 8-12 por ano (OTOO, 1996; SOUZA et al., 2002), e por cultura de tecidos, aproximadamente 1 para 43 por ano a depender da variedade (SOUZA et al., 2005).

Outro aspecto relevante do uso dessa técnica para mandioca é a recuperação de variedades tradicionais ou crioulas, pelo cultivo de meristemas para limpeza de vírus. Muitas dessas variedades, cultivadas tradicionalmente pelos agricultores de determinadas regiões, deixam de ser plantadas, ainda que sejam as preferidas, visto que a presença de vírus tais como o mosaico comum, o mosaico das nervuras (KITAJIMA, 1986), e, couro de sapo (FUKUDA; SILVA, 1997), compromete quase completamente a produtividade.

Além disso, por se apresentar como uma técnica de propagação em larga escala, a micropropagação tem se concentrado na produção comercial de plantas, possibilitando sua multiplicação rápida, em períodos de tempo e espaço físico reduzidos (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

A propagação *in vitro* via desenvolvimento organizado de ápices caulinares é um procedimento que vem sendo estabelecido para mandioca (STAMP; HENSHAW, 1986) e protocolos básicos já estão disponíveis há vários anos, podendo ser aplicados à uma gama expressiva de variedades (KARTHA et al., 1974; ROCA, 1984; SOUZA et al., 1994; SOUZA et al., 2008).

Entretanto, a variabilidade na resposta morfogenética *in vitro* existente, não apenas entre espécies do mesmo gênero, mas também entre genótipos da

mesma espécie (diferentes cultivares ou clones), leva à necessidade de se definirem protocolos diferenciados e específicos, em muitos casos (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

A mandioca, especificamente, apresenta uma elevada dependência do genótipo no cultivo *in vitro*, demandando ajustes finos para sua micropropagação eficiente.

### **Embriogênese Somática**

A produção de plantas *in vitro* de mandioca pode ser realizada também por sistemas que não sejam, necessariamente, por via organogênica, como se dá com o cultivo de meristemas de uma maneira geral, mas também por meio de um processo embriogênico advindo de células somáticas e denominado, portanto, embriogênese somática. Embriogênese somática, adventícia ou assexual, é o processo pelo qual, células haplóides ou somáticas desenvolvem-se por meio de diferentes estádios embriogênicos, dando origem a uma planta, sem que ocorra a fusão de gametas (GUERRA et al., 1999).

A primeira descrição de um sistema para regeneração de plantas por embriogênese somática foi relatada por Steward et al. (1958), em cenoura. Atualmente, tem-se estabelecido protocolos para diferentes espécies de plantas, tais como citros (COSTA, 2001); café (MACIEL et al., 2003; AYUB; GEBIELUCA, 2003), cupuaçu (FERREIRA et al., 2005), aveia (LAMB et al., 2002), algodão (GONZÁLEZ-BENITO et al., 1997), dentre outras culturas.

A embriogênese somática é um método importante para propagação das plantas-elite *in vitro*, pela possibilidade de se obter uma rápida e elevada multiplicação de plantas, partindo-se de um único explante (GUERRA et al., 1999).

Em geral, quase todas as partes da planta podem ser usadas na indução da embriogênese somática: ápices caulinares, hipocótilos, discos foliares, segmentos foliares, inflorescências, raízes e outras (CARVALHO et al., 2006).

O padrão de desenvolvimento de um embrião somático apresenta muitas características morfológicas semelhantes às do embrião zigótico. Inicialmente, ambos são caracterizados pela diferenciação de uma estrutura bipolar, constituída de ápice caulinar e radicular. Ambos passam pelos estádios de desenvolvimento



próembrionários e embrionários propriamente ditos: globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar (ARNOLD et al., 2002). Entretanto, os embriões somáticos apresentam uma particularidade quanto à presença de um sistema vascular fechado, sem conexão vascular com os tecidos do explante inicial (GUERRA et al., 1999).

A embriogênese somática pode ocorrer por meio de duas vias distintas. A primeira é a chamada de embriogênese somática direta, em que os embriões somáticos se originam dos tecidos-matriz sem a formação de estádios intermediários de calos; a segunda é a embriogênese somática indireta, na qual os embriões somáticos se originam a partir de calo (GAJ, 2004).

A embriogênese pode ser influenciada por vários fatores, tais como o tipo de explante, a composição do meio nutritivo, a concentração osmótica e a luz (FIGUEROA et al., 2006). Entretanto, para a formação de estruturas embriogênicas, são necessárias a utilização de reguladores vegetais como o exemplo das auxinas, haja vista que elas estão envolvidas no processo de indução e iniciação da embriogênese somática (JENIK; BARTON, 2005).

### **Embriogênese Somática em Mandioca**

A embriogênese somática, pelo grande potencial que tem, é capaz de maximizar a propagação da mandioca, tanto de cultivares já recomendadas para plantio como de híbridos vindos de programas de melhoramento genético.

A regeneração de plântulas de mandioca mediante a formação de embriões somáticos foi obtida pela primeira vez por Stamp & Henshaw (1982), utilizando cotilédones e lóbulos de folhas jovens.

Folhas jovens (MATSUMOTO et al., 1991; RAEMAKERS et al., 1993; LI et al., 1998), ápices caulinares e gemas laterais (SAELIM et al., 2006), lóbulos foliares jovens (JOSEPH et al., 2004), meristemas (VICTOR et al., 2000; ATENHNKENG et al., 2006), têm sido utilizados como fonte de explante para obtenção de embriões somáticos em mandioca. Por outro lado, Woodward & Puonti-kaerlas (2001) verificaram a alta capacidade embriogênica em tecidos florais de mandioca, utilizando a cultivar MCol 1505, em que 78% dos explantes produziram embriões somáticos.

O meio básico MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) é o mais utilizado para a embriogênese somática em mandioca. Contudo, muitos meios de cultura podem

ser utilizados, os quais são modificados e ajustados de acordo com os genótipos, com os tipos, idades e tamanhos dos explantes, com as condições de cultivo e com o estágio de desenvolvimento dos embriões somáticos. Frequentemente, essas alterações ocorrem nos tipos e concentrações dos reguladores de crescimento (SOUZA et al., 2006a).

Dentre as auxinas utilizadas na indução da embriogênese dos diferentes tipos de explantes em mandioca, destacam-se o uso do ácido diclorofenoxiacético (2,4-D) e o ácido 4 amino 3,5,6 tricloropicolínico (picloram) (GROLL et al., 2001; DANSO; FORD-LLOYD, 2002; MEDINA et al., 2003; ATENHNKENG et al., 2006).

Comparando-se o efeito do picloram e 2,4-D na indução da embriogênese somática em variedades africanas e sul-americanas de mandioca, Taylor & Henshaw (1993) observaram que o picloram era mais efetivo na produção de embriões do que 2,4-D, e que a produção destes variava de acordo com o genótipo.

Segundo Raemakers et al. (1993) a embriogênese somática em mandioca apresenta quatro etapas: indução, maturação dos embriões somáticos, alongamento e enraizamento dos brotos. Entretanto, a regeneração de plantas por esse sistema parece ser possível apenas para um número limitado de cultivares, principalmente em decorrência da forte dependência que o potencial embriogênico em mandioca, tem em relação ao genótipo (PUONTI-KAERLAS, 1998), como mencionado acima.

Avaliando a capacidade embriogênica de 18 acessos africanos (TME 1808, TME 1801, TME 1939, TME 2019, TME 2037, TME 279, I 4 (2) 1425, TME 60444, TME 2, TME 9, I 30572, TME 3, TME 24, Afisiafi (AFI), Abasa fitaa, Santom (SM), Tek bankye (TEK), Biafra (BF) e 15 acessos latino-americanos (M. Col 2215, M. Col 22, CM 523-7, CM 3306-19, CM 3555-6, CM 4365-3, CM 6740-7, M. Col 1468, M. Bra 12, M. Bra 191, M. Bra 383, M. Col 1505, M. Ven 77, M. Per 183 NGA-2), Danso; Ford-Lloyd (2002) observaram competência embriogênica em 15 dos 18 acessos africanos. Entre os acessos que apresentaram resposta para a formação de embriões, o TME 2037 mostrou-se menos embriogênico (8,3%) e o TME 279 mais embriogênico (92,4%). Quanto aos acessos latino-americanos, todos apresentaram competência embriogênica, destacando-se os acessos MCol da Venezuela e Colômbia, enquanto os CM da

Colômbia e o Mbra do Brasil mostraram média e baixa competências, respectivamente.

Machado (2004) avaliou a capacidade embriogênica de oito cultivares do Nordeste brasileiro (Rosinha, Água Morna, Amansa Burro, Aparecida, Mata Fome, Milagrosa, Rosa e Sacai), obtendo a menor resposta embriogênica de 31,0% (Água Morna) e a maior com 82,9% (Rosa).

Vaez (2007) avaliando explantes de cinco cultivares de mandioca (Mantiqueira, Parazinho, Vassourinha e Urubu), obteve 95%, 79%, 71% e 80% de frequência embriogênica, respectivamente.

A embriogênese somática em mandioca pode ser de grande importância como uma alternativa em apoio ao melhoramento convencional, contribuindo para a obtenção de plantas transformadas, que apresentem características desejáveis, como resistência à doenças e pragas, tolerância à seca, dentre outras. Contudo, para a aplicação dessas técnicas é necessário que se disponha de um sistema de regeneração de plantas eficiente que garanta a recuperação da célula transformada, sendo a embriogênese somática uma das mais recomendadas.

Visando contribuir para a otimização de um protocolo eficiente de micropropagação e embriogênese somática, como suporte ao programa de melhoramento genético de mandioca, este trabalho teve como objetivos principais a avaliação da resposta morfogênica *in vitro* e a indução da embriogênese somática em variedades cultivadas de mandioca.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARNOLD, S.; SABALA, I.; BOZHOKOV, P.; DYACHOK, J.; FILONOVA, L. Developmental pathways of somatic embryogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 69, p. 233-249, 2002.

ATEHNKENG, J.; ADETIMIRIN, V. O.; NG, S. Y. C. Exploring the African cassava (*Manihot esculenta* Crantz) germplasm for somatic embryogenic competence. **African Journal of Biotechnology**, v. 5, n. 14, p. 1324-1329, 2006.

AYUB, R. A.; GEBIELUCA, A. N. Embriogênese somática em genótipos de café (*coffea arabica*) é citocinina dependente. **Publicatio UEPG Ciências Exatas e da Terra, Ciências Agrárias e Engenharias**, Ponta Grossa, v. 9, n. 2, p. 25-30, 2003.

BELLOTTI, A. C.; SMITH, L.; LAPOINTE, S. L. Recent advances in cassava pest management. **Annual Review of Entomology**, v. 44, p. 343-370, 1999.

BLACKHALL, N. W.; DAVEY, M. R.; POWER, J. B. Isolation, culture, and regeneration of protoplasts. In: DIXON, R.A.; GONZALES, R.A. (Ed.). **Plant Cell Culture**. A practical approach. New York: Oxford University Press, 1994. p. 28-39.

CARDOSO, C. E. L.; SOUZA, J. da S. Importância, potencialidades e perspectivas do cultivo da mandioca na América Latina. In: CEREDA, M. P. (Coord.). **Agricultura: tuberosas amiláceas Latino Americanas**. 1 ed. São Paulo: Fundação Cargill, 2002. p. 29-47. (Série Culturas de Tuberosas Amiláceas Latino Americanas, v. 2).

CARVALHO, J. M. F. C.; LIMA, M. M. A.; AIRES, P. S. R.; VIDAL, M. S.; PIMENTEL, N. W. **Embriogênese somática**. Campina Grande, Brasil: Embrapa Algodão, 2006. (Documentos, 152).

COCK, J. H. Cassava: new potential for a neglected crop. **Westview Press**, Boulder and London, 1985.

COSTA, M. A. P. C. **Hibridação somática em citros com ênfase ao melhoramento de porta-enxertos**. Piracicaba, 2001. 125 p. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

DANSO, K. E.; FORD-LLOYD, B. V. Induction of high-frequency somatic embryos in cassava for cryopreservation. **Plant Cell Reports**, v. 21, p. 226-232, 2002.

FAO, Statistical Database, 2007. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/011/ai474e/ai474e06.htm>>. Acesso em: 30 dez. 2008.

FERREIRA, M. G. R.; CARVALHO, C. H. S.; CARNEIRO, A. A.; FILHO, C. F. D. Indução de embriogênese somática em cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 27, n. 3, p. 500-503, 2005.

FIGUEROA, F. R. Q.; HERRERA, R. R.; AVALOS, R. M. G.; VARGAS, V. M. L. Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 86, p. 285-301, 2006.

FUKUDA, C.; SILVA, J. F. da. **Doença do “couro de sapo” em mandioca**. Cruz das Almas: Embrapa: EBDA, 1997. 2 p.

GAJ, M. D. Factors influencing somatic embryogenesis induction and plant regeneration with particular reference to *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. **Plant Growth Regulation**, v. 43, p. 27-47, 2004.

GONZÁLEZ-BENITO, M. E.; CARVALHO, J. M. F-C.; PÉREZ, C. Somatic embryogenesis of an early cotton cultivar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 5, p. 485-488, 1997.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI; EMBRAPA-CNPQ, 1998. v. 1, p. 183-260.

GROLL, J.; MYCOCK, D. J.; GRAY, V. M.; LAMINSKI, S. Secondary somatic embryogenesis of cassava on picloram supplemented media. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 65, p. 201-210, 2001.

GUERRA, M. P.; TORRES, A. C.; TEIXEIRA, J. B. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI; EMBRAPA-CNPQ, 1999. v. 2, p. 533-568.

IBGE. **Lavoura temporária** - mandioca. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br>> Acesso em: 27 dez. 2008.

JENIK, P. D.; BARTON, M. K. Surge and destroy: the role of auxin in plant embryogenesis. **Development**, v. 132, p. 3577-3585, 2005.

JOSEPH, R.; YEOH, H-H.; LOH, C-S. Induced mutations in cassava using somatic embryos and the identification of mutant plants with altered starch yield and composition. **Plant Cell Reports**, v. 23, p. 91-98, 2004.

KARTHA, K. K.; GAMBORG, O. L.; CONSTABEL, F.; SHYLUK, J. P. Regeneration of cassava plants from apical meristems. **Plant Science Letters**, Amsterdam, v. 2, n. 2, p. 107-113, 1974.

KITAJIMA, E. W. Lista de publicações sobre vírus e enfermidades correlatas no Brasil (1911-1985). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, Suplemento Especial, 91 p., 1986.

LAMB, C. R. C.; MILACH, S. C. K.; PASQUALI, G.; SANTIAGO, R. Embriogênese somática e regeneração de plantas a partir de embrião maduro de aveia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 2, p. 123-130, 2002.

LI, H-Q.; GUO, J. Y.; HUANG, Y. W.; LIANG, C. Y.; LIU, H. X.; POTRYKUS, I.; PUONTI-KAERLAS, J. Regeneration of cassava plants via shoot organogenesis. **Plant Cell Reports**, v. 17, p. 410-414, 1998.

MACHADO, T. F. **Regeneração *in vitro* e transformação genética de cultivares de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) do Nordeste brasileiro**. Fortaleza, 2004. 131p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Ceará.

MACIEL, A. L. de R.; PASQUAL, M.; PEREIRA, A. R.; REZENDE, J. C.; SILVA, A. B.; DUTRA, L. F. Embriogênese somática indireta em explantes foliares de *Coffea arabica* L. cv. Obatã. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, p. 107-116, 2003.

MATSUMOTO, K.; CABRAL, G. C.; TEIXEIRA, J. B.; RECH, E. L. Embriogênese somática a partir de folhas imaturas de mandioca *in vitro*. **Revista Brasileira Fisiologia Vegetal**, v.3, n. 2, p. 107-110, 1991.

MATTOS, P. L. P.; GOMES, J. C.; FARIAS, A. R. N.; FUKUDA, C. Cultivo da mandioca nas regiões Norte e Nordeste do Brasil. In: CEREDA, M. P. (Coord.). **Agricultura: tuberosas amiláceas Latino Americanas**. 1 ed. São Paulo: Fundação Cargill, 2002. p. 274-301. (Série Culturas de Tuberosas Amiláceas Latino Americanas, v. 2).

MEDINA, R. D.; FALOCI, M. M.; SOLÍS NEFFA, V.; MROGINSKI, L. A. Embriogênese somática y regeneración de plantas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) de cultivares de interés para Argentina. **Revista de Investigaciones Agropecuárias**, v. 32, n. 3, p. 143-160, 2003.

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

OTOO, J. A. **Rapid multiplication of cassava**. IITA Research Guide, 51. 1996. Disponível em: <[http://www.iita.org/cms/details/trn\\_mat/irg51/irg51.htm](http://www.iita.org/cms/details/trn_mat/irg51/irg51.htm)>. Acesso em: 05 jan 2009.

OTSUBO, A. A.; LORENZI, J. O. **Cultivo da mandioca na região centro-sul do Brasil**. Dourados: EMBRAPA Agropecuária Oeste; Cruz das Almas: EMBRAPA Mandioca e Fruticultura, 2004, 116p.

PAULS, K. P. Plant biotechnology for crop improvement. **Biotechnology Advances**, Oxford, v. 13, n. 4, p. 673-693, 1995.

PUONTI-KAERLAS, J. Cassava biotechnology. In: TOMBS, M. P. (Ed.). **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**. Hants, UK: Intercept Ltd., 1998.

RAEMAKERS, C. J. J. M.; AMATI, M.; STARITSKY, G.; JACOBSEN, E.; VISSER, R. G. F. Cyclic somatic embryogenesis and plant regeneration in cassava. **Annals of Botany**, London, v. 71, n. 4, p. 289-294, 1993.

ROCA, W. M. Aplicaciones de herramientas biotecnológicas en el CIAT. In: CONGRESO NACIONAL DE CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES, 1., 1984, Bogotá. **Memorias...** Bogotá: Universidad Nacional de Colombia, 1984. p. 42-62.

SAELIM, L.; PHANSIRI, S.; NETRPHAN, S.; SUKSANGPANOMRUNG, M.; NARANGAJAVANA, J. Optimization of *in vitro* cyclic somatic embryogenesis and regeneration of the asian cultivars of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) for Genetic Manipulation System. **Global Journal of Biotechnology & Biochemistry**, v.1, n. 1, p. 07-15, 2006.

SILVA, M. N. da; CEREDA, M. P.; FIORINI, R. A. Multiplicação rápida de mandioca. In: CEREDA, M. P. (Coord.). **Agricultura: tuberosas amiláceas Latino Americanas**. 1 ed. São Paulo: Fundação Cargill, 2002. p.187-197. (Série Culturas de Tuberosas Amiláceas Latino Americanas, v. 2).

SOUZA, A. da S.; SOUZA, F. V. D.; SANTOS-SEREJO, J. A. dos; JUNGHANS, T. G.; SILVA NETO, H. P. da. Micropropagação da mandioca mediante ápices caulinares e segmentos nodais. **Circular Técnica 88**. Embrapa. Cruz das Almas, 11p. 2008.

SOUZA, A. da S.; JUNGHANS, T. G.; JUNGHANS, D. T.; MENDES, R. A.; MONTARROYOS, A. V. V. Cultura de tecidos em mandioca: técnicas e aplicações. In: SOUZA, L. da S.; FARIAS, A. R. N.; MATTOS, P. L. P de; FUKUDA, W. M. G. (Eds.). **Aspectos socioeconômicos e agrônômicos da mandioca**. Cruz das Almas - BA: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2006a. p. 364-432.

SOUZA, A. da S.; PAZ, O. P. da; MONTARROYOS, A. V. V. Protocolo do cultivo *in vitro* de ápices caulinares de mandioca. **Biotecnologia em foco**. Cruz das Almas, BA: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 1994. n. 4.

SOUZA, A. da S.; JUNGHANS, T.G.; FUKUDA, W. M. G. Técnicas e aplicações da cultura de tecidos em mandioca. In: CEREDA, M. P. (Coord.). **Agricultura: tuberosas amiláceas Latino Americanas**. 1 ed. São Paulo: Fundação Cargill, 2002. p.118-178. (Série Culturas de Tuberosas Amiláceas Latino Americanas, v. 2).

SOUZA, A. da S.; SOUZA, F. V. D.; SANTOS-SEREJO, J. A.; JUNGHANS, T. G. Biotecnologia como ferramenta para o aumento de competitividade na mandioca. In: **XI CONGRESSO BRASILEIRO DE MANDIOCA**, 2005, Campo Grande – MS.

SOUZA, F. V. D.; JUNGHANS, T. G.; SOUZA, A. da S.; SANTOS-SEREJO, J. A. dos; COSTA, M. A. P. de C. Micropropagação. In: SOUZA, A. da S.; JUNGHANS, T. G. (Eds.). **Introdução à micropropagação de plantas**. Cruz das Almas - BA: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2006b. p. 38-52.

STAMP, J. A.; HENSHAW, G. G. Adventitious regeneration in cassava. In: WITHERS, L. A.; ALDERSON, P. G. (Ed.). **Plant Tissue Culture and its Agricultural Applications**, London: Butterworths, 1986. p. 149-157.

STAMP, J. A.; HENSHAW, G. G. Somatic embryogenesis in cassava. **Zeitschrift für Pflanzenphysiologie**, Stuttgart, v. 105, p. 183-187, 1982.

STEWART, F. C.; MAPES, M. O.; MEARS, K. Growth and organized development of cultured cells. II. Organization in cultures from freely suspended cells. **American Journal of Botany**, v. 45, p. 705-708, 1958.

TAYLOR, N. J.; HENSHAW, G. G. The induction of somatic embryogenesis in fifteen African and south American cassava cultivars. In: ROCA, W.; THRO, A. M. (eds.) **INTERNATIONAL SCIENTIFIC MEETING OF CASSAVA BIOTECHNOLOGY**

NETWORK, 1, 1993, Cartagena. **Proceedings...** Cartagena, Colombia: CIAT, p. 137-139 (Working Document, 123).

VAEZ, J. R. **Avaliação de fatores associados à regeneração *in vitro* e transformação genética de cinco cultivares de mandioca.** Viçosa, 2007. 119p. Tese (Doutorado) – Universidade federal de Viçosa.

VÍCTOR, R. M.; PADRÓN, E.; RODRÍGUEZ, S.; GÓMEZ, R.; GARCÍA, M.; LÓPEZ, J.; VENTURA, J.; MARÍNEZ, M.; ALVAREZ, M. Embriogénesis somática a partir de meristemas axilares en yuca. **Biotecnología Vegetal**, v. 1, p. 21-26, 2000.

WOODWARD, B.; PUONTI-KAERLAS, J. Somatic embryogenesis from floral tissue of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Euphytica**, v. 120, n. 1, p. 1-6, 2001.



# CAPÍTULO 1

## RESPOSTA MORFOGENÉTICA *IN VITRO* DE DIFERENTES GENÓTIPOS DE MANDIOCA<sup>1</sup>

---

<sup>1</sup> Artigo submetido ao Comitê Editorial do periódico científico Ciência e Agrotecnologia.

## RESPOSTA MORFOGENÉTICA *IN VITRO* DE DIFERENTES GENÓTIPOS DE MANDIOCA

Ádila Melo Vidal  
Maria Angélica Pereira de Carvalho Costa  
Fernanda Vidigal Duarte Souza

### RESUMO

A mandioca se destaca no país, como atividade agrícola de alta relevância por sua importância econômica e social. Dentre as limitações para uma melhor exploração desse cultivo estão as baixas taxas de multiplicação das espécies cultivadas. A micropropagação pode ser uma alternativa interessante para contornar esse problema. O objetivo deste trabalho foi avaliar o desenvolvimento *in vitro* de variedades de mandioca de interesse, principalmente, para a Região Nordeste, destacando-se a Cigana Preta, Saracura, Rosa, Sacaiá, Do Céu, Amansa Burro e Mocotó. Meristemas isolados de brotos provenientes de manivas cultivadas em casa de vegetação foram inoculados em meio contendo os sais do MS, suplementado com 1,0 mg L<sup>-1</sup> de tiamina, 100 mg L<sup>-1</sup> de inositol, 0,02 mg L<sup>-1</sup> de ANA, 0,04 mg L<sup>-1</sup> de BAP, 0,05 mg L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub>, 20 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 2,4 g L<sup>-1</sup> de Phytigel<sup>®</sup> e cultivados em sala de crescimento sob temperatura de 27 ± 1 °C, fotoperíodo de 16 horas e densidade de fluxo de fótons de 30 μmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> por 30 dias (estabelecimento), quando 92% dos meristemas formaram plantas. Foram realizados três subcultivos, em meio de cultura composto por 1/3 dos macro e micronutrientes do MS, suplementado com 0,35 mg L<sup>-1</sup> de tiamina, 35 mg L<sup>-1</sup> de Inositol, 0,01 mg L<sup>-1</sup> de ANA, BAP e GA<sub>3</sub>, 20 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 2,4 g L<sup>-1</sup> de Phytigel<sup>®</sup>. As condições de cultivo foram as mesmas da fase de estabelecimento. Houve elevada formação de calo na fase de estabelecimento o que promoveu uma baixa formação de raízes nas variedades estudadas, exceto em Mocotó e Amansa Burro. Entretanto, um bom enraizamento foi observado ao longo dos subcultivos. As plantas apresentaram morfologia normal e um pronunciado efeito do genótipo no desenvolvimento *in vitro* das plantas foi observado. A variedade Mocotó apresentou melhor desempenho morfogênético em relação aos demais genótipos.

**Palavras-chave:** *Manihot esculenta*, cultura de tecidos, micropropagação.

## **IN VITRO MORPHOGENETIC RESPONSE OF DIFFERENT GENOTYPES OF CASSAVA**

Ádila Melo Vidal  
Maria Angélica Pereira de Carvalho Costa  
Fernanda Vidigal Duarte Souza

### **ABSTRACT**

The cassava crop, a very relevant agricultural activity in Brazil has great social and economic importance. The low multiplication rates of cultivated species have been among the main barriers to efficient exploitation of cassava crops. The micropropagation techniques may be an interesting alternative to overcome this problem. This work aimed to evaluate the '*in vitro*' development of cassava varieties of interest mainly to the Northeast Brazil like Cigana Preta, Saracura, Rosa, Sacaí, Do Céu, Amansa Burro and Mocotó. Meristems of shoots isolated from cuttings were inoculated MS medium supplemented with 1 mg L<sup>-1</sup> of thiamin, 100 mg L<sup>-1</sup> of inositol, 0.02 mg L<sup>-1</sup> of NAA, 0.04 mg L<sup>-1</sup> BAP, 0.05 mg L<sup>-1</sup> of GA<sub>3</sub>, 20 g L<sup>-1</sup> of sucrose and 2.4 g L<sup>-1</sup> of Phytigel<sup>®</sup>. The explants were incubated under the temperature of 27 ± 1 °C, for 16 h photoperiod and photon flux density of 30 μmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> for 30 days (establishment), when 92% of the meristems formed plants. Three subcultures in the 1/3 MS medium supplemented with 0.35 mg L<sup>-1</sup> of thiamin, 35 mg L<sup>-1</sup> of inositol, 0.01 mg L<sup>-1</sup> of NAA, BAP and GA<sub>3</sub>, 20 g L<sup>-1</sup> of sucrose and 2.4 g L<sup>-1</sup> of Phytigel<sup>®</sup> were performed. The conditions of incubation were the same of the establishment stage. High callus formation was observed in the establishment stage promoting a low root formation in the majority of studied varieties with exception of Mocoto and Amansa Burro. However, good rooting was observed during the subcultures. Plants showed normal morphology and a high effect of genotypes was observed. The variety Mocotó had better morphogenetic performance than the other genotypes.

**Key-words:** *Manihot esculenta*, tissue culture, micropropagation

## INTRODUÇÃO

Originária do continente americano, provavelmente do Brasil central, (OTSUBO; LORENZI, 2004) a mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é considerada a quarta fonte mais importante de carboidratos nos trópicos, superada apenas pelo arroz, cana-de-açúcar e milho (SOUZA et al., 2002). É uma cultura bastante difundida e importante, principalmente por ser constituinte da base alimentar de populações carentes da América Latina, África e Ásia (OLIVEIRA et al., 2001). Pode ser encontrada nas mais diferentes regiões ecológicas, em que os fatores temperatura, precipitação pluvial, fotoperíodo, altitude e latitude são extremamente variáveis, denotando assim a sua ampla adaptação a diferentes condições edafo-climáticas (OLIVEIRA et al., 2006).

A mandioca é propagada vegetativamente, a partir de estacas, chamadas de manivas. A propagação em campo é muito lenta, produzindo a cada ano, sob condições adequadas de cultivo, estacas para o plantio de uma área oito vezes maior que a de sua origem. Além disso, várias doenças, causadas por bactérias, fungos, e, principalmente as sistêmicas, podem ser transmitidas por meio de sucessivas gerações, afetando a produtividade da cultura em níveis de até 100% (LOPEZ, 1995).

O ciclo longo da cultura associado a essas doenças, a disseminação de organismos aderidos à superfície da maniva como cochonilhas, ácaros e esporos de fungos e o estado nutricional do material de plantio, podem resultar em material propagativo de baixa qualidade e conseqüentemente no baixo rendimento da cultura (PIZA; PINHO, 2002).

Como alternativa, a Biotecnologia vem contribuindo para as pesquisas realizadas com a cultura, pelo uso de diferentes técnicas, destacando-se a micropropagação para a produção de material propagativo sadio. Essa técnica pode ser empregada quando se pretende multiplicar algum material promissor de uma determinada espécie, com as vantagens de prevenir a disseminação de pragas e doenças de uma geração para outra, obter um número elevado de plantas num curto espaço de tempo e assegurar estabilidade genética (SOUZA et al., 2008). Além disso, esta técnica é utilizada, não somente na propagação das variedades cultivadas, mas pode também representar a recuperação de variedades de importância regional ou crioulas pela possibilidade de limpeza de

vírus (SOUZA et al., 2006a). O resgate dessas variedades e sua reintrodução nas comunidades são importantes para a conservação desse germoplasma.

Dentro da espécie *Manihot esculenta* Crantz existe uma grande variabilidade quanto à resposta morfogênética *in vitro*, em função do genótipo e do tipo de trabalho conduzido. Essa forte dependência do genótipo resulta em demandas nutricionais e condições de cultivo distintas necessitando de estudos específicos visando maximizar os processos de desenvolvimento *in vitro* (OLIVEIRA et al., 1995).

As variedades Amansa Burro, Cigana Preta, Do Céu, Mocotó, Rosa, Sacai e Saracura foram escolhidas pela importância agrônômica que possuem na região Nordeste. A variedade Amansa Burro é cultivada no semiárido de Pernambuco e recomendada para uso na agroindústria para produção de farinha de mesa e uso para alimentação animal. A Cigana Preta, cultivada no Recôncavo Baiano, apresenta alto teor de matéria seca, resistência à podridão das raízes e à seca. A Do Céu, proveniente do município de Pentecostes no Ceará, apresenta polpa de coloração branca e 33,1% de amido, sendo utilizada na fabricação de farinha. A variedade Mocotó, procedente do município de Jaguaquara – BA apresenta ciclo de 12 meses, é resistente à seca e tolerante ao ácaro, sendo utilizada para produção de farinha e fécula. A Rosa, cultivada na região semiárida de Sergipe é utilizada para consumo fresco, resistente à seca e tolerante ao ácaro. Sacai, tolerante à seca, cultivada na região do Ceará para a fabricação de farinha, apresenta ciclo de 18 meses e é uma das variedades que mesmo em condições de estresse hídrico, apresentou de 3,0 a 4,0 Kg de raízes/planta (ALVES et al., 2007). Finalmente a variedade Saracura é bastante cultivada no recôncavo da Bahia, apresenta 30,9% de amido, e é utilizada para consumo fresco.

Diante desse contexto o presente trabalho teve por objetivo avaliar o desenvolvimento *in vitro* de variedades de mandioca de interesse, principalmente, para a Região Nordeste.

## MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Cultura de Tecidos e em casa de vegetação da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, em Cruz das Almas, BA. Como material vegetal foram utilizadas as variedades Amansa Burro (BGM 549), Cigana Preta (BGM 116), Do Céu (BGM 537), Mocotó (BGM 867), Rosa (BGM 260), Sacaí (BGM 384) e Saracura (BGM 254), obtidas do Banco Ativo de Germoplasma de Mandioca da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical.

Manivas provenientes de plantas adultas foram estabelecidas em vasos de polietileno contendo uma mistura do substrato Plantmax<sup>®</sup> + fibra de coco (2:1). Após 21 dias de plantio, coletou-se a região apical dos brotos emergidos das manivas medindo 2,0 cm de comprimento, colocando-os em recipiente contendo água destilada. O processo de desinfestação foi realizado em câmara de fluxo, onde brotos foram imersos em álcool a 50% por três minutos e hipoclorito de sódio a 0,25% por três minutos, seguido da tripla lavagem em água destilada e autoclavada. Após esse processo, realizou-se a retirada dos meristemas (0,1 mm) com o auxílio de microscópio estereoscópio, bisturi e pinça (Figura 1).

Os meristemas foram inoculados em meio de cultura contendo os sais do MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com 1 mg L<sup>-1</sup> de tiamina, 100 mg L<sup>-1</sup> de inositol, 0,02 mg L<sup>-1</sup> de ANA (ácido naftalenoacético), 0,04 mg L<sup>-1</sup> de BAP (benzaminopurina), 0,05 mg L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub> (ácido giberélico), 20 g L<sup>-1</sup> de sacarose, solidificado com 2,4 g L<sup>-1</sup> de Phytigel<sup>®</sup> e pH ajustado em 5,8.

A incubação foi realizada em câmara de crescimento sob temperatura de 27 ± 1 °C, fotoperíodo de 16 horas e densidade de fluxo de fótons 30 μmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> por 30 dias (fase de estabelecimento).

A etapa de multiplicação foi realizada em três subcultivos, utilizando como explante, microestacas de aproximadamente 1,0 cm, contendo uma gema apical ou uma gema lateral. O primeiro subcultivo foi realizado após 60 dias do estabelecimento e os outros em intervalos de 120 dias.

O meio de multiplicação foi composto por 1/3 dos macro e micronutrientes do MS, suplementado com 0,35 mg L<sup>-1</sup> de tiamina, 35 mg L<sup>-1</sup> de inositol, 0,01 mg L<sup>-1</sup> de ANA, 0,01 mg L<sup>-1</sup> de BAP, 0,01 mg L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub>, 20 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 2,4 g

L<sup>-1</sup> de Phytigel®. O pH do meio e as condições de cultivo foram as mesmas da fase de estabelecimento.

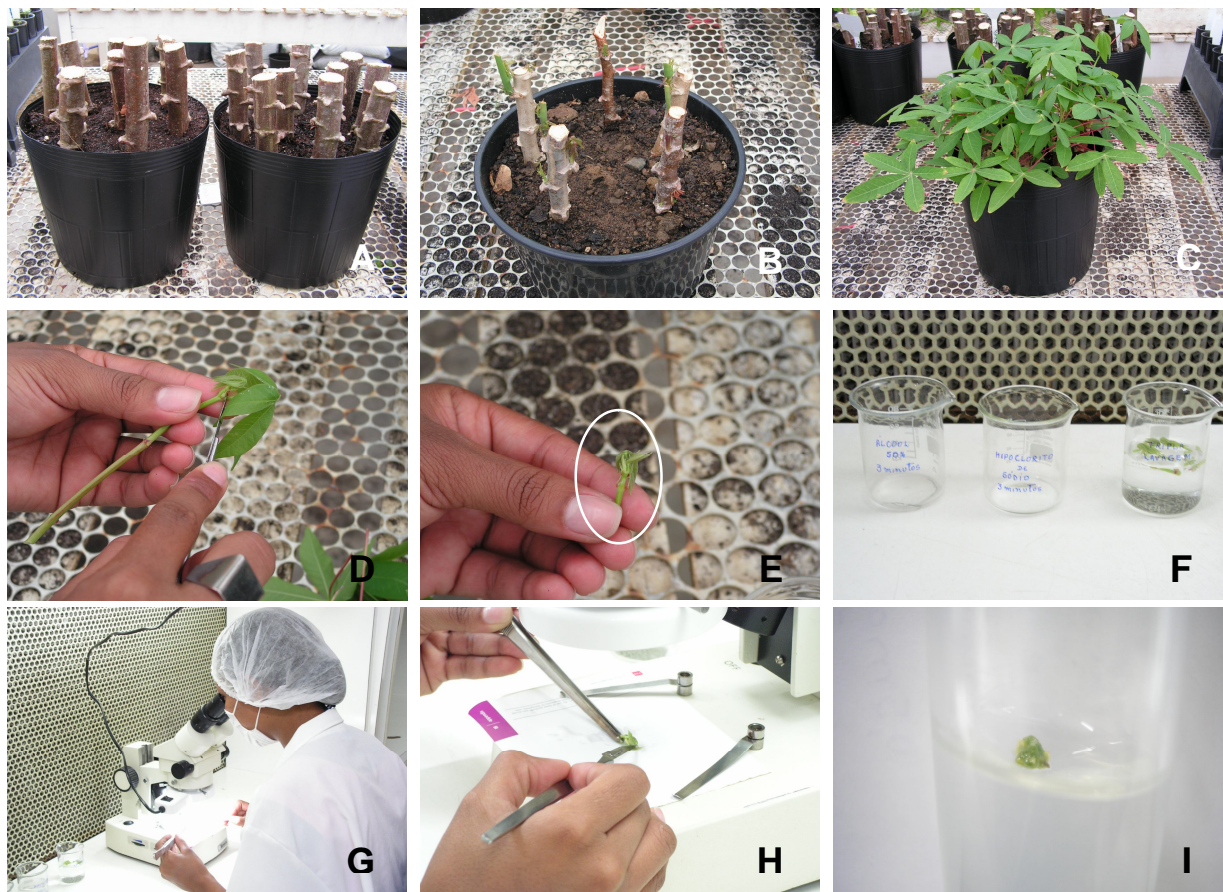
Aos 60 dias após a inoculação, assim como em cada subcultivo avaliou-se a altura da planta [AP (cm)], número de microestacas (NM), número de folhas verdes (NFV) e mortas (NFM), formação de calo na base da planta, formação de raízes, porcentagem de plantas mortas e porcentagem de contaminação por fungo ou bactéria para cada variedade.

O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso, desbalanceado, onde o número de repetições por tratamento variou de 15 a 48, a depender do genótipo. A unidade experimental constituiu-se de uma planta por tubo de ensaio. Para as variáveis, altura da planta, número de folhas verdes, número de folhas mortas e microestacas, as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade na fase de estabelecimento e Tukey a 5% de probabilidade para os subcultivos. Realizou-se a transformação de dados  $\sqrt{(x + 0,5)}$  para número de folhas verdes e mortas e número de microestacas. Foi calculado o coeficiente de correlação de Pearson para todas as variáveis analisadas.

Com base nas médias obtidas do número de microestacas nos três subcultivos realizados, foi realizada uma projeção para estimar o número potencial de plantas e a taxa de multiplicação (TM) que podem ser obtidas em um ano de cultivo, considerando a realização de seis subcultivos em intervalos de 60 dias a partir da seguinte fórmula:

$$TM = \frac{\bar{X}_{S1} \times \bar{X}_G^{ns}}{ne}$$

onde:  $\bar{X}_{S1}$  = número médio de microestacas formadas por planta no primeiro subcultivo da fase de multiplicação;  $\bar{X}_G$  = média geral dos subcultivos; ns = número de subcultivos da projeção que se pretende ter e ne = número de explantes estabelecidos.



**Figura 1.** Procedimentos para o estabelecimento *in vitro* de ápices meristemáticos de mandioca: (A) manivas da variedade cigana preta oriundas de plantas adultas; (B) início da brotação; (C) plantas crescidas no ponto de retirada dos ápices; (D) eliminação de folhas que não fazem parte da região apical; (E) estaca com a região apical; (F) procedimento de desinfestação; (G-H) retirada do ápice meristemático em ambiente asséptico; (I) meristema em meio de cultivo já em fase de crescimento.



## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na fase de estabelecimento, independente da variedade estudada, aproximadamente 92% dos meristemas respondeu ao meio de cultura e às condições estabelecidas de cultivo, formando plantas nos primeiros 30 dias após a inoculação. Oliveira et al. (2000) utilizando as variedades Aipim-Maranhão, Aipim-Rosa, Cangaíba, Caravela, Cravela e Pretinha obteve uma eficiência de 78% dos meristemas, no mesmo período de tempo e condições de cultivo.

Não foram registradas contaminações de nenhum tipo, fúngica ou bacteriana, nessa fase. Contudo, na variedade Do Céu, 30% das plantas morreram na fase de estabelecimento. As causas podem estar relacionadas à adaptação dos meristemas à condição de cultivo estabelecida ou mesmo à própria capacidade reprodutiva da variedade. Por outro lado, as variedades Rosa e Saracura não apresentaram nenhuma morte durante o estabelecimento, como pode ser observado na Tabela 1.

**Tabela 1.** Porcentagem de morte das plantas de variedades de mandioca na fase de estabelecimento *in vitro*.

Variedade	Morte (%)
Amansa Burro	2,9
Cigana Preta	6,2
Do Céu	30,0
Mocotó	6,2
Rosa	0
Sacaí	4,5
Saracura	0

Uma planta bem formada durante a fase de estabelecimento é uma das premissas básicas para se obter boas taxas de multiplicação em mandioca. Variáveis como a altura da planta, coloração e número de folhas, formação de calos, desenvolvimento de raízes, denotando uma morfologia normal e bom estado fisiológico, são indicativos importantes para um sistema eficiente de micropropagação (OLIVEIRA et al., 2000). O padrão geral de desenvolvimento dos meristemas pode sofrer algumas modificações que dependem da variedade de mandioca, da composição do meio de cultivo ou da interação de ambos (CIAT, 1980).

Na Tabela 2 estão apresentados os resultados referentes às variáveis, altura das plantas, número de microestacas e número de folhas verdes e mortas na fase de estabelecimento. A maior média registrada para a altura de planta foi obtida com a variedade Mocotó, enquanto as variedades Sacaí e Do Céu foram estatisticamente iguais, seguidas das variedades Cigana Preta, Saracura e Amansa Burro, respectivamente. As menores plantas foram registradas na variedade Rosa segundo o teste de agrupamento de médias de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Quanto ao número de microestacas observou-se diferença estatística entre as variedades, onde a Mocotó foi superior em relação às demais. Essa variável é de extrema importância, uma vez que ela determina o número de explantes de partida para a fase de multiplicação, sendo, portanto, determinante para a obtenção de boas taxas de multiplicação.

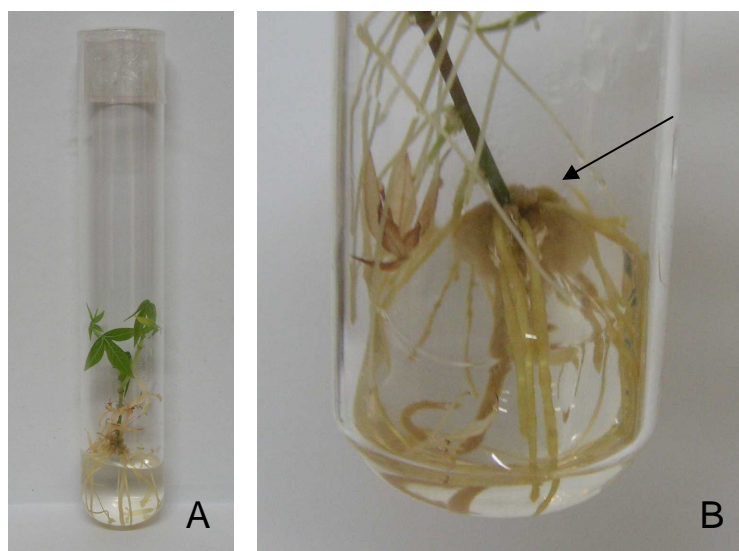
**Tabela 2.** Altura média da planta [AP (cm)], número de microestacas (NM), número de folhas verdes (NFV) e número de folhas mortas (NFM) na fase de estabelecimento *in vitro* de diferentes variedades de mandioca.

Variedade	AP (cm)	NM	NFV	NFM
Amansa Burro	1,00 c	1,00 c	1,40 b	1,60 a
Cigana Preta	1,20 c	1,10 c	1,70 b	1,80 a
Do Céu	1,30 b	1,00 c	1,80 b	1,60 a
Mocotó	1,80 a	1,50 a	2,60 a	1,10 b
Rosa	0,70 d	1,00 c	2,30 a	1,10 b
Sacaí	1,40 b	1,20 b	2,50 a	1,60 a
Saracura	1,10 c	1,00 c	2,60 a	1,00 b

Médias seguidas de mesma letra minúscula nas colunas pertencem ao mesmo grupo segundo teste de agrupamento de médias de Scott-Knott a 5% probabilidade.

Com relação ao número de folhas, ainda que o maior número de folhas verdes tenha sido registrado na variedade Mocotó, a diferença não foi significativa em relação aos resultados obtidos com as variedades Saracura, Sacaí e Rosa. Por outro lado, a variedade Cigana Preta, seguida das variedades Sacaí, Do Céu e Amansa Burro apresentaram maior perda de folhas. O número de folhas formadas, bem como o tempo que se mantêm verdes, é uma variável importante e que ajuda a medir a resposta da variedade às condições de cultivo *in vitro*, assim como se torna determinante, no caso dessa espécie, para o êxito na etapa de aclimatização.

A formação de calos deu-se em todas as variedades de maneira expressiva, variando de 66,7% na variedade Cigana Preta a 91,1% na Mocotó (Figura 2 e Tabela 3). Entretanto, essa formação de calos parece não interferir no desenvolvimento de raízes para algumas variedades, como a Amansa Burro e Mocotó, ao contrário das demais que tiveram a formação de raízes bastante comprometida, provavelmente devido a esse crescimento desordenado na base das plantas. As auxinas podem ser fortes indutoras na formação de calos no cultivo *in vitro* e a resposta diferenciada de uma variedade para outra pode ser resultante da interação de níveis endógenos de reguladores vegetais de cada uma dessas variedades com as concentrações exógenas usadas no meio de cultura.



**Figura 2.** A) Planta da variedade Mocotó aos 30 dias de cultivo com formação de calo na base. B) Detalhe da formação de calo.

A formação de raiz, parte aérea e calo em cultura de tecidos é regulada pela disponibilidade e interação de auxinas e citocininas (SKOOG; MILLER, 1957 citado por CALDAS et al. 1998).

**Tabela 3.** Porcentagem de plantas que formaram calos e raízes em variedades de mandioca na fase de estabelecimento *in vitro*.

Variedade	Calo (%)	Raiz (%)
Amansa Burro	70,0	80,0
Cigana Preta	66,7	3,3
Do Céu	81,3	12,5
Mocotó	91,1	71,1
Rosa	86,7	20,0
Sacaí	85,7	33,3
Saracura	72,2	50,0

Na fase de multiplicação houve perda de 100% das variedades Rosa e Amansa Burro, que já haviam apresentado o mais baixo desempenho na fase de estabelecimento, principalmente em relação altura da planta. As perdas da variedade Rosa foram registradas já no primeiro subcultivo, muito provavelmente devido ao estado fisiológico que se encontravam os explantes no momento da repicagem para o meio de multiplicação, enquanto que a variedade Amansa Burro teve 91,3% das perdas no terceiro subcultivo. Vale destacar que o comportamento dessas plantas já parecia comprometido pelo lento desenvolvimento e aspecto fisiológico das plantas.

Vários fatores podem causar a morte da planta *in vitro*, que vão desde a contaminação bacteriana até causas fisiológicas diversas que podem estar associadas ao explante inicial, ao meio de cultivo ou ao próprio efeito do genótipo, dentre outros (OLIVEIRA et al., 2000). Entretanto, como praticamente não houve contaminação durante os subcultivos, as possíveis perdas podem estar relacionadas à causas fisiológicas oriundas da pouca adaptação dessas variedades às condições de cultivo estabelecidas nesse trabalho. Por outro lado, muitas variedades de mandioca são pouco produtivas, mesmo em condições naturais de multiplicação (SOUZA et al., 2008), comportamento que pode ser repetido *in vitro*.

Na fase de multiplicação, as mesmas variáveis foram avaliadas em cada subcultivo. No que se refere à altura da planta, não houve diferença significativa entre os subcultivos, para as variedades estudadas, exceto a Mocotó que apresentou um aumento nas sucessivas repicagens. A maior altura média de plantas nos três subcultivos foi registrada nas variedades Mocotó e Saracura

(Tabela 4) enquanto a variedade Amansa Burro apresentou o pior desempenho não tendo chegado ao terceiro subcultivo.

**Tabela 4.** Altura média da planta [AP (cm)] e número de microestacas (NM) por subcultivo em variedades de mandioca.

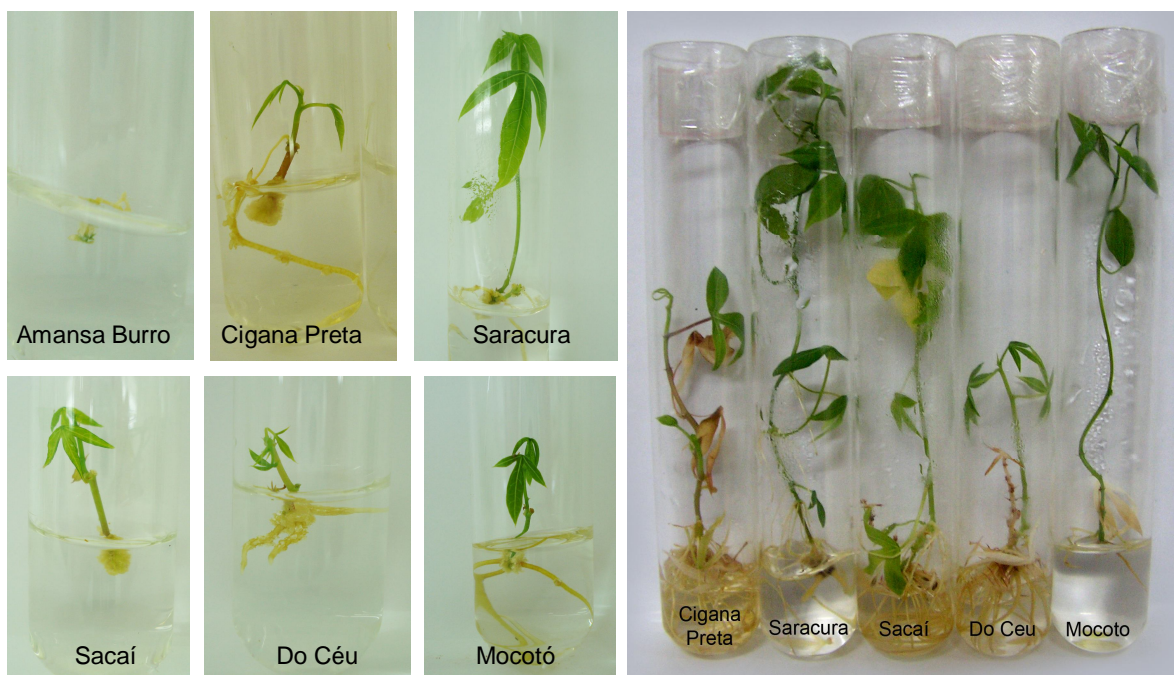
Variedade	AP			NM		
	Sub I	Sub II	Sub III	Sub I	Sub II	Sub III
Amansa Burro	4,56bA	2,05cA	-	2,09bA	1,00bA	-
Cigana Preta	4,78 bA	5,91bcA	8,41bcA	2,28bA	2,16abA	3,27abA
Do Céu	8,45bA	9,92abA	7,25cA	3,50abA	2,90aA	2,43bA
Mocotó	9,41abB	10,38abAB	10,88abA	3,80aAB	3,53aB	4,04aA
Sacaí	8,70bA	7,86abA	9,21abcA	4,00aA	2,46abB	3,00abAB
Saracura	14,00aA	12,12aA	11,98aA	3,60abA	3,04aA	3,54aA
CV(%)	32,64			17,43		

Médias seguidas de mesma letra minúscula nas colunas e maiúscula nas linhas não diferem entre si segundo teste Tukey a 5% probabilidade.

A altura da planta é uma variável importante, pois reflete, juntamente com a produção de folhas, o desenvolvimento da planta *in vitro* como resposta ao meio de cultura e às condições de incubação impostas. No entanto, quando o objetivo do trabalho for micropropagação, essa variável deve ser avaliada em conjunto com a produção de microestacas, que é o que determina, no final, as taxas de multiplicação de cada variedade. Na Figura 3 é possível se observar o aspecto das variedades, no início da etapa de multiplicação e aos 120 dias de cultivo. A variedade Amansa Burro desde o princípio mostrou um comportamento lento e comprometido, não se desenvolvendo até o final.

Quanto ao número de microestacas, as variedades Saracura, Do Céu, Mocotó e Sacaí apresentaram resultados estatisticamente iguais, ainda que a última tenha apresentado um valor ligeiramente maior. A variedade Amansa Burro, à semelhança do que foi discutido para a variável altura da planta, apresentou número de microestacas muito pequeno evidenciando o comprometimento que o material já se encontrava (Tabela 4). Para as variedades Mocotó e Sacaí, observou-se no segundo subcultivo uma redução no número de microestacas em relação ao primeiro. Entretanto, no terceiro subcultivo um aumento no número de microestacas nas mesmas variedades, foi observado. Possivelmente, com o aumento no período entre os subcultivos houve uma

maximização na utilização dos recipientes e do meio de cultura (OLIVEIRA et al. 2000).



**Figura 3.** Aspecto geral de plantas *in vitro* de mandioca no início da etapa de multiplicação e plantas totalmente desenvolvidas aos 120 dias de cultivo.

Para todas as variedades de mandioca não houve diferença estatística quanto ao número de folhas verdes, nos três subcultivos realizados (Tabela 5). No entanto, para todas as variedades houve um desenvolvimento normal das folhas quanto à coloração, forma e tamanho.

**Tabela 5.** Número de folhas verdes (NFV) e número de folhas mortas (NFM) por subcultivo em variedades de mandioca.

Variedade	NFV			NFM		
	Sub I	Sub II	Sub III	Sub I	Sub II	Sub III
Amansa Burro	2,18 aA	2,00bA	-	1,09cA	1,50bA	-
Cigana Preta	3,57 aA	3,00abA	2,18bA	1,71bcB	4,00aA	4,63aA
Do Céu	2,50 aA	2,90abA	3,12abA	3,25abA	4,10aA	4,43aA
Mocotó	4,23aA	4,49aA	4,32aA	1,40bcB	1,69bB	3,96aA
Sacaí	2,66 aA	2,86abA	4,00aA	2,50abcB	4,33aA	3,53aAB
Saracura	3,30 aA	3,62abA	3,83aA	4,20aA	3,04abA	4,27aA
CV(%)	22,54			21,32		

Médias seguidas de mesma letra minúscula nas colunas e maiúscula nas linhas não diferem entre si segundo teste Tukey a 5% probabilidade.

No período dos subcultivos, pôde-se observar uma acentuada perda das folhas nas variedades estudadas. No primeiro subcultivo a variedade Saracura apresentou a maior perda de folhas. Já no segundo subcultivo não houve diferença estatística quanto ao número de folhas mortas para as variedades Cigana Preta, Sacaí e Do Céu (Tabela 5).

No geral, houve uma acentuada perda de folhas principalmente no segundo e terceiro subcultivos. Provavelmente essa perda pode estar relacionada à exaustão de algum componente do meio de cultura responsável pelo desenvolvimento da parte aérea ou pelo acúmulo de etileno. Segundo Righetti et al. (1990), a condição de crescimento do material vegetal na cultura de tecidos normalmente em frascos ou tubos fechados, para evitar contaminações e retardar o ressecamento do meio, é conhecida como a principal causa da acumulação dos compostos liberados nos recipientes. Desses compostos voláteis, um dos mais importantes é o etileno. O etileno acumulado pode ser benéfico, mas em muitos casos pode ser prejudicial para o crescimento e desenvolvimento da cultura. Um efeito conhecido da acumulação do etileno é a promoção da senescência e abscisão em folhas nas culturas. O acúmulo do etileno juntamente com o longo período entre um subcultivo e outro, estipulado no presente trabalho, podem ter favorecido o alto número de folhas mortas registrado em todos os subcultivos.

Correlações significativas (Tabela 6) foram registradas entre todas as variáveis avaliadas, sendo que os valores mais altos foram observados entre a

altura da planta (AP) e o número de microestacas (NM), ou seja, quanto maior a planta, maior o número de microestacas. Ainda que esse comportamento não tenha sido observado para todas as variedades, como foi o caso da variedade Saracura, que as plantas atingiram uma média de 14 cm, mas a produção de microestacas não correspondeu ao tamanho das plantas, pode ser considerado um comportamento previsível para futuros trabalhos. Por outro lado, as variedades Sacaí e Do Céu, que apresentaram plantas de tamanhos semelhantes entre si e bem menores que as plantas da Saracura, tiveram o mesmo rendimento de microestacas, que essa última.

**Tabela 6.** Coeficiente de Correlação de Pearson entre as variáveis, altura da planta (AP); número de folhas verdes (NFV); número de folhas mortas (NFM) e número de microestacas (NM).

Variáveis	AP	NFV	NFM
AP			
NFV	0,44**		
NFM	0,26**	0,27**	
NM	0,71**	0,55**	0,13**

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

Esse comportamento pode ser reflexo da diferença que existe entre essas variedades *in vivo*. Por outro lado, vale destacar que a ausência de luz pode provocar um estiolamento nas plantas *in vitro* e por isso é de fundamental importância a distribuição ao acaso das plantas dentro da câmara de crescimento e a garantia das condições controladas do cultivo.

Com base nos resultados obtidos nesse trabalho, no que se refere às médias conseguidas no número de microestacas produzido por planta, realizou-se uma projeção para se prever a quantidade total de plantas produzidas e a taxa de multiplicação de cada variedade estudada, ao final de um ano, considerando-se a realização de 6 subcultivos feitos em intervalos de 60 dias. O resultado dessa projeção se encontra na Tabela 7.



**Tabela 7.** Projeção para estimar o número potencial de plantas a ser produzido e a taxa de multiplicação no período de um ano nas cinco variedades estudadas.

Variedades	Média do 1° SB*	Média geral **	Projeção NP/ano	Nº de ápices caulinares estabelecidos	Taxa de multiplicação***
Cigana Preta	2,28	2,57	657	30	(1:22)
Do Céu	3,50	2,94	2260	16	(1:141)
Mocotó	3,80	3,79	11262	45	(1:250)
Sacaí	4,00	3,15	3908	21	(1:186)
Saracura	3,60	3,39	5464	18	(1: 303)

\*Número médio de microestacas formadas por planta no primeiro subcultivo da fase de multiplicação; \*\*Essa média geral é referente aos três subcultivos realizados; \*\*\*Razão entre o número total de plantas produzidas e o número de ápices caulinares que foram estabelecidos *in vitro*.

As taxas de multiplicação de mandioca pela via convencional, a depender da variedade, atingem, em média, de 8 a 12 estacas obtidas de uma planta madura, o que, associado ao ciclo longo da cultura, se constitui em uma desvantagem muito grande, especialmente quando se compara com culturas de ciclo curto produtoras de grãos (SOUZA et al., 2006b). No entanto, registros referentes à plantas obtidas por cultura de tecidos mencionam uma taxa de multiplicação estimada em 1:5 a cada seis semanas ou aproximadamente 1:43 por ano, o que igualmente vai variar sobremaneira a depender da variedade (ZOK et al., 1993; SSEMAKULA; KASULE, 2000).

Os resultados obtidos nesse trabalho foram com base na realização de três subcultivos realizados em intervalos de 120 dias (Tabela 4), que é demasiado longo e parece haver comprometido um melhor desempenho das plantas.

Entretanto, ao se utilizar os dados para fazer uma estimativa de projeção do número de plantas que pode ser obtido ao final de um ano, considerando a realização de seis subcultivos em intervalos de 60 dias, os resultados encontrados estão de acordo com a literatura, deixando claro, inclusive, a marcante diferença entre genótipos.

É possível observar na literatura o efeito do genótipo na multiplicação *in vitro* de diversas espécies. Nogueira et al. (2001) avaliando diferentes genótipos de tomateiro, revelam que as diferenças observadas na resposta morfogênica *in*

*in vitro* entre os genótipos avaliados demonstram que o potencial de regeneração não depende somente dos diferentes reguladores de crescimento adicionados ao meio de cultivo, mas também das diferenças no componente genético, que controla o potencial morfogênético.

Oltramari et al. (2000) desenvolvendo um novo protocolo para a micropropagação da goiabeira serrana por meio de segmentos nodais e microestacas, observaram o comportamento morfogênético genótipo-dependente dos quatro acessos estudados. Bhagwat et al. (1996) observaram diferenças significativas na taxa de proliferação de brotos, a partir de segmentos nodais, em oito diferentes genótipos de *Manihot esculenta*, reforçando essa característica da espécie.

Neste trabalho o efeito do genótipo foi muito pronunciado, deixando evidente a necessidade de otimização do protocolo utilizado para as variedades avaliadas, considerando, principalmente os resultados obtidos com as variedades Rosa e Amansa Burro. Por outro lado, se faz necessário trabalhar com novos intervalos de subcultivo, visto que os usados nesse trabalho parecem ser demasiado longos, pelo menos no meio de cultura utilizado. Distinta formulação de meio de cultura é outro fator que deve ser igualmente considerado.

Vale destacar que as taxas de multiplicação *in vitro* de variedades de mandioca, quando comparadas com outras espécies, como abacaxi ou banana, por exemplo, são relativamente baixas. Considerando-se, porém, as taxas de propagação convencional da espécie, como mencionado anteriormente, esses resultados podem ser considerados muito bons. Adicionalmente e mais importante ainda é a condição fitossanitária que essa planta produzida em laboratório tem, sendo, portanto, indicada para o estabelecimento de matrizeiros.

## CONCLUSÕES

A variedade Mocotó apresenta melhor desempenho *in vitro* quanto à altura de plantas e produção de microestacas;

Houve efeito pronunciado dos genótipos na resposta morfogênética *in vitro* nos três subcultivos realizados;

A correlação entre altura das plantas e número de microestacas foi positiva, mostrando que quanto maior a planta, maior o número de microestacas;

Estudos específicos para cada variedade tornam-se necessários para maximizar o processo de desenvolvimento *in vitro*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, A. A. C.; SILVA, A. F.; QUEIROZ, D. C.; DITA, M. A. Avaliação de variedades de mandioca para tolerância à seca, em condições semiáridas do Brasil. **Revista Raízes e Amidos Tropicais**, Botucatu: CERAT-UNESP, v. 3, p. 1-5, 2007. Disponível em: <<http://www.cerat.unesp.br/revistarat/volume3.php>>. Acesso em: 03 mar. 2009.

BHAGWAT, B.; VIEIRA, L. G. E.; ERICKSON, L. R. Stimulation of *in vitro* shoot proliferation from nodal explants of cassava by thidiazuron, benzyladenine and gibberellic acid. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v. 46, p. 1-7, 1996.

CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI; EMBRAPA-CNPQ, 1998. v. 1, p. 87-132.

CIAT. **El cultivo de meristemas de yuca**. Cali, 1980. 40 p. (CIAT. Guia de Estudio. Serie 045C-02.02).

LOPEZ, J. M. Producción comercial de semilla de yuca. **Yuca Boletín Informativo**, Cali, v. 19, n. 2, p. 1-2, 1995.

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

NOGUEIRA, F. T. S.; COSTA, M. G.; FIGUEIRAM, L.; OTONI, W. C.; FINGER, F. L. Regeneração *in vitro* de plantas de tomateiros 'santa clara' e seu mutante natural 'firme'. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 25, n. 1, p. 63-71, 2001.

OLIVEIRA, A. J. de; ALCARDE, V. E. do; CANOILAS, L. M.; CANNIATTI-BRAZACA, S. G. Cultivo de microrganismos em mandioca e subprodutos da industrialização. In: CEREDA, M. P. (Coord.). **Manejo uso e tratamento de subprodutos da industrialização da mandioca**. São Paulo: Fundação Cargill, 2001. p. 269-279. (Série Culturas de Tuberosas Amiláceas Latino Americanas, v. 4).

OLIVEIRA, R. P. de; PAZ, O. P. da. Biotecnologia: cultura de tecidos em mandioca. In: IX CURSO INTENSIVO NACIONAL DE MANDIOCA. EMBRAPA Mandioca e Fruticultura Tropical, (**Folheto...**) Cruz das Almas-BA, 13 p. 1995.

OLIVEIRA, R. P.; GOMES, T. S.; VILARINHOS, A. D. Avaliação de um sistema de micropropagação massal de variedades de mandioca. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, n. 12, p. 2329-2334, dez. 2000.

OLIVEIRA, S. L.; COELHO, E. F.; NOGUEIRA, C. C. P. Irrigação. In: SOUZA, L. da S. et al. (Eds.). **Aspectos socioeconômicos e agronômicos da mandioca**. Cruz das Almas - BA: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2006. p. 291-299.

OLTRAMARI, A. C.; DAL VESCO, L. L.; PEDROTTI, E. L.; DUCROQUET, J-P. H. J.; NODARI, R. O.; GUERRA, M. P. Protocolo de micropropagação da goiabeira serrana (*Acca sellowiana* (Berg) Burret). **Ciência Rural**. Santa Maria, v. 30, n. 1, p. 61-68, 2000.

OTSUBO, A. A.; LORENZI, J. O. **Cultivo da mandioca na região centro-sul do Brasil**. Dourados: EMBRAPA Agropecuária Oeste; Cruz das Almas: EMBRAPA Mandioca e Fruticultura, 2004, 116 p.

PIZA, I. M. de T.; PINHO, R. S. Protocolo de Micropropagação da Mandioca. In: CEREDA, M. P. (Coord.). **Agricultura: tuberosas amiláceas Latino Americanas**. 1 ed. São Paulo: Fundação Cargill, 2002. p.178-187. (Série Culturas de Tuberosas Amiláceas Latino Americanas, v. 2).

RIGHETTI, B.; MAGNANINI, E.; INFANTE, R.; PREDIERE, R. Ethylene, ethanol acetaldehyde and carbon dioxide release by *Prunus avium* shoot cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 78, n. 4, p. 507-510, 1990.

SOUZA, A. da S.; COSTA, M. A. P. de; SANTOS-SEREJO, J. A. dos; JUNGHANS, T. G.; SOUZA, F. V. D. Introdução à cultura de tecidos de plantas. In: SOUZA, A. da S.; JUNGHANS, T. G. (Eds.). **Introdução à cultura de tecidos de plantas**. Cruz das Almas, BA: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2006a. p. 11-37.

SOUZA, A. da S.; JUNGHANS, T. G.; JUNGHANS, D. T.; MENDES, R. A.; MONTARROYOS, A. V. V. Cultura de tecidos em mandioca: técnicas e aplicações. In: SOUZA, L. da S.; FARIAS, A. R. N.; MATTOS, P. L. P de; FUKUDA, W. M. G. (Eds.). **Aspectos socioeconômicos e agronômicos da mandioca**. Cruz das Almas - BA: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2006b. p. 364-432.

SOUZA, A. da S.; SOUZA, F. V. D.; SANTOS-SEREJO, J. A. dos; JUNGHANS, T. G.; SILVA NETO, H. P. Micropropagação da mandioca mediante ápices caulinares e segmentos nodais. **Circular Técnica 88**. Embrapa. Cruz das Almas, 11 p. 2008.

SOUZA, A. da S.; JUNGHANS, T.G.; FUKUDA, W. M. G. Técnicas e aplicações da cultura de tecidos em mandioca. In: CEREDA, M. P. (Coord.). **Agricultura: tuberosas amiláceas Latino Americanas**. 1 ed. São Paulo: Fundação Cargill, 2002. p.118-178. (Série Culturas de Tuberosas Amiláceas Latino Americanas, v. 2).

SSEMAKULA, G. N.; KASULE, S. Manipulation of cassava flour, starch, paper bridges and wheat flour as alternatives to agar in cassava initiation culture. In: CARVALHO, L. J. C. B.; THRO, A. M.; VILARINHOS, A. D. (Ed.). INTERNATIONAL SCIENTIFIC MEETING CASSAVA BIOTECHNOLOGY, 4., 2000, Salvador. **Proceedings...** Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2000. p. 420-424.

ZOK, S.; NYOCHEMBENG, L. M.; TAMBONG, J.; WUTOH, J. G. Rapid seedstock multiplication of improved clones of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) through shoot tip culture in Cameroon. In: ROCA, W. M.; THRO, A. M. (Ed.). INTERNATIONAL SCIENTIFIC MEETING OF THE CASSAVA BIOTECHNOLOGY NETWORK, 1., 1992, Cartagena. **Proceedings...** Cali: CIAT, 1993. p. 96-104. (CIAT. Working Document, 123).

## **CAPÍTULO 2**

### **EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM EXPLANTES ORIUNDOS DE PLANTAS DE MANDIOCA CULTIVADAS *IN VITRO***

## EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM EXPLANTES ORIUNDOS DE PLANTAS DE MANDIOCA CULTIVADAS *IN VITRO*

Ádila Melo Vidal  
Maria Angélica Pereira de Carvalho Costa  
Fernanda Vidigal Duarte Souza

### RESUMO

A embriogênese somática pode ser um interessante sistema de regeneração *in vitro* de plantas de mandioca. O trabalho teve como objetivo estudar a embriogênese somática e a regeneração de plantas da variedade Cigana Preta a partir de ápices caulinares e folhas jovens obtidos de plantas cultivadas *in vitro*. Os explantes foram cultivados em meio MS com 2,4-D ou picloram, ambos nas concentrações 8 e 12 mg L<sup>-1</sup>. Dois meios de cultura foram testados para o desenvolvimento dos embriões. Embriões, em estágio cotiledonar foram incubados em meio de germinação constituído de sais e vitaminas do MS, 2 µM de sulfato de cobre, 2,4 g L<sup>-1</sup> de Phytigel<sup>®</sup>, e 1,77 µM de BAP. A maior frequência de calos e números de embriões por explantes foi obtida com 8 mg L<sup>-1</sup> da auxina picloram. As plantas regeneradas apresentaram desenvolvimento normal e num período mínimo de quatro semanas foram subcultivadas para meio específico de micropropagação apresentando comportamento normal.

**Palavras-chave:** *Manihot esculenta*, regeneração, auxina.

## SOMATIC EMBRYOGENESIS IN EXPLANTS FROM *IN VITRO* PLANTS OF CASSAVA

Ádila Melo Vidal  
Maria Angélica Pereira de Carvalho Costa  
Fernanda Vidigal Duarte Souza

### ABSTRACT

The somatic embryogenesis can be an interesting *in vitro* plant regeneration system for cassava. This work aimed to study somatic embryogenesis and *in vitro* plant regeneration of Cigana Preta variety from shoot tip and young leaves from *in vitro* plants. The explants were cultivated in MS media with 8,0 and 12,0 mg L<sup>-1</sup> of 2,4-D or picloram. Two media cultures were tested to the embryos development. Embryos in cotyledonal stage were inoculated in germination media constituted of vitamins and salts of MS, 2 µM of copper sulfate, 2,4 g L<sup>-1</sup> of Phytigel®, and 1,77 µM of BAP. The major frequency of callus and number of embryos per explant was obtained with 8 mg L<sup>-1</sup> of auxin picloram. The regenerated plants presented normal development and in a minimum period of four weeks were cultivated in specific media to Micropropagation showing a normal behavior in this media.

**Key-words:** *Manihot esculenta*, regeneration, auxina.



## INTRODUÇÃO

Cultivada prioritariamente por agricultores de baixa renda para fins de exploração e consumo, a mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) se destaca como fonte de renda e no desenvolvimento social e econômico, principalmente nas regiões Norte e Nordeste do Brasil (FUKUDA, 2003). Contribui principalmente como fonte de matéria-prima para indústrias locais, na produção de farinhas, amidos, rações para animais, dentre outros produtos (NWEKE et al., 2002 citado por HANKOUA et al., 2005). Devido à sua robustez e tolerância às condições ambientais adversas, como a infertilidade dos solos ácidos, a espécie é muitas vezes cultivada como cultura de subsistência em solos marginais (ATEHNKENG et al., 2006).

Entretanto, apesar de sua importância, a mandioca apresenta algumas limitações, tais como baixo teor de proteína, elevado teor de glicosídeos cianogênicos em suas raízes, deterioração pós colheita (KERESZTESSY et al., 2001; IGLESIAS et al., 2002), dificuldade de aquisição e má qualidade das sementes, assim como susceptibilidade às pragas e doenças (MATTOS et al., 2002). Em vista disso, juntamente com melhorias no sistema de cultivo, o melhoramento genético é de extrema relevância para aumentar a qualidade do produto obtido, seja ele voltado para alimentação humana, animal ou para indústria. A busca por novas variedades que tenham características superiores de interesse e que correspondam às demandas atuais é premente.

O melhoramento convencional da mandioca, entretanto é complexo e lento, ainda que tenha logrado resultados de impacto econômico significativo (FUKUDA; IGLESIAS, 2006). Por outro lado, embora a biotecnologia ainda não tenha sido amplamente desenvolvida e aplicada no melhoramento da mandioca, pode contribuir de forma significativa para o melhoramento genético da espécie, uma vez que possui ferramentas que podem aumentar a eficiência dos resultados e acelerar a geração de uma nova variedade.

A engenharia genética de plantas tem considerável potencial para melhorar a resistência, assim como outras características agrônômicas desejáveis à mandioca. Um pré-requisito, entretanto, para o uso de biotecnologias é a disponibilidade de um eficiente sistema de regeneração de plantas *in vitro* (KONAN et al., 1997). A embriogênese somática é altamente eficiente como

processo de regeneração e micropropagação porque permite altas taxas de multiplicação e resulta em embriões individualizados, que se desenvolvem em plantas (IBARAKI; MURATA, 2001).

Apesar de uma série de limitações, essa técnica tem sido amplamente citada na literatura como método de regeneração em mandioca (STAMP; HENSHAW, 1982; RAEMAKERS et al., 1993; WOODWARD; PUONTI-KAERLAS, 2001; GROLL et al., 2001, 2002; ATEHNKENG et al., 2006).

Dentre os fatores que devem ser considerados na embriogênese somática para essa espécie, destacam-se a fonte e o tipo de explante inicial, assim como a forte influência que o genótipo tem na resposta morfogenética (SZABADOS et al., 1987; SUDARMONOWATI; HENSHAW, 1993; PUONTI-KAERLAS, 1998) demandando constantes ajustes e adaptações dos protocolos existentes ou mesmo o desenvolvimento de novos protocolos.

Os explantes usados nos diversos estudos publicados vão desde folhas, ápices caulinares, raízes e outros segmentos retirados de plantas *in vitro* (RAEMAKERS et al., 1993; MEDERO et al., 2000), até meristemas retirados de plantas cultivadas em casa de vegetação (MROGINSKI; SCOCCHI, 1993) e campo (RAEMAKERS et al., 1993), ou de brotações de manivas (MEDERO et al., 2000). Entretanto, como é impossível padronizar o crescimento sob condições de campo, plantas cultivadas *in vitro* são preferidas como fonte de explantes foliares (SOUZA et al., 2002). Por outro lado, ápices caulinares, gemas laterais (SAELIM et al., 2006) e meristemas (VICTOR et al., 2000; ATENHNKENG et al., 2006), também podem ser utilizados para iniciar o cultivo *in vitro* visando a indução de embriões somáticos.

Para a indução de embriões somáticos em mandioca, geralmente utiliza-se o meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com diferentes concentrações de alguma auxina, destacando-se o uso do ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) e o ácido 4 amino-3,5,6-tricloropicolínico (picloram) (GROLL et al., 2001; DANSO; FORD-LLOYD, 2002; MEDINA et al., 2003; ATENHNKENG et al., 2006).

Após a obtenção de embriões somáticos nos meios de indução, estes são transferidos para meio de desenvolvimento, denominado meio de maturação, que pode estar sem reguladores de crescimento (MATHEWS et al., 1993) ou suplementado com alguma citocinina (JOSEPH et al., 2000).

Apesar do grande número de embriões formados, a conversão em plantas é baixa. Os requisitos básicos para aumentar a eficiência de regeneração se constituem, principalmente, na obtenção de embriões somáticos morfológicamente normais, no equilíbrio entre o desenvolvimento do sistema radicular e caulinar, bem como na composição do meio de cultura. Além do que, o sistema de regeneração deve ser otimizado para cada espécie ou cultivar utilizado, pois suas características genéticas determinam respostas distintas quando submetidos às mesmas condições ou cultivos.

Finalmente a variedade Cigana Preta, amplamente cultivada no Recôncavo Baiano, apresenta alto teor de matéria seca, resistência à podridão das raízes e à seca, se constitui numa variedade importante para o Nordeste do Brasil.

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a indução da embriogênese somática e a regeneração de plantas da variedade Cigana Preta a partir de ápices caulinares e folhas jovens obtidos de plantas cultivadas *in vitro*.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, em Cruz das Almas – BA.

### **Material vegetal e condições de cultivo**

Para este trabalho utilizou-se a variedade Cigana Preta, obtida do Banco Ativo de Germoplasma de Mandioca da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical. Manivas provenientes de plantas adultas foram plantadas em vasos de polietileno contendo uma mistura do substrato Plantmax<sup>®</sup> + fibra de coco (2:1 v/v), em casa de vegetação. Aos 21 dias de cultivo, os brotos emergidos das manivas, após alcançarem 2,0 cm, foram destacados, levados ao laboratório e submetidos a um processo de desinfestação em álcool a 50% por três minutos e hipoclorito de sódio a 0,25% por 3 minutos, seguido da tripla lavagem em água destilada e autoclavada.

Após o processo de desinfestação em câmara de fluxo laminar, realizou-se a retirada dos meristemas, com o auxílio de uma lupa, pinça e lâmina de bisturi. Os meristemas foram inoculados em meio contendo os sais do MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com 1 mg L<sup>-1</sup> de tiamina, 100 mg L<sup>-1</sup> de inositol, 0,02 mg L<sup>-1</sup> de ANA (ácido naftalenoacético), 0,04 mg L<sup>-1</sup> de BAP (benzilaminopurina), 0,05 mg L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub> (ácido giberélico), 20 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 2,4 g L<sup>-1</sup> de Phytigel<sup>®</sup>. O meio foi ajustado a pH 5,78 e posteriormente autoclavado à temperatura de 121°C durante 20 minutos. O ambiente de crescimento dos explantes foi mantido sob temperatura de 27 ± 1°C, fotoperíodo de 16 horas e densidade de fluxo de fótons 30 μmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>.

Após o estabelecimento das plantas, que compreendeu um período de quarenta 40 dias, os segmentos nodais foram transferidos para meio de multiplicação, composto por 1/3 dos macro e micronutrientes do MS, suplementado com 0,35 mg L<sup>-1</sup> de tiamina, 35 mg L<sup>-1</sup> de inositol, 0,01 mg L<sup>-1</sup> de ANA, 0,01 mg L<sup>-1</sup> de BAP, 0,01 mg L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub>, 20 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 2,4 g L<sup>-1</sup> de Phytigel<sup>®</sup>. O pH do meio e as condições de cultivo foram as mesmas da cultura acima descritas.

As plantas foram multiplicadas por quatro subcultivos em intervalo de 45 dias, compreendendo um período de 180 dias. Das plantas regeneradas foram retirados os ápices caulinares e folhas jovens ainda não expandidas que serviram de fonte de explantes para o experimento de indução de calos embriogênicos.

### **Indução de embriogênese somática**

Ápices caulinares e folhas jovens de plantas cultivadas *in vitro* foram isolados sob condições assépticas e transferidos para placas de Petri (100 x 20 mm) contendo 40 mL do meio MS, 20 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 0,5 mg L<sup>-1</sup> de sulfato de cobre, 2,4 g L<sup>-1</sup> de Phytigel<sup>®</sup>, suplementado com os reguladores vegetais 2,4-D ou picloram, ambos nas concentrações 8 e 12 mg L<sup>-1</sup> e pH ajustado para 5,78.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2 (explantes) x 2 (reguladores) x 2 (concentrações) totalizando 8 tratamentos, com cinco repetições, onde cada repetição se constituiu de uma placa contendo doze explantes.

Os explantes foram mantidos em sala escura sob temperatura de 27°C, por um período de 30 dias, quando foram avaliados, considerando-se a frequência de explantes que formaram calo (%). Aos 55 e 75 dias de cultivo, quando se registrou a formação de embriões, as seguintes variáveis foram consideradas: a) tipo de calo: (CC) calos compactos (células firmemente ligadas), (SC) semicompactos (células moderadamente ligadas), (CF) friáveis (células frouxamente ligadas); b) frequência de calos que formaram embriões (%); c) número médio de embriões por calo e d) frequência de embriões em diferentes estádios de histodiferenciação (%). Realizou-se transformação dos dados em arc sen  $\sqrt{(x/100)}$  para as variáveis tipo de calo, frequência de calos que formaram embriões e frequência de embriões em diferentes estádios de histodiferenciação, e para número médio de embriões por calo, os dados foram transformados em  $\sqrt{(x + 0,5)}$ . Os dados foram analisados pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

### **Desenvolvimento e germinação dos embriões somáticos**

Com o objetivo de obter plantas, fragmentos de calo provenientes do meio de indução, contendo embriões em diferentes estádios de histodiferenciação, foram transferidos para placas de Petri contendo 40 mL de meio de desenvolvimento. Foram avaliados dois meios: D1 - sais do MS, 20 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 2 µM de sulfato de cobre, 0,2 µM de BAP e 2,0 g L<sup>-1</sup> de Phytigel® (JOSEPH et al., 2004); e o D2 - sais do MS, 20 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 2 µM de sulfato de cobre, 0,44 µM de BAP e 6,0 g L<sup>-1</sup> de agarose (LI et al., 1998). O número de fragmentos por placa variou de 2 a 8 e as mesmas foram mantidas em sala de crescimento a 27±1°C, fotoperíodo de 16 horas e densidade de fluxo de fótons 30 µmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>, por um período de 2 a 10 semanas.

Após o desenvolvimento dos embriões em estágio cotiledonar (2 a 10 semanas), realizou-se a transferência para tubos de ensaio contendo 10 mL de meio de germinação constituído de sais e vitaminas do MS, 20 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 2 µM de sulfato de cobre, suplementado com 1,77 µM de BAP e solidificado com 2,4 g L<sup>-1</sup> de Phytigel® (Zhang et al., 2000), permanecendo nesse meio por 4 semanas ou à medida que as plântulas se desenvolviam. As condições de incubação foram de 27±1°C, fotoperíodo de 16 horas e densidade de fluxo de fótons 30 µmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>. O número de repetições variou de três a nove. Em seguida,

as plantas obtidas foram transferidas para meio composto por 1/3 dos macro e micronutrientes do MS, suplementado com 0,35 mg L<sup>-1</sup> de tiamina, 35 mg L<sup>-1</sup> de inositol, 0,01 mg L<sup>-1</sup> de ANA, 0,01 mg L<sup>-1</sup> de BAP, 0,01 mg L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub>, 20 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 2,4 g L<sup>-1</sup> de Phytigel<sup>®</sup>, para crescimento e posterior multiplicação.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Aos 30 dias após a inoculação, 90% dos explantes, independente do tipo, ápice ou folha jovem, formaram calos. Nesse período inicial, entretanto, não se observou a presença de embriões em nenhum dos tratamentos. Aos 55 dias de cultivo, os calos formados já apresentavam aspectos distintos em ambos os tipos de explantes, não tendo-se registrado a formação de calos compactos. Formaram-se calos friáveis e calos semicompactos, visto que não apresentavam uma estrutura coesa de células, mas sim um aspecto mucilaginoso de coloração esbranquiçada. Em alguns explantes formaram-se os dois tipos de calos, o que não é incomum em muitas espécies. Na Tabela 1 é possível observar que a frequência de explantes com os diferentes tipos de calos, independente dos fatores considerados, seja a fonte de explantes, os reguladores vegetais ou mesmo as concentrações, a frequência na formação de calos friáveis foi destacadamente menor, quando comparada com a formação de calos semicompactos. Em milho, calos altamente embriogênicos eram de estrutura friável, ainda que calos de aparência mais compacta apresentaram igualmente regiões embriogênicas, porém em menores proporções (SANTOS-SEREJO; AGUIAR-PERECIN, 2000). A textura e morfologia do calo é influenciada pelas variações nos constituintes do meio nutritivo, que produz calos macios, friáveis e úmidos, em meio de alta concentração de auxina e baixa de citocinina e se a relação é inversa, produz calos de tecido compacto secos e com células pequenas (BRUNETTA et al., 2006). Nesse trabalho a maior concentração de auxina utilizada proporcionou uma frequência mais elevada de explantes com calos semicompactos.

**Tabela 1.** Frequência (%) de calo friável (CF) e calo semicompacto (SC), isolados ou combinados (CF/SC), formados em explantes de mandioca cultivados em meio contendo diferentes concentrações e auxinas após 55 dias de indução.

	<b>CF</b>	<b>SC</b>	<b>CF/SC</b>
<b>Explante</b>			
Ápice	8,75	40,83	50,42
Folha	12,72	39,19	48,08
<b>Auxina</b>			
2,4-D	16,66	37,27	46,04
picloram	5,00	42,65	52,34
<b>Concentração de Auxina</b>			
8 mg L <sup>-1</sup>	12,28	33,93	53,78
12 mg L <sup>-1</sup>	9,16	45,84	45,00

A indução de embriões somáticos foi influenciada pelo tipo e concentração dos reguladores vegetais utilizados. Houve diferença significativa entre as auxinas quanto à presença de calos com embriões e número médio de embriões por explante, aos 55 e 75 dias de indução (Tabelas 2 e 3). Nesses dois períodos foram observados a presença de embriões nos calos formados em meios contendo ambos os reguladores, entretanto maior frequência de calos com embriões foi observada em presença de picloram no meio de cultura (Tabela 2). Vale destacar que os embriões formados originaram-se das regiões semicompactas dos calos, não tendo se observado formação de embriões em calos friáveis.

**Tabela 2.** Frequência (%) de calos que apresentaram desenvolvimento de embriões após 55 e 75 dias de cultivo.

<b>Fatores avaliados</b>	<b>55 dias</b>	<b>75 dias</b>
<b>Explante</b>		
Ápice	10,83a	12,49a
Folha	13,33a	13,74a
<b>Auxina</b>		
2,4-D	2,08b	3,33b
picloram	22,08a	22,91a
<b>Concentração de Auxina</b>		
8 mg L <sup>-1</sup>	15,83a	16,66a
12 mg L <sup>-1</sup>	8,33a	9,58a
<b>CV (%)</b>	<b>87,81</b>	<b>76,58</b>

Valores seguidos de mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% probabilidade.

Vários registros na literatura mostram que a ocorrência da embriogênese somática *in vitro* pode ser induzida pela manipulação de uma auxina forte no meio de cultura. Para muitas espécies, o 2,4-D parece ser esta auxina (LI et al., 1998; VAEZ, 2007), ainda que no presente trabalho os resultados com picloram tenham favorecido mais a formação de embriões. Estudos demonstram que o picloram é um dos reguladores de crescimento mais utilizados para induzir a embriogênese em mandioca (ATENHNKENG et al., 2006; ZHANG et al., 2000). Raemakers et al. (1993) e Hankoua et al. (2006) verificaram que a concentração de 12,0 mg L<sup>-1</sup> de picloram foi eficiente para induzir embriões somáticos, em algumas cultivares africanas de mandioca. No entanto, Atenhkneng et al. (2006), trabalhando com diferentes variedades de mandioca da África, obtiveram resultados semelhantes quanto à resposta embriogênica, ao utilizar as duas concentrações de picloram (8,0 ou 12,0 mg L<sup>-1</sup>). Neste caso, o autor optou pela concentração menor, por ser mais econômico.

Em relação ao número de embriões por explante, além das diferenças significativas quanto ao uso das auxinas, houve também diferença quanto às concentrações, onde a utilização de 8,0 mg L<sup>-1</sup> no meio de cultura, contribuiu com o maior número de embriões formados, em ambos os períodos de avaliação (55 e 75 dias). Neste caso, o uso do picloram favoreceu a indução de embriões, pois a produção destes foi constatada em maior quantidade nas duas concentrações utilizadas, quando comparada ao 2,4-D (Tabela 3).



**Tabela 3.** Número médio de embriões presentes em calos provenientes de explantes de mandioca aos 55 e 75 dias de indução.

<b>Explante</b>	<b>55 dias</b>	<b>75 dias</b>
Ápice	0,62a	1,04a
Folha	1,03 a	1,21a
<b>Auxina</b>		
2,4-D	0,07b	0,13b
picloram	1,54a	2,07a
<b>Concentrações</b>		
8 mg L <sup>-1</sup>	1,08a	1,60a
12 mg L <sup>-1</sup>	0,57b	0,67b
<b>CV (%)</b>	69,50	76,76

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

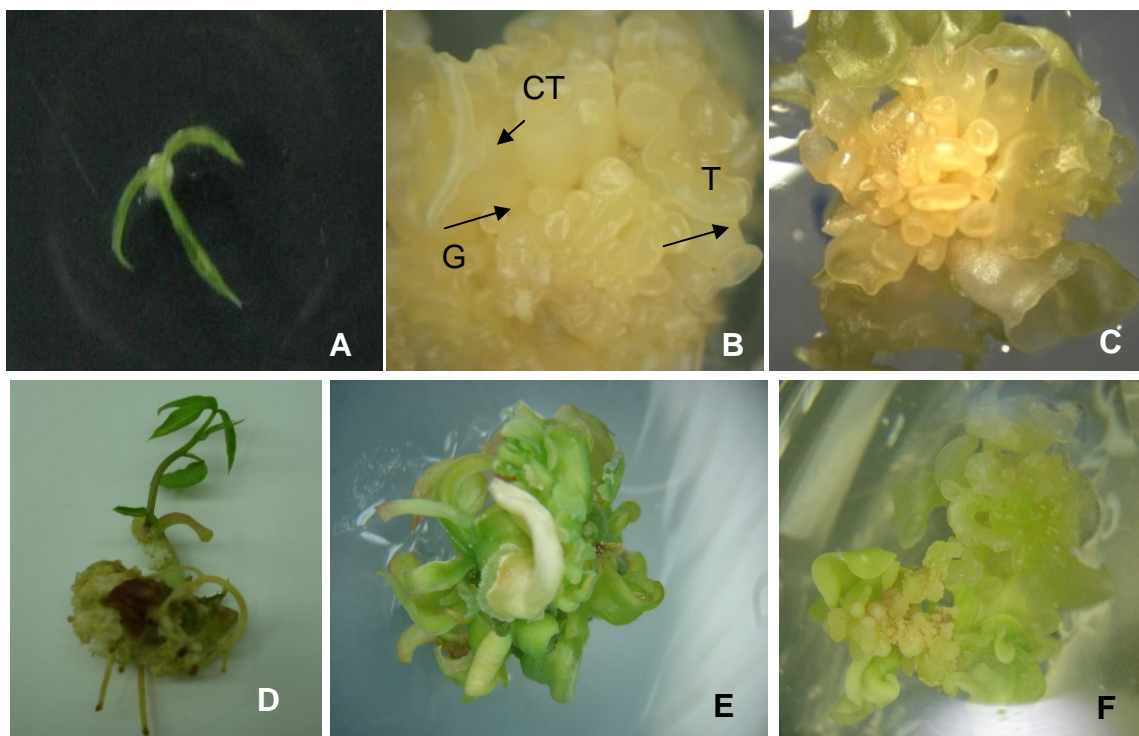
Observou-se a formação de embriões de forma assincronizada, apresentando os estádios de histodiferenciação, globular, torpedo e cotiledonar, no mesmo calo (Figura 1B), ainda no meio de indução. Como mostra a Tabela 4, uma frequência significativa de embriões em fase de torpedo foi registrada tanto aos 55 quanto aos 75 dias de cultivo, ainda que os resultados nos meios com 2,4-D sejam significativamente menores. A maior frequência de embriões em fase cotiledonar foi observada aos 75 dias, quando não se registrou mais nenhum embrião em fase globular, o que é previsível por se constituir no estágio inicial da histodiferenciação. Registrou-se também embriões com cotilédones fusionados (Figura 1C), o que é indesejável, visto que esse tipo de embrião não se desenvolve normalmente. Alguns desses embriões, ao serem transferidos para o meio de desenvolvimento, efetivamente se desenvolveram de maneira anormal, apresentando uma morfologia alterada, principalmente em relação à parte aérea, onde se via uma estrutura folhosa e sem definição, como pode ser observado nas Figuras 1E e 1F. Essas estruturas não se desenvolveram em plantas.

**Tabela 4.** Tipos de embriões (%) formados em calos provenientes de explantes de mandioca cultivados em meio sob diferentes concentrações e auxinas após 55 e 75 dias de indução.

Explante	55 dias			75 dias		
	Globular	Torpedo	Cotiledonar	Globular	Torpedo	Cotiledonar
Ápice	2,52a	37,36a	5,11a	-	45,78a	14,22a
Folha	0,55a	56,75a	0,58a	-	56,01a	7,14b
Auxina						
2,4-D	0,00b	21,05b	0,00b	-	35,34b	1,50b
picloram	3,05a	71,28a	5,66a	-	65,43a	19,57a
Concentrações						
8 mg L <sup>-1</sup>	3,21a	52,81a	1,87a	-	50,80a	12,36a
12 mg L <sup>-1</sup>	0,00b	41,11a	3,89a	-	50,74a	9,26a

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

Os calos contendo embriões foram fragmentados e transferidos após 75 dias, para dois meios distintos (D1 e D2). Os fragmentos de calo provenientes dos tratamentos que continham 2,4-D foram transferidos apenas para o meio D1, devido ao número muito reduzido de embriões, enquanto aqueles provenientes dos tratamentos contendo picloram, por apresentar maior quantidade de embriões, foram transferidos para os dois meios.



**Figura 1.** Embriogênese somática e regeneração de plantas de mandioca: A - Explante foliar aos 30 dias em meio de indução ( $8,0 \text{ mg L}^{-1}$  de picloram); B - Embriões somáticos em diferentes estádios observados em um mesmo calo (G- globular, T- torpedo, CT - cotiledonar) aos 75 dias em meio de indução; C - Embriões somáticos aos 30 dias em meio D2; D - Plantas formadas em meio de germinação; E e F- Embriões com desenvolvimento anormal em meio de desenvolvimento.

Durante o período de cultivo em meio de desenvolvimento, pôde-se observar que todos os embriões apresentaram crescimento, principalmente, no que se refere ao desenvolvimento da parte aérea, em ambos os meios de cultura, logo na primeira semana. Entretanto, os embriões provenientes de explantes foliares cultivados em ambas as concentrações de picloram desenvolveram-se mais rapidamente e foram transferidos para meio de germinação em um período menor (duas semanas) quando cultivados no meio D2. Por outro lado, os embriões cultivados no meio D1, independentes da procedência, levaram em torno de dez semanas para serem transferidos para o meio de germinação.

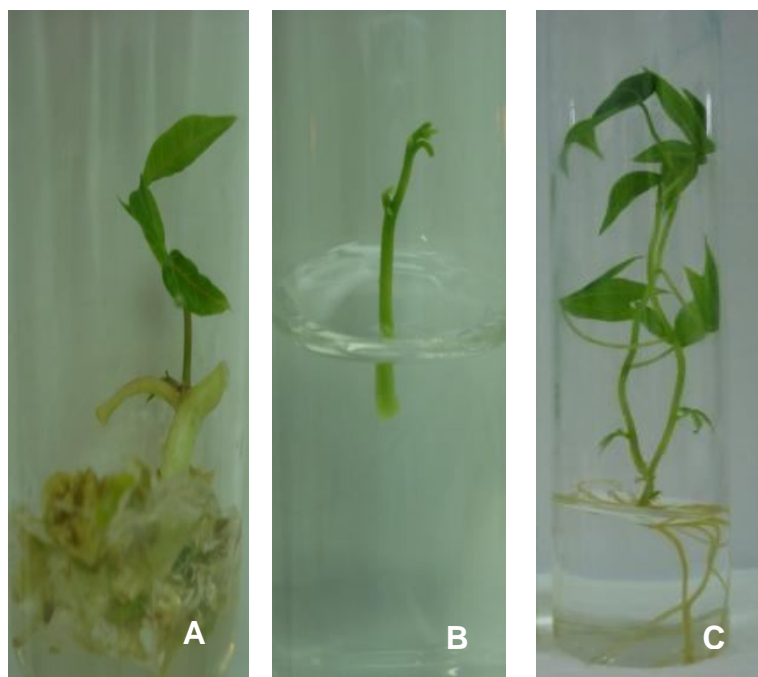
A germinação só foi observada em embriões oriundos do meio D2 a partir de ambos os explantes, ápices ou folhas, quando cultivados em picloram. O melhor resultado, entretanto, foi obtido com embriões oriundos de explantes

foliares cultivados no meio de indução com 8,0 mg L<sup>-1</sup> de picloram e desenvolvidos em meio D2, como pode ser observado na Tabela 5. À medida que as plântulas se desenvolveram, foram sendo transferidas, para o meio convencional de multiplicação de mandioca (SOUZA et al., 2008), como pode ser visto nas Figuras 2A e 2B.

As plântulas transferidas para esse meio se desenvolveram normalmente e de forma homogênea, enraizando e alongando de forma satisfatória (Figura 2C). Essas plantas apresentavam todas as características necessárias para entrarem na rota de multiplicação por meio do seccionamento das mesmas e obtenção de microestacas, que são subcultivadas para proceder à micropropagação da variedade.

**Tabela 5.** Efeito dos tratamentos de indução e desenvolvimento no número de plantas regeneradas a partir de embriões somáticos.

Explante de Origem	Meio de cultivo			
	Indução picloram (mg L <sup>-1</sup> )	Desenvolvimento	Germinação	Nº de plantas regeneradas
Ápice	8,0	D1	MS + 1,77 µM de BAP	1
Ápice	12,0	D1		0
Ápice	8,0	D2		20
Ápice	12,0	D2		0
Folha	8,0	D2		35
Folha	12,0	D2		7



**Figura 2.** A- Planta em meio de germinação; B- Microestaca recém cultivada em meio de multiplicação; C- Planta totalmente desenvolvida em meio de multiplicação.

Neste estudo, a indução de embriões somáticos foi influenciada pelo tipo e concentração de auxina utilizada, onde o picloram mostrou resultados satisfatórios na frequência de calos com embriões e no número de embriões somáticos obtidos por explante, sobretudo quando utilizado na concentração  $8,0 \text{ mg L}^{-1}$ , em relação à concentração  $12,0 \text{ mg L}^{-1}$ .

O sucesso da regeneração *in vitro* também depende da fonte de explante utilizada na embriogênese, pois a capacidade de regeneração depende da maturidade, do estágio fisiológico e do tecido utilizado, dando-se preferência por tecidos jovens e em crescimento, ao invés de tecidos adultos (ANDRADE, 2002). Este fato ocorre, porque os tecidos adultos apresentam-se mais diferenciados e possuem maior determinação celular (RAEMAKERS et al., 1995). Dos trabalhos publicados, muitos avaliaram o efeito de diferentes explantes (MEDERO et al., 2000; WOODWARD; PUONTI-KAERLAS, 2001; MEDINA et al., 2003;) na embriogênese somática em diversas cultivares de mandioca, observando diferentes comportamentos.

No presente trabalho, apesar de não haver diferença significativa entre os explantes, principalmente na fase inicial de obtenção dos embriões, os explantes

foliares mostraram-se mais responsivos nas fases de maturação com conseqüente regeneração em plantas. Esses resultados diferem dos obtidos por Machado (2004), que ao trabalhar com as cultivares Água Morna, Amansa Burro, Aparecida, Mata Fome, Milagrosa, Rosa, Rosinha e Sacaí, constatou que ápices caulinares são explantes mais adequados para a indução de embriogênese somática, demonstrando que a mandioca apresenta forte dependência do genótipo para expressar o potencial embriogênico (PUONTI-KAERLAS, 1998).

Nesse trabalho, nem sempre a formação de embriões resultou na regeneração de plantas. Muitos embriões apresentaram alterações morfológicas, com cotilédones fusionados, que impediram a germinação. A causa pode ter sido o prolongado período que os embriões permaneceram em meio de indução. Guerra et al. (1999) citam que o efeito das auxinas como indutoras da embriogênese somática pode também acarretar a formação de embriões anômalos quando estes passam por prolongados períodos em meios suplementados com estas substâncias.

Hipóteses sugerem que na presença contínua de auxina, as massas pró-embriogênicas sintetizam os produtos gênicos necessários para iniciar a embriogênese até o estágio globular e inibir a sua diferenciação para os demais estádios de histodiferenciação. Por esta razão, a remoção de auxina do meio de cultura resulta na inativação dos genes repressores e o programa embriogênico pode prosseguir. Deste modo, o papel da auxina é alterado e o embrião passa a sintetizar sua própria auxina, possivelmente por uma via alternativa (ZIMMERMAN, 1993).

Por outro lado, segundo Raemakers et al. (1995), o desenvolvimento de embriões somáticos mal formados e/ou a formação de folhas carnosas com caules fasciados pode ser conseqüência de maturação insuficiente. Para que ocorra conversão, os embriões somáticos têm de realizar uma série de eventos: germinação (emissão da radícula), crescimento e desenvolvimento do sistema radicular, produção de, no mínimo, duas folhas verdadeiras, conexão direta da raiz com a parte aérea e produção de uma planta verde com fenótipo normal (REDENBAUGH et al., 1988).

Neste caso, o desenvolvimento dos embriões com conseqüente regeneração em plantas parece ter sido favorecido pelo uso da citocinina, especificamente o BAP (1,77  $\mu$ M suplementando o meio MS), onde as plantas

regeneradas eram normais com presença de raiz e parte aérea bem desenvolvidas. Li et al. (1998) e Zhang et al. (2000) obtiveram brotos de mandioca, após passagem dos embriões em meio com esta mesma concentração de BAP.

Os resultados encontrados nesse trabalho mostrou que é possível regenerar plantas de mandioca por embriogênese somática na variedade Cigana Preta. Entretanto, estudos futuros tais como a adequação do período dos explantes em meio de indução em presença de auxina, modificação das condições para promover o desenvolvimento dos embriões somáticos, bem como a manipulação de reguladores vegetais no meio de cultura poderão contribuir para evitar a formação dos embriões mal formados em mandioca, o que poderá aumentar a eficiência de regeneração de plantas.

## CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos nas condições experimentais em que este trabalho foi estabelecido, pode-se concluir que:

Ficou demonstrado o potencial embriogênico da variedade Cigana Preta.

A regeneração de plantas via embriogênese somática foi mais eficiente a partir do uso de folhas jovens como explante de partida.

A maior frequência de calos e números de embriões por calos foi obtida quando se utilizou  $8,0 \text{ mg L}^{-1}$  da auxina picloram.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, S. R. M. de. Princípios da cultura de tecidos vegetais. **Documentos 58**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 16 p. 2002.

ATEHNKENG, J.; ADETIMIRIN, V. O.; NG, S. Y. C. Exploring the African cassava (*Manihot esculenta* Crantz) germplasm for somatic embryogenic competence. **African Journal of Biotechnology**, v. 5, n. 14, p. 1324-1329, 2006.

BRUNETTA, J. M. F. C.; OTONI, W. C.; PINHEIRO, A. L.; FONSECA, E. de P. Calogênese *in vitro* em segmentos de epicótilo de mogno (*Swietenia Macrophylla* King) com uso de 6-benzilaminopurina e ácido  $\alpha$ -naftalenoacético. **Scienti Florestalis**, n. 71, p. 19-24, 2006.

DANSO, K. E.; FORD-LLOYD, B. V. Induction of high-frequency somatic embryos in cassava for cryopreservation. **Plant Cell Reports**, v. 21, p. 226-232, 2002.

FUKUDA, C. Mandioca, raiz de respeito. **Agroanalysis**, v. 22, n. 10, p. 43-46, 2003.

FUKUDA, W. M. G.; IGLESIAS, C. Recursos genéticos. In: SOUZA, L. da S.; FARIAS, A. R. N.; MATTOS, P. L. P. de; FUKUDA, W. M. G. (Ed.). **Aspectos socioeconômicos e agronômicos da mandioca**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2006. Cap.12, p. 301-323.

GROLL, J.; MYCOCK, D. J.; GRAY, V. M. Effect of medium salt concentration on differentiation and maturation of somatic embryos of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Annals of Botany**, v. 89, p. 645-648, 2002.

GROLL, J.; MYCOCK, D. J.; GRAY, V. M.; LAMINSKI, S. Secondary somatic embryogenesis of cassava on picloram supplemented media. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 65, p. 201-210, 2001.

GUERRA, M. P.; TORRES, A. C.; TEIXEIRA, J. B. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI; EMBRAPA-CNPQ, 1999. v. 2, p. 533-568.

HANKOUA, B. B.; NG, S. Y. C.; FAWOLE, J.; Puonti-KAERLAS, J.; Pillay, M.; DIXON, A. G. O. Regeneration of a wide range of African cassava genotypes via shoot organogenesis from cotyledons of maturing somatic embryos and conformity of the field-established regenerants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 82, p. 221-231, 2005.

HANKOUA, B. B.; TAYLOR, N. J.; NG, S. Y. C.; FAWOLE, I.; PUONTI-KAERLAS, J.; PADMANABHAN, C.; YADAV, J. S.; FAUQUET, C. M.; DIXON, A. G. O.; FONDONG, V. N. Production of the first transgenic cassava in Africa via direct shoot organogenesis from friable embryogenic calli and germination of maturing somatic embryos. **African Journal of Biotechnology**, v. 5, n. 19, p. 1700-1712, 2006.

IBARAKI, Y.; MURATA, K. Automation of somatic embryo production. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 65, p. 179-199, 2001.

IGLESIAS, C. A.; SANCHEZ, T.; YEOH, H. H. Cyanogens and linamarase activities in storage roots of cassava plants from breeding program. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 15, p. 379-387, 2002.

JOSEPH, R.; YEOH, H-H.; LOH, C-S. Induced mutations in cassava using somatic embryos and the identification of mutant plants with altered starch yield and composition. **Plant Cell Reports**, v. 23, p. 91-98, 2004.

JOSEPH, T.; YEOH, H. H.; LOH, C. S. Somatic embryogenesis, plant regeneration and cyanogenesis in *Manihot glaziovii* Muell. Arg. (ceara rubber). **Plant Cell Reports**, v. 19, p. 535-538, 2000.



KERESZTESSY, Z.; BROWN, K.; DUNN, M. A.; HUGHES, M. A. Identification of essential active-site residues in the cyanogenic  $\beta$  glucosidase (linamarase) from cassava (*Manihot esculenta* Crantz) by site-directed mutagenesis. **Biochemical Journal**, v. 353, p. 199-205, 2001.

KONAN, N. K.; SCHÖPKE, C.; CÁRCAMO, R.; BEACHY, R. N.; FAUQUET, C. An efficient mass propagation system for cassava (*Manihot esculenta* Crantz) based on nodal explants and axillary bud-derived meristems. **Plant Cell Reports**, v. 16, p. 444-449, 1997.

LI, H-Q.; GUO, J. Y.; HUANG, Y. W.; LIANG, C. Y.; LIU, H. X.; POTRYKUS, I.; PUONTI-KAERLAS, J. Regeneration of cassava plants via shoot organogenesis. **Plant Cell Reports**, v. 17, p. 410-414, 1998.

MACHADO, T. F. **Regeneração *in vitro* e transformação genética de cultivares de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) do Nordeste brasileiro.** Fortaleza, 2004. 131p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Ceará.

MATHEWS, H.; SCHOPKE, C.; CARCAMO, R.; CHAVARRIAGA, FAUQUET, L.; BEACHY, R. N. Improvement of somatic embryogenesis recovery in cassava. **Plant Cell Reports**, v. 12, p. 328-333, 1993.

MATTOS, P. L. P.; GOMES, J. C.; FARIAS, A. R. N.; FUKUDA, C. Cultivo da mandioca nas regiões Norte e Nordeste do Brasil. In: CEREDA, M. P. (Coord.). **Agricultura: tuberosas amiláceas Latino Americanas**. 1 ed. São Paulo: Fundação Cargill, 2002. p. 274-301. (Série Culturas de Tuberosas Amiláceas Latino Americanas, v. 2).

MEDERO, V. R.; RODRÍGUEZ, S.; BORROTO, C.; GÓMEZ, R.; LÓPEZ, J.; GARCÍA, M.; VENTURA, J. de la C.; CABRERA, M.; TORRES, M.; ALVAREZ, M. Sistema para embriogénesis somática en clones cubanos de yuca (*Manihot esculenta* Crantz). In: CARVALHO, L.J.C.B.; THRO, A.M.; VILARINHOS, A.D. (Ed.). **INTERNATIONAL SCIENTIFIC MEETING CASSAVA BIOTECHNOLOGY**, 4., 2000, Salvador. **Proceedings**...Brasília: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro Nacional de Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2000. p. 408-419.

MEDINA, R. D.; FALOCI, M. M.; SOLÍS NEFFA, V.; MROGINSKI, L. A. Embriogénesis somática y regeneración de plantas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) de cultivares de interés para Argentina. **Revista de Investigaciones Agropecuarias**, v. 32, n. 3, p. 143-160, 2003.

MROGINSKI, L. A.; SCOCCHI, A. M. Somatic embryogenesis of argentine cassava varieties. In: ROCA, W. M.; THRO, A. M. (Ed.). **INTERNATIONAL SCIENTIFIC MEETING OF THE CASSAVA BIOTECHNOLOGY NETWORK**, 1., 1992, Cartagena. **Proceedings**...Cali: Centro Internacional de Agricultura Tropical, 1993. p. 175-179. (Working Document, 123).

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

PUONTI-KAERLAS, J. Cassava biotechnology. In: TOMBS, M. P. (Ed.). **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**. Hants, UK: Intercept Ltd., 1998.

RAEMAKERS, C. J. J. M.; AMATI, M.; STARITSKY, G.; JACOBSEN, E.; VISSER, R. G. F. Cyclic somatic embryogenesis and plant regeneration in cassava. **Annals of Botany**, London, v. 71, n. 4, p. 289-294, 1993.

RAEMAKERS, C. J. J. M.; JACOBSEN, E.; VISSER, R. G. F. Secondary somatic embryogenesis and applications in plant breeding. **Euphytica**, Dordrecht, v. 81, p. 93-107, 1995.

REDENBAUGH, K.; FUJII, J. A.; SLADE, D. Encapsulated plant embryos, In: MIZRAHI, A. (Ed.) **Biotechnology in agriculture**. New York: Alan R. Liss, 1988. p. 225-248.

SAELIM, L.; PHANSIRI, S.; NETRPHAN, S.; SUKSANGPANOMRUNG, M.; NARANGAJAVANA, J. Optimization of *in vitro* cyclic somatic embryogenesis and regeneration of the asian cultivars of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) for Genetic Manipulation System. **Global Journal of Biotechnology & Biochemistry**, v.1, n. 1, p. 07-15, 2006.

SANTOS-SEREJO, J. dos S.; AGUIAR-PERECIN, M. L. R. de. Genótipos de milho com alta capacidade para embriogênese somática e regeneração de plantas obtidos a partir de calos. **Scientia Agricola**, v. 57, n. 4, p. 717-722, 2000.  
SOUZA, A. da S.; JUNGHANS, T. G.; FUKUDA, W. M. G. Técnicas e aplicações da cultura de tecidos em mandioca.. In: CEREDA, M. P. (Coord.). **Agricultura: tuberosas amiláceas Latino Americanas**. 1 ed. São Paulo: Fundação Cargill, 2002. p. 118-179. (Série Culturas de Tuberosas Amiláceas Latino Americanas, v. 2).

SOUZA, A. da S.; SOUZA, F. V. D.; SANTOS-SEREJO, J. A. dos; JUNGHANS, T. G.; SILVA NETO, H. P. da. Micropropagação da mandioca mediante ápices caulinares e segmentos nodais. **Circular Técnica 88**. Embrapa. Cruz das Almas, 11p. 2008.

STAMP, J. A.; HENSHAW, G. G. Somatic embryogenesis in cassava. **Zeitschrift für Pflanzenphysiologie**, Stuttgart, v. 105, p. 183-187, 1982.

SUDARMONOWATI, E.; HENSHAW, G. G. The induction of somatic embryogenesis of recalcitrant cassava cultivars using picloram and dicamba. In: THRO, A. M.; ROCA, W. (Eds.). INTERNATIONAL SCIENTIFIC MEETING, CASSAVA BIOTECHNOLOGY NETWORK, 1., 1993, Cartagena. **Proceedings...** Cartagena, Colombia: CIAT, 1993. (Working Document, 123).

SZABADOS, L.; HOYOS, R.; ROCA, W. *In vitro* somatic embryogenesis and plant regeneration of cassava. **Plant Cell Reports**, v. 6, p. 248-251, 1987.

VAEZ, J. R. **Avaliação de fatores associados à regeneração *in vitro* e transformação genética de cinco cultivares de mandioca**. Viçosa, 2007. 119 p. Tese (Doutorado) – Universidade federal de Viçosa.

VÍCTOR, R. M.; PADRÓN, E.; RODRÍGUEZ, S.; GÓMEZ, R.; GARCÍA, M.; LÓPEZ, J.; VENTURA, J.; MARÍNEZ, M.; ALVAREZ, M. Embriogénesis somática a partir de meristemas axilares en yuca. **Biotecnología Vegetal**, v. 1, p. 21-26, 2000.

WOODWARD, B.; PUONTI-KAERLAS, J. Somatic embryogenesis from floral tissue of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Euphytica**, v. 120, n. 1, p. 1-6, 2001.

ZHANG, P.; LEGRIS, G.; COULIN, P.; PUONTI-KAERLAS, J. Production of stably transformed cassava plants via particle bombardment. **Plant Cell Reports**, v. 19, p. 939-945, 2000.

ZIMMERMAN, J. L. Somatic Embryogenesis: a model for early development in higher plants. **The Plant Cell**, v. 5, p. 1411-1423, 1993.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A cultura da mandioca tem um importante papel no Brasil, tanto como fonte de energia para alimentação humana e animal, quanto como geradora de emprego e renda, notadamente nas áreas pobres da Região Norte e Nordeste. O seu cultivo apresenta grande relevância econômica como principal fonte de carboidratos para milhões de pessoas, essencialmente nos países mais pobres e em desenvolvimento. Entretanto, apesar de sua importância, a mandioca apresenta algumas limitações, tais como baixo teor de proteína, elevado teor de glicosídeos cianogênicos em suas raízes, deterioração pós colheita dificuldade de aquisição e má qualidade das sementes, assim como susceptibilidade à pragas e doenças. Em vista disso, juntamente com melhorias no sistema de cultivo, o melhoramento genético é de extrema relevância para aumentar a qualidade do produto obtido, seja ele voltado para alimentação humana, animal ou para indústria. A busca por novas variedades que tenham características superiores de interesse e que correspondam às demandas atuais é premente.

Como alternativa para tornar a mandioca mais competitiva, o uso do melhoramento genético convencional em associação com técnicas biotecnológicas é de fundamental importância. Dentre estas técnicas pode-se destacar a micropropagação, pois permite superar o problema da baixa taxa de multiplicação, uma vez que proporciona um número elevado de plantas num curto espaço de tempo, produzindo material propagativo sadio, prevenindo a disseminação de pragas e doenças de uma geração para outra, além de permitir o rápido acesso dos agricultores às variedades desenvolvidas pelos programas de melhoramento genético.

No entanto, assim como em outras espécies, a espécie *Manihot esculenta* Crantz apresenta uma grande variabilidade quanto à resposta morfogenética *in vitro*, em função do genótipo e do tipo de trabalho conduzido.

No presente trabalho, buscou-se avaliar a capacidade morfogenética de diferentes genótipos de mandioca, como apresentado no Capítulo 1, demonstrando que as variedades em estudo apresentaram comportamentos diferenciados quando submetidas às mesmas condições de cultivo. Observou-se que alguns genótipos ainda em fase de estabelecimento apresentaram pouca resposta às condições impostas, e sequer passaram para a fase posterior de multiplicação constituída por três subcultivos. Essa forte dependência do genótipo resulta em demandas nutricionais e condições de cultivo distintas necessitando de estudos específicos visando maximizar os processos de desenvolvimento *in vitro*.

Além da questão da dependência em relação ao genótipo, outro aspecto que pode ser considerado para a obtenção desses resultados foi o intervalo entre os subcultivos, que foi de 120 dias, e que parece ser demasiado longo e pode ter influenciado de forma negativa o desempenho das plantas. Dessa forma, um indicativo para a continuidade desses trabalhos e melhoria dos resultados, seria a adequação dos intervalos entre os subcultivos para essas variedades.

A abordagem feita no Capítulo 2 buscou o desenvolvimento de um protocolo de embriogênese somática, uma vez que se constitui em um importante sistema de regeneração *in vitro* de plantas e que pode subsidiar trabalhos de transformação genética, altamente dependentes de sistemas eficientes de regeneração da célula transformada e sua conversão em planta.

Com base nisso, realizou-se um estudo com a variedade Cigana Preta, utilizando-se dois tipos de explantes, ápice caulinar e folhas jovens provenientes de plantas previamente cultivadas *in vitro*, e inoculados em meio de cultura suplementado com diferentes auxinas e concentrações do 2,4-D e picloram. Nas condições estabelecidas, a folha jovem foi o explante que respondeu de forma mais eficiente em relação à indução de calos embriogênicos e à produção de embriões somáticos em comparação com o ápice caulinar. O picloram foi a auxina que promoveu os melhores resultados na fase de indução, promovendo, inclusive a maturação dos embriões nessa fase, não necessitando de um meio específico para essa etapa. Esses embriões germinaram bem e as plântulas transferidas para meio de desenvolvimento enraizaram e alongaram de forma satisfatória. Essas plantas apresentaram as características necessárias para entrarem na rota de multiplicação por meio do seccionamento das mesmas (microestacas),

evidenciando a possibilidade de se regenerar plantas da variedade Cigana Preta por embriogênese somática.

Entretanto, dos embriões obtidos nem todos regeneraram plantas, deixando evidente que o processo ainda tem limitações e que ajustes são necessários. A presença de embriões com cotilédones fusionados na fase de maturação foi um dos indicativos de algumas anormalidades na morfogênese dessas estruturas. Sendo assim, a adequação do tempo e da concentração de auxina utilizada na fase de indução, associada ao estágio de maturação do embrião, são essenciais para qualidade do embrião somático, visando a regeneração em plantas.

Finalmente, os resultados obtidos em ambos os trabalhos realizados mostram que é possível o uso dessas ferramentas como auxiliares no melhoramento genético da mandioca, ainda que estudos complementares sejam necessários para resultados mais eficientes a partir de uma melhor adequação das condições de cultivo.