

**SÉRGIO ARAUJO FIGUEIREDO**

**INFLUÊNCIA DE REGULADORES DE CRESCIMENTO E FOTOPERÍODO NO  
CRESCIMENTO SECUNDÁRIO DE RAÍZES DE *Ipomoea batatas* (L.) Lam. cv.  
BRAZLÂNDIA BRANCA EM CONDIÇÕES *in vitro***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de Mestre.

**Orientador**

**Prof. JOSÉ EDUARDO BRASIL PEREIRA PINTO**

**LAVRAS  
MINAS GERAIS - BRASIL  
1995**

FICHA CATALOGRÁFICA PREPARADA PELA SEÇÃO DE CATALOGAÇÃO E CLASSIFICAÇÃO DA BIBLIOTECA CENTRAL DA UFLA

Figueiredo, Sérgio Araújo.

Influência de reguladores de crescimento e fotoperíodo no crescimento secundário de raízes de *Ipomoea batatas* (L.) Lam. cv. brazlândia branca em condições *in vitro* / Sérgio Araújo Figueiredo.--  
Lavras : UFLA, 1995.

78p. : il.

Orientador: José Eduardo B. P. Pinto.

Dissertação (Mestrado) - UFLA.

Bibliografia.

1. Batata-doce - Raiz - crescimento. 2. Fotoperíodo. 3. Regulador de crescimento. 4. Propagação *in vitro*. 5. Cultura de tecido. 6. Microtuberização. 7. Tuberização. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

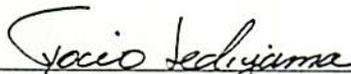
CDD-633.492

# SÉRGIO ARAUJO FIGUEIREDO

## INFLUÊNCIA DE REGULADORES DE CRESCIMENTO E FOTOPERÍODO NO CRESCIMENTO SECUNDÁRIO DE RAÍZES DE *Ipomoea batatas* (L.) Lam. cv. BRAZLÂNDIA BRANCA EM CONDIÇÕES *in vitro*

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de Mestre.

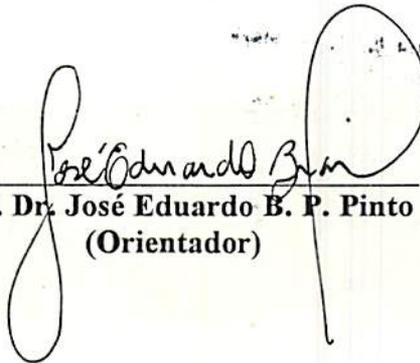
APROVADA em 10 de março de 1995



Prof. Tocio Sedyama



Prof. Marcelo Erihes Loureiro



Prof. Dr. José Eduardo B. P. Pinto  
(Orientador)



## **AGRADECIMENTOS**

**Nada fiz sozinho; todo trabalho foi fruto das idéias, esforços, apoios e incentivos das pessoas que estiveram à minha volta. Apenas fui um ponto em comum entre todas elas, nada mais. Eu as agradeço profundamente pelo apoio profissional e muito mais por estarem ao meu lado, principalmente nos momentos mais difíceis.**

**Nomes passarão e serão esquecidos; suas essências permanecerão em mim por toda a vida.**

**À Universidade Federal de Lavras pela oportunidade;**

**À CAPES pelo apoio financeiro;**

**Aos professores e funcionários do Departamento de Biologia pelo apoio;**

**Ao meu orientador, educador e amigo José Eduardo por me guiar nesta estrada, ensinando-me pelo exemplo diário a ser pessoalmente profissional;**

**Aos professores Tocio e Marcelo pelo constante apoio ao longo de todo o trabalho;**

**Aos meus colegas de turma pela constante presença nos momentos de dificuldades;**

**À Soninha pela amizade, carinho e respeito que compartilhamos em casa e na Universidade;**

Aos que estiveram ao meu lado apenas durante uma parte de minha vida em Lavras, mas nem por isso menos importantes: Clóvis, Marli e Lúcio;

Aos amigos com os quais sempre pude contar e que tanto me ajudaram: Samuel, Donizeti e Vantuil;

Aos colegas de laboratório pela paciência;

A algumas pessoas que não tenho palavras para expressar o carinho e respeito pelas quais eu as tenho: Magali e Silvana, minhas amigas; Nelsinho, meu amigo-irmão; Douglas, meu amigo-filósofo; José Eduardo, meu educador;

Aos espíritos iluminados de meus pais e meu irmão pela vida;

A aquela que me ensinou a amar ... Valéria;

A Deus pela força e luz a me guiar hoje e sempre.

## SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS .....	vi
LISTA DE FIGURAS .....	vii
LISTA DE ABREVIATURAS .....	ix
RESUMO .....	x
SUMMARY .....	xii
CAPÍTULO 1 .....	1
INTRODUÇÃO GERAL .....	1
1.1 A cultura da batata-doce .....	1
1.2 Propagação <i>in vivo</i> × propagação <i>in vitro</i> .....	3
1.3 Anatomia e formação de raízes tuberosas .....	5
1.4 Detecção de marcador protéico da microtuberização de batata-doce .....	7
1.5 Objetivo geral .....	9
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	9
CAPÍTULO 2 .....	12
INFLUÊNCIA DE ANA E BAP NA MICROTUBERIZAÇÃO DE <i>Ipomoea batatas</i> (L.) Lam. ....	12
RESUMO .....	12
2.1 REFERENCIAL TEÓRICO .....	13
2.2 OBJETIVO .....	18
2.3 MATERIAL E MÉTODOS .....	18
2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	20
2.5 CONCLUSÕES .....	35
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	36

	Página
CAPÍTULO 3 .....	39
EFEITO DO CCC, ABA E SUAS INTERAÇÕES COM ANA E BAP NA MICROTUBERIZAÇÃO DE <i>Ipomoea batatas</i> (L.) Lam. ....	39
RESUMO .....	39
3.1 REFERENCIAL TEÓRICO .....	40
3.1.1 Cloreto de 2-cloroetilmetilamônio .....	40
3.1.2 Ácido Abscísico .....	43
3.2 OBJETIVOS .....	45
3.3 MATERIAL E MÉTODOS .....	45
3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	47
3.4.1 Cloreto de 2-cloroetilmetilamônio .....	47
3.4.2 Ácido Abscísico .....	56
3.5 CONCLUSÕES .....	63
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	63
CAPÍTULO 4 .....	66
INFLUÊNCIA DO FOTOPERÍODO NA MICROTUBERIZAÇÃO DE <i>Ipomoea</i> <i>batatas</i> (L.) Lam. ....	66
RESUMO .....	66
4.1 REFERENCIAL TEÓRICO .....	66
4.2 OBJETIVO .....	68
4.3 MATERIAL E MÉTODOS .....	68
4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	69
4.5 CONCLUSÕES .....	75
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	75
ANEXOS .....	77

## LISTA DE TABELAS

Tabela		Página
1	Valores Médios da Percentagem de Plântulas de Batata-doce com EST (PL.C/EST), Número e Peso da Matéria Fresca das Estruturas Produzidas (EST), classificadas segundo seu diâmetro (mm) e Peso da Matéria Seca da Parte Aérea (PMSPA) ao final de 43 dias .....	21
2	Efeito dos Fatores ANA e BAP sobre a Produção de Estruturas (EST) Menores que 10 mm de Diâmetro .....	25
3	Valores Médios da Percentagem de Plântulas de Batata-doce com EST (PL.C/EST); Número de Estruturas (NUM.EST) e de Calos Produzidos (NUM.CALOS); Peso da Matéria Fresca das Estruturas (PMF.EST) e dos Calos (PMF.CALOS); Peso da Matéria Seca da Parte Aérea (PMSPA) e das Raízes (PMSR) e Particionamento da Matéria Fresca para o Sistema Radicular (PART) ao final de 68 dias .....	48
4	Valores Médios da Percentagem de Plântulas de Batata-doce com EST (PL.C/EST); Número de Estruturas (NUM.EST) e de Calos Produzidos (NUM.CALOS); Peso da Matéria Fresca das Estruturas (PMF.EST) e dos Calos (NUM.CALOS); Peso da Matéria Seca da Parte Aérea (PMSPA) e das Raízes (PMSR) e Particionamento da Matéria Fresca para o Sistema Radicular (PART) ao final de 88 dias .....	57
5	Valores Médios da Produção de Estruturas nas Raízes (NUM.EST) e Peso da Matéria Seca da Parte Aérea (PMSPA) e das Raízes (PMSR) ao final de 54 dias ..	70

## LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Visualização da metodologia utilizada para indução da microtuberização em <i>Ipomoea batatas</i> , apresentando as plântulas sobre suporte de papel alumínio .....	19
2	Visualização geral dos resultados do experimento das diversas combinações de ANA e BAP na microtuberização de batata-doce, apresentando o desenvolvimento da parte aérea e a formação de estruturas semelhantes a tubérculos (EST) nos sistemas radiculares .....	23
3	Estruturas semelhantes a tubérculos (EST) em plântulas de batata-doce em meio líquido de indução da microtuberização suplementado com 88 $\mu$ M BAP; 21,48 $\mu$ M ANA e 6% p/v de sacarose .....	24
4	Valores médios do número de estruturas semelhantes a tubérculos (EST) produzidos de batata-doce, classificados em três categorias .....	25
5	Média dos pesos da matéria seca da parte aérea (PMSPA) e do número de estruturas de diâmetro menor que 10 mm produzidas em plântulas de batata-doce nos diversos tratamentos .....	27
6	Gel de poliacrilamida descontínuo a 12% com SDS, corado com Coomassie Blue, apresentando na coluna 1 os marcadores protéicos de peso molecular definido; na coluna 2, raiz tuberosa de batata-doce cultivada no campo; coluna 3, EST < 5 mm; coluna 4, 5 < EST < 10 mm; coluna 5, parte aérea de plântulas de batata-doce cultivadas <i>in vitro</i> sem sacarose; coluna 6, raízes de batata-doce cultivadas <i>in vitro</i> sem sacarose; coluna 7, raízes de batata-doce cultivadas <i>in vitro</i> com sacarose .....	29
7	Porcentagem da matéria fresca no sistema radicular como um todo em relação ao peso da matéria fresca total nos diversos tratamentos .....	49
8	Estruturas semelhantes a tubérculos (EST) produzidas nos tratamentos com CCC e ABA combinados com ANA e BAP .....	51

9	Gel de poliacrilamida descontínuo a 12% com SDS, corado com Coomassie Blue, apresentando os marcadores protéicos com pesos moleculares definidos (coluna 1); raízes tuberosas de batata-doce cultivadas no campo (coluna 2); parte aérea de plântulas de batata-doce <i>in vitro</i> sem sacarose (coluna 3); raízes de plântulas de batata-doce cultivadas <i>in vitro</i> sem sacarose (coluna 4); raízes de plântulas de batata-doce cultivadas <i>in vitro</i> com sacarose (coluna 5); estruturas (EST) radiculares produzidos em meio com ABA (coluna 6) e CCC (coluna 7), ambos combinados com ANA mais BAP .....	52
10	Produção de matéria seca da parte aérea (PMSPA) e das raízes (PMSR) nos diferentes tratamentos .....	54
11	Percentagem da matéria fresca no sistema radicular como um todo em relação ao peso da matéria fresca total nos diversos tratamentos .....	58
12	Produção de matéria seca da parte aérea (PMSPA) e das raízes (PMSR) em plântulas de batata-doce <i>in vitro</i> em função dos tratamentos .....	60
13	Produção de matéria seca da parte aérea (PMSPA) e das raízes (PMSR) nos diversos fotoperíodos .....	71
14	Plântulas de batata-doce submetidas a diversos fotoperíodos ao final de 54 dias ...	71

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

**ABA** : Ácido abscísico

**ANA** : Ácido naftaleno acético

**BAP** : Benzil aminopurina

**CCC** : Cloreto de 2-cloroetilmetilamônio

**EST** : Estruturas semelhantes a tubérculos com proeminente crescimento secundário formadas no sistema radicular de plântulas de batata-doce *in vitro*

**GA** : Ácido giberélico

**MI** : Meio indutor

**Microtubérculos** : Raízes tuberosas produzidas *in vitro*

**MS** : Meio Murashige & Skoog (1962)

**Plântula** : Plantas obtidas em cultura *in vitro*

**RFA** : Radiação fotossinteticamente ativa

**SDS-PAGE** : Gel de poliacrilamida com sódio duodecíl sulfato

## RESUMO

FIGUEIREDO, S.A. **Influência de reguladores de crescimento e fotoperíodo no crescimento secundário de raízes de *Ipomoea batatas* (L.) Lam. cv. Brazlândia Branca em condições *in vitro*.** Lavras, UFLA, 1995. 78p. (Dissertação - Mestrado em Fisiologia Vegetal).\*

Este trabalho foi proposto devido à carência de informações referentes à microtuberização de *Ipomoea batatas* e para o desenvolvimento de uma nova metodologia para sua utilização em bancos de germoplasma *in vitro*.

Diversos fatores químicos (ANA, BAP, ABA e CCC) e um fator físico (fotoperíodo) foram avaliados visando a identificar quais estariam relacionados com a produção de raízes tuberosas *in vitro*, submetendo-se as plântulas de *Ipomoea batatas* (L.) Lam. cv. Brazlândia Branca com 30 dias de idade aos meios indutores (meio Murashige e Skoog (1962) com reguladores de crescimento ou fotoperíodo) e 6% de sacarose. Dentre os fatores químicos, constatou-se efeito indutivo de ANA e BAP na formação de EST (estruturas semelhantes a tubérculos) nas raízes, mas apenas as EST entre 5 e 10 mm de diâmetro foram consideradas microtubérculos pelo maior acúmulo de esporamina, proteína de reserva de raízes tuberosas desta espécie, em SDS-PAGE, sugerindo que além do efeito indutivo da sacarose, estaria ocorrendo outro sinal indutivo tubérculo-específico para o acúmulo de esporamina que, pela morfologia e

---

\* Orientador: José Eduardo Brasil Pereira Pinto. Membros da banca: Tocio Sedyama e Marcelo Erlhes Loureiro

crescimento secundário proeminente destas estruturas, pode-se inferir ser a diferenciação de microtubérculos. Entretanto, visando melhor diferenciação destas estruturas com crescimento secundário, estudou-se sua combinação com outros fatores químicos. Os resultados mostraram que nem ABA nem CCC influenciaram positivamente sua tuberização *in vitro*, quer isolados ou combinados com ANA e BAP.

O fotoperíodo também não proporcionou efeito indutor sobre a tuberização *in vitro* deste cultivar de batata-doce.

## SUMMARY

### **INFLUENCE OF GROWTH REGULATORS AND PHOTOPERIOD ON *IN VITRO* SECONDARY ROOT GROWTH OF *Ipomoea batatas* (L.) Lam. cv. Brazlândia Branca**

The importance of this study was due to the lack of information referring to microtuberization of *Ipomoea batatas* and the development of a new methodology to be used in *in vitro* germoplasm banks.

Several chemical (ANA, BAP, ABA and CCC) and one physical (photoperiod) factors were evaluated trying to identify which were related and how they were involved in the production of tuberosous roots of this species *in vitro*. Was observed among the chemical factors that there was a positive interaction of ANA and BAP on the formation of EST (structure like tubers) in the roots. The produced EST were confirmed as being tuberosous roots by the presence of sporamine, a storage protein of tuberosous roots of this species, in SDS-PAGE. Nevertheless, aiming the production of better conformed structures, its interaction with other chemical factors were studied. Was verified that neither ABA nor CCC influenced positively the *in vitro* tuberization of this species, even alone or together with ANA and BAP.

On the other hand, evaluating the influence of the photoperiod on its microtuberization, was constacted that this cultivar of sweet potato was insensible to this environmental factor under *in vitro* conditions.

# CAPÍTULO 1

## INTRODUÇÃO GERAL

### 1.1 A cultura da batata-doce

A batata-doce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) é uma dicotiledônea da família Convolvulaceae que apresenta consistência herbácea e, embora seja perene, é cultivada como anual. Seu hábito de crescimento é predominantemente decumbente, crescendo rápida e horizontalmente sobre o solo, embora existam cultivares de porte ereto e semi-ereto (Folquer, 1978 e Huaman, 1992).

Quanto à origem, a teoria mais aceita é de que esta planta seja originária da região noroeste da América do Sul (Huaman, 1992) e, apesar de ser planta de clima tropical, também é cultivada em condições de clima temperado (Folquer, 1978 e Huaman, 1992).

No Brasil esta hortaliça ocupa a quarta posição em termos de alimentos produzidos com aproximadamente 682.000 t, inferior somente ao tomate, batatinha e cebola, conservando esta mesma posição na classificação quando é considerado o parâmetro produtividade, com aproximadamente 10 t/ha. Porém, quando se considera a área plantada, a cultura da batata-doce ocupa a terceira posição, inferior somente à batatinha e cebola. Por outro lado, dentro do País, os maiores estados produtores são os da região sul, onde o Rio Grande do Sul é o maior produtor,

seguido de Santa Catarina e Paraná; os demais estados da União cultivam menos esta cultura comparado com os estados sulinos (Anuário ... 1991).

Segundo Folquer (1978), a batata-doce é uma cultura amplamente adaptada a diversas condições de solo em termos nutricionais e de pH, requerendo apenas solos mais aerados para boa produção. Em termos climáticos, por ser de origem tropical, requer um período de aproximadamente cinco meses sem geadas para bom desenvolvimento da cultura. Assim sendo, é uma planta de fácil cultivo e que apresenta baixo custo de produção.

As raízes da batata-doce não podem ser consideradas alimento completo por apresentarem baixos teores protéicos (variando de 1,5 a 2,5% do peso da matéria seca, dependendo da cultivar), além de serem limitantes em termos qualitativos devido à deficiência de lisina, leucina, metionina e cisteína. Apesar desta condição nutricional desfavorável, apresentam razoáveis teores de minerais, principalmente ferro, cálcio e fósforo. Sua característica principal é de ser alimento altamente energético muito rico em carboidratos (superior a 30% em média em peso da matéria fresca) e boa fonte de vitaminas, principalmente B e C. Além disso, as cultivares de polpa alaranjada apresentam elevados teores de  $\beta$ -carotenos (Folquer, 1978 e Seminário... 1987).

Na alimentação humana, as raízes tuberosas são consumidas *in natura* cozidas, fritas e assadas, bem como utilizadas para produção de doces e biscoitos, podendo ainda serem industrializadas e utilizadas para produção de farinhas, féculas, açúcares e xaropes. Os brotos também podem ser utilizados na alimentação humana devido ao seu elevado teor protéico (23 a 25% em peso da matéria seca), sendo apreciados principalmente nas Filipinas, Indonésia e outros países do sudoeste asiático (Seminário...1987). As raízes tuberosas também podem ser utilizadas em indústrias têxteis, de colas e para produção de álcool, com rendimento médio em torno de 130

a 150 litros por tonelada de raiz, podendo ainda serem utilizadas para produção de corantes naturais, principalmente as cultivares de polpa alaranjada e roxa (Folquer, 1978 e Seminário...1987).

Na alimentação animal, as raízes são de boa aceitação pelos bovinos, suínos e ovinos, podendo-se utilizar tanto as ramas quanto as raízes, as quais são empregadas na forma de raspas integrais, farinha de raspas, “pellets”, farelo de fécula e/ou submetidas à ensilagem (Seminário...1987).

Em virtude desta espécie apresentar elevada rusticidade e amplo espectro de potencialidade de uso, a batata-doce apresenta-se como espécie de interesse econômico, principalmente para países em desenvolvimento e com escassez de alimento para a população.

## 1.2 Propagação *in vivo* × propagação *in vitro*

Em relação à propagação da batata-doce, os métodos tradicionalmente utilizados são os vegetativos por meio das ramas e raízes tuberosas (Folquer, 1978). Porém, segundo Silva, Souza e Paz (1991), estes métodos de propagação apresentam sérios problemas, dentre os quais se destacam a dificuldade de conservação do material, disseminação de pragas e doenças, pequena capacidade multiplicativa do material disponível, desuniformidade nos plantios e baixa produtividade. Além disso, pode ocorrer degenerescência em decorrência do acúmulo de doenças, principalmente virótica, no material de propagação.

Para contornar estes problemas, tem sido utilizadas técnicas de cultura de tecidos, dentre as quais a cultura de meristemas tem sido a mais utilizada, principalmente para limpeza de patógenos sistêmicos, fornecendo material certificado para intercâmbio de germoplasma,

reduzindo-se assim os riscos de introdução de novas doenças em áreas não afetadas por elas (Alconero *et al.*, 1975; Frison e Ng, 1981) e contribuindo para o aumento da produtividade.

Além desta técnica, a utilização da embriogênese somática (Chée, Schultheis e Cantliffe, 1990; Schultheis e Cantliffe, 1992) e a micropropagação de gemas axilares (Litz e Conover, 1978) resultam em elevada taxa de multiplicação deste material isento de doenças sistêmicas.

Entretanto, Mantell e Hugo (1989) enfatizam a necessidade de mão-de-obra especializada para a transferência de plântulas da condição *in vitro* para o campo, principalmente em países tropicais onde esta cultura é socialmente mais importante. Isto porque a taxa de sobrevivência de plântulas *in vitro* durante o seu intercâmbio depende do período e das condições de transporte, bem como do manuseio durante o processo de aclimação dessas plântulas, o qual é trabalhoso e apresenta, em alguns casos, elevadas taxas de perda. Além dessas condições desfavoráveis, o longo período no escuro durante o transporte normalmente promove a degenerescência do material *in vitro* (Estrada, Tovar e Dodds, 1986; Ng, 1988). Por outro lado, raízes tuberosas poderiam ser produzidas *in vitro*, as quais poderiam ser utilizadas na conservação de diferentes genótipos em bancos de germoplasma e intercâmbio deste material, tendo sido verificado serem menos vulneráveis aos fatores que afetam as plântulas *in vitro*, além de poderem ser facilmente transplantadas e estabelecidas *in vivo* (Wang e Hu, 1982).

Desta forma, a produção de raízes tuberosas de batata-doce *in vitro* apresenta-se como técnica alternativa de propagação e de conservação desta espécie, além de possibilitar o estudo dos fatores que afetam fisiologicamente o processo de formação destas raízes tuberosas. Assim, a produção de microtubérculos tem se mostrado instrumento valioso, tendo sido pesquisado para diversas espécies que tem o tubérculo como órgão de propagação, principalmente plantas do gênero *Solanum* (Mauk e Langille, 1978; Garner e Blake, 1989) e *Dioscorea*

(Sengupta, Mitra e Hugo, 1984; Mantell e Hugo, 1989). Entretanto, há carência de trabalhos referentes à tuberização *in vitro* de *Ipomoea batatas* na literatura consultada, tendo sido encontrado apenas o trabalho de Nakatani (1994), porém com sucesso parcial.

### 1.3 Anatomia e formação de raízes tuberosas

Acredita-se que, para a formação de tubérculos, os estádios de desenvolvimento sejam semelhantes para as espécies que os possuem como órgãos de reserva. Segundo Vreugdenhil e Struik (1989), a diferenciação de tubérculos de batata pode ser dividida em diferentes fases:

- . indução e iniciação do estolão;
- . crescimento do estolão;
- . paralização do crescimento do estolão e;
- . indução e iniciação da tuberização.

Embora a indução e iniciação estejam altamente relacionadas, estes processos são fisiologicamente distintos. A indução se refere à mudança no balanço hormonal que, por sua vez, reflete na iniciação do crescimento e desenvolvimento de novos órgãos da planta. Experimentalmente verifica-se que é difícil distinguir os dois processos, uma vez que a indução é detectada pela determinação da iniciação (Vreugdenhil e Struik, 1989). Desta forma, os dois processos serão tratados concomitantemente.

Do ponto de vista anatômico, segundo Indira e Kurian (1977), uma raiz tuberosa pode ser definida como sendo órgão que perdeu sua polaridade de crescimento, mudando de

longitudinal para radial, sendo necessário para tal que o órgão apresente crescimento secundário. Este mecanismo pode ocorrer em raízes de dicotiledôneas e de gimnospermas, raramente em monocotiledôneas, período no qual é formado o meristema secundário (câmbio vascular) que dará origem ao floema e xilema também secundários (Esau, 1976; Cutter, 1987; Fahn, 1990).

Tomando-se como modelo o padrão de crescimento secundário em raízes, verifica-se que o câmbio vascular é oriundo das células procambiais que permanecem indiferenciadas entre o floema e xilema primários. Subseqüentemente, as células do periciclo adjacentes aos pólos do protoxilema se unem às células procambiais formando um tecido contínuo que inicialmente é lobado, seguindo os contornos do xilema primário. Posteriormente, ao se iniciarem as divisões periclinais, ocorre a formação de um câmbio circular quando observado em corte transversal. A partir desse ponto, ocorre a formação do floema secundário em direção ao meio exterior e xilema secundário em direção ao interior da raiz. Desta forma, o câmbio vascular radicular assemelha-se muito ao câmbio vascular caulinar, exceto pelo fato de que, no xilema primário, o protoxilema exarco das raízes ainda pode ser distinguido (Cutter, 1987).

Em algumas raízes especializadas que atuam como órgãos de reserva (armazenamento) como *Manihot esculentum*, *Daucus carota*, *Raphanus sativus*, *Dioscorea* sp, *Beta vulgaris* e *Ipomoea batatas*, este crescimento secundário difere do padrão de diferenciação acima descrito.

No caso específico de *Ipomoea batatas* ocorre crescimento secundário anômalo da região vascular radicular (Esau, 1976; Cutter, 1987; Fahn, 1990). Nas raízes desta espécie, o câmbio vascular está presente na posição usual mas, além deste, formam-se câmbios acessórios ao redor dos traqueídeos. O câmbio forma-se ao redor dos vasos isolados ou em grupos, formando elementos de vaso em direção ao xilema e vasos crivados e laticíferos em direção oposta, com

grande número de células de parênquima formados em ambas as direções. Ainda segundo esses autores, a abundância de parênquima de reserva permeado de tecido de condução é característica comum a esse órgão tuberizado.

Outro ponto importante a ser considerado conjuntamente com a parte de formação de tubérculos refere-se ao particionamento da matéria seca entre os órgãos de reservas e o restante da planta, sendo este comportamento dependente de fatores genéticos, ambientais e nutricionais (Oparka, Davis e Prior, 1987).

Neste caso, uma enorme gama de fatores podem estar relacionados com o estímulo para a produção de tubérculos de batata e, segundo Hussey e Stacey (1984), o estímulo que levaria à tuberização seria de natureza hormonal, o qual poderia ser influenciada por uma série de fatores, dentre eles o fotoperíodo, temperatura, níveis de nitrogênio no meio, bem como aplicação de substâncias reguladoras de crescimento.

#### **1.4 Detecção de marcador protéico da microtuberização de batata-doce**

O estudo de proteínas de reservas armazenadas em sementes vêm atraindo a atenção de diversos pesquisadores há muito tempo devido à sua importância para a alimentação humana e animal, bem como fonte de nitrogênio e aminoácidos para o desenvolvimento dos próprios eixos embrionários da respectiva espécie. Porém, mais recentemente, este mesmo tipo de estudo está sendo feito para as proteínas armazenadas em tubérculos de algumas espécies que os possuem como órgãos de reserva e propagação, sendo mais profusamente estudado em tubérculos de plantas do gênero *Solanum* (Paiva, Lister e Park, 1983).

Órgãos tuberosos como tubérculos de *Solanum tuberosum* (caule modificado) bem como raízes tuberosas de *Ipomoea batatas* desenvolvem-se como órgãos de reserva acumulando grandes quantidades de carboidratos durante o desenvolvimento da cultura. Ocorre concomitantemente o acúmulo de quantidade significativas de proteínas específicas de tubérculos durante a tuberização, as quais funcionam como proteínas de reserva que são utilizadas juntamente com os carboidratos durante a propagação vegetativa dessas espécies.

No caso específico de *Ipomoea batatas*, Maeshima, Sasaki e Asahi (1985) identificaram uma proteína (globulina) que apresenta duas formas monoméricas de peso molecular em torno de 25KDa, as quais foram denominadas de esporaminas A e B. Esta proteína, segundo estes autores, representa de 60 a 80% do total de proteínas solúveis nas raízes tuberosas de batata-doce e que, em condições de campo, a mesma é encontrada em grande quantidade nas raízes tuberosas enquanto que, nos caules, pecíolos e folhas não são encontradas ou o são em quantidades ínfimas, sendo que sua detecção pode ser feita por eletroforese em gel de poliacrilamida (Hattori, Nakagawa e Nakamura, 1990).

Por outro lado, deve ser tomada cautela em se afirmar categoricamente que a presença de esporamina esteja relacionada exclusivamente com a tuberização desta espécie, uma vez que Hattori *et al.* (1991) verificaram que sua expressão pode ser induzida em condições *in vitro* pela sacarose em outros órgãos da planta.

Desta forma, com controles adequados, o maior acúmulo de esporamina pode ser interpretado como evidência indireta de que o processo de microtuberização de *Ipomoea batatas* esteja ocorrendo em estruturas com proeminente crescimento secundário. Nessas condições, a presença de esporamina pode ser utilizada como “marcador” do processo de tuberização *in vitro* dessa espécie.

## 1.5 Objetivo geral

O presente trabalho tem como objetivo geral estudar fatores químicos e físicos que possam induzir a microtuberização de *Ipomoea batatas* (L.) Lam. e correlacionar os níveis de expressão de uma proteína específica às raízes tuberosas cultivadas no campo com as proteínas induzidas nos órgãos com proeminente crescimento secundário formados *in vitro* e verificar a adequabilidade desta informação como evidência do processo de microtuberização.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALCONERO, R.; SANTIAGO, A.G.; MORALES, F.; RODRIGUES, F. Meristem tip culture and virus indexing in sweet potato. *Phytopathology*, St Paul, v.65, n.6, p.769-773, July 1975.
- ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO BRASIL - 1991. Rio de Janeiro, FIBGE, v.51.
- CHEÉ, R.P.; SCHULTHEIS, J.R.; CANTLIFFE, D.J. Plant recovery from sweet potato somatic embryos. *HortScience*, Alexandria, v.25, n.7, p.795-797, July 1990.
- CUTTER, E.G. *Anatomia Vegetal: Experimentos e interpretação*. v.2. Órgãos. São Paulo: Roca, 1987. 336p.
- ESAU, K. *Anatomia da planta com sementes*. São Paulo: Edgard Brucher. 1976. 293p.
- ESTRADA, R.; TOVAR, P.; DODDS, J.H. Induction of *in vitro* tubers in a broad range of potato genotypes. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Dordrecht, v.7, n.1, p.3-10, Jan. 1986.
- FAHN, A. *Plant anatomy*. 4<sup>th</sup> ed. Oxford: Pergamon Press 1990. 588p.
- FOLQUER, F. *La batata (camote): estudio de la planta y su producción comercial*. San Jose, 1978. 144p.
- FRISON, E.A.; NG, S.Y. Elimination of sweet potato virus disease agents by meristem tip culture. *Tropical Pest Management*, Ibadan, v.27, n.4, p.453-454, Dec. 1981.

- GARNER, N.; BLAKE, J. The induction and development potato microtubers *in vitro* on medio free of growth regulating substances. *Annals of Botany*, London, v.63, n.6, p.663-674, June 1989.
- HATTORI, T.; FUKUMOTO, H.; NAKAGAWA, S.; NAKAMURA, K. Sucrose-induced expression of genes coding for the tuberous root storage protein, sporamin, of sweet potato in leaves and petioles. *Plant and Cell Physiology*, Osaka, v.32, n.01, p.79-86, Jan. 1991.
- HATTORI, T.; NAKAGAWA, S.; NAKAMURA, K. High-level expression of tuberous root storage protein genes of sweet potato in stems of plantlets grown *in vitro* on sucrose medium. *Plant Molecular Biology*, Dordrecht, v.14, n.3, p.595-604, 1990.
- HAUMAN, Z. *Systematic botany and morphology of the sweet potato plant*. Lima: International Potato Center, 1992. 22p. (Technical Information, 25).
- HUSSEY, G.; STACEY, N.J. Factors affecting the formation of *in vitro* tubers of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Annals of Botany*, London, v.53, n.04, p.565-578, Apr. 1984.
- INDIRA, P.; KURIAN, T. A study on the comparative anatomical changes undergoing tuberization in roots of cassava and sweet potato. *Journal of Root Crops*, Trivandrum, v.3, n.01, p.29-32, 1977.
- LITZ, R.E.; CONOVER, R.A. *In vitro* propagation of sweet potato *HortScience*, Alexandria, v.13, n.6, p.659-660, Dec. 1978.
- MAESHIMA, M., SASAKI, T.; ASAHI, T. Characterization of major proteins in sweet potato tuberous roots. *Phytochemistry*, Oxford, v.24, n.9, p.1899-1902, 1985.
- MANTELL, H.S.; HUGO, S.A Effects of photoperiod, mineral medium strenght, inorganic ammonium, sucrose and cytokinin on root, shoot and microtuber development in shoots cultures of *Dioscorea alata* L. and *Dioscorea bulbifera* L. yams. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Dordrechst, v.16, n.1, p.23-42, Jan. 1989.
- MAUK, C.S.; LANGILLE A.R. Physiology of tuberization in *Solanum tuberosum* L. *Plant Physiology*, Maryland, v.62, n.3, p.438-442, Sept. 1978.
- NAKATANI, M. *In vitro* formation of tuberous in sweet potato, *Japanese Journal of Crop Science*, Tóquio, V. 63,n.1, p.158-159, Mar. 1994.
- NG, S.Y.C. *In vitro* tuberization in while yam (*Dioscorea rotundata* Poir). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. Dordrechst, v.14, n.2, p.121-128, Jan. 1988.
- OPARKA, K.J.; DAVIES, H.V.; PRIOR, D.A.M. The influence of applied nitrogen on export and partitionig of current assimilates by fild-growth potato plants. *Annals of Botany*, London, v. 59, n.3, p.311-323, Mar. 1987.

- PAIVA, E.; LISTER, R.M.; PARK, W.D. Induction and accumulation of major tuber protein of potato in stems and petioles. *Plant Physiology*, Maryland, v.71, n.1, p.161-168, Jan. 1983.
- SCHULTHEIS, J.R.; CANTLIFFE, D.J. Growth of somatic embryos of sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) in hydroxyethyl cellulose gel amended with salts and carbohydrates. *Scientia Horticulturae*, Amsterdam, v.50, n.1, p.21-33, 1992.
- SEMINÁRIO SOBRE A CULTURA DA BATATA-DOCE, Brasília, 1987. *Anais...* Brasília: EMBRAPA-CNPQ, 1987.
- SENGUPTA, J.; MITRA, G.C.; SHARMA, M. Organogenesis and tuberization in cultures of *Dioscorea floribunda*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Dordrecht, v.3, n.3, p.321-331, Dec. 1984.
- SILVA, S. de O.C.; SOUZA, A.S.; PAZ, O.P. Efeito da multiplicação vegetativa *in vitro* na produtividade de batata-doce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.). *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, São Carlos, v.3, n.1, p.47-52, 1991.
- VREUGDENHIL, D.; STRUIK, P.C. An integrated view of the hormonal regulation of tuber formation in potato (*Solanum tuberosum*). *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v.75, n.4, p.525-531, Apr., 1989.
- WANG, P.; HU, C. *In vitro* mass tuberization and virus-free seed-potato production in Taiwan. *American Potato Journal*, Orono, v.59, n1, p.33-37, Jan. 1982.

## **CAPÍTULO 2**

### **INFLUÊNCIA DE ANA E BAP NA MICROTUBERIZAÇÃO DE *Ipomoea batatas* (L.) Lam.**

#### **RESUMO**

A tuberação *in vitro* de *Ipomoea batatas* (L.) Lam. cv. Brazlândia Branca foi estudada transferindo-se plântulas inteiras com 30 dias de idade para meio indutor, o qual era constituído pelo meio Murashige e Skoog (1962) líquido com 6% p/v de sacarose suplementado com diversas combinações de ANA mais BAP. Constatou-se que ANA isoladamente não proporcionou efeito sobre a formação de estruturas com crescimento secundário nas raízes deste cultivar. Entretanto, quando o meio foi suplementado com BAP, houve o desenvolvimento de EST (estruturas semelhantes a tubérculos), sendo que na concentração de 88 $\mu$ M deste juntamente com 10,74 ou 21,48 $\mu$ M de ANA obteve-se a maior produção de EST distintas menores que 5 mm e entre 5 e 10 mm de diâmetro que se formavam nas raízes. Entretanto, apenas as EST entre 5 e 10 mm possuíam acúmulo expressivo de esporamina, uma proteína de reserva de raízes tuberosas desta espécie, concomitantemente com crescimento secundário radicular, possibilitando assim inferências de estar ocorrendo o processo de microtuberação deste cultivar.

## 2.1 REFERENCIAL TEÓRICO

A indução e iniciação do desenvolvimento de órgãos de reserva em vegetais na natureza correspondem ao resultado de uma série de respostas fisiológicas destes vegetais aos fatores do ambiente aos quais estão submetidos, podendo estes serem fotoperíodo, temperatura e disponibilidade de água no solo, o qual reflete, conseqüentemente, na disponibilidade de nutrientes. Estes estímulos ambientais são percebidos pelas plantas e convertidos em sinais a nível celular, podendo modelar ou induzir mudanças a nível de expressão gênica em determinados órgãos das plantas. Neste ponto ocorre a biossíntese de substâncias que transmitirão estes estímulos do ambiente, agora bioquímicos, a órgãos específicos da planta, fazendo com que a mesma responda pelo desenvolvimento característico deste. Este estímulo bioquímico refere-se, basicamente, às substâncias reguladoras de crescimento ou fitohormônios.

Para que ocorra o desenvolvimento de tubérculos (caules modificados) ou raízes tuberosas (raízes modificadas), é necessário que se diminua ou praticamente cesse o crescimento longitudinal e se inicie o crescimento radial ou que a taxa de crescimento radial seja maior do que a taxa de crescimento longitudinal dos caules ou das raízes, respectivamente. Esse crescimento radial decorre da formação e ativação do câmbio vascular (meristema secundário), o qual é um meristema lateral encontrado nas gimnospermas, dicotiledôneas e, raramente, nas monocotiledôneas (Esau, 1976; Fahn, 1990), que se desenvolve e produz floema e xilema secundários. Enquanto nas dicotiledôneas e gimnospermas o crescimento secundário é devido às divisões celulares do câmbio vascular, nas monocotiledôneas ocorre o desenvolvimento de um meristema lateral de espessamento denominado capa meristemática (Rudall, 1991).

Aloni (1987) fez uma vasta revisão abordando diversos aspectos da diferenciação de tecidos vasculares, desde a estrutura e formação dos meristemas vasculares (procâmbio e câmbio vascular) até os fatores envolvidos no controle da diferenciação de floema e xilema, tendo constatado influência marcante das auxinas e citocininas.

Diversos autores têm relatado a importância das auxinas sobre a formação e atividade do câmbio vascular. Dentre eles, Aloni (1980) estudou o efeito de auxinas e sacarose na diferenciação de tubos crivados (floema) e elementos traqueais (xilema) em diversas espécies *in vitro*, tendo verificado que a formação destes tecidos nos calos formados ocorria em função da concentração de auxina sendo que, em baixas concentrações ( $0,10 \text{ mg.L}^{-1}$ ), havia a diferenciação de floema mas não de xilema; que em concentrações mais elevadas ( $0,25 \text{ mg.L}^{-1}$ ) ocorria a diferenciação tanto de floema quanto de xilema e que, mantida constante a dosagem de auxina, variando-se a concentração de sacarose no meio, não ocorria estímulo à diferenciação de alguns destes tecidos.

Sengupta, Mitra e Sharma (1984), trabalhando com *Dioscorea floribunda*, conseguiram a indução da microtuberização com formação de tubérculos aéreos em 70% das plântulas *in vitro* reduzindo o meio MS (Murashige e Skoog, 1962) à metade e adicionando  $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$  ANA, tendo os microtubérculos variado de 2 a 15 mm em diâmetro. Neste mesmo trabalho, estes autores estudaram histologicamente os tubérculos produzidos, tendo sido constatado a presença de tecido parenquimático de reserva e que, durante o desenvolvimento de raízes e parte aérea, houve tendência maior à xilogênese.

Outros pesquisadores têm relatado a combinação auxina x citocinina como mecanismo para ativação do câmbio vascular. Dentre estes, Torrey e Loomis (1967) estudaram *Raphanus* spp. em condições *in vitro* e verificaram que, omitindo auxinas do meio de cultivo,

houve inibição da iniciação do câmbio vascular e que, quando presente em concentrações maiores, promoveu a atividade cambial. Por outro lado, a ausência de citocininas no meio impediu o crescimento secundário do sistema radicular, sendo necessário um balanço auxina/citocinina adequado para o desenvolvimento e atividade do câmbio vascular.

Dalessandro (1973) estudou os efeitos de auxinas (AIA - ácido indolacético) e citocininas (zeatina/cinetina) na xilogênese *in vitro* de *Heliantus tuberosum*, tendo constatado que a aplicação isolada de auxinas induziu rápida e consistente divisão celular seguida de diferenciação dos elementos traqueais, sendo estes resultados ampliados quando houve adição de AIA com as citocininas. Entretanto, as melhores concentrações de AIA foram de 0,1 a 5,0 mg.L<sup>-1</sup>; mas quando se utilizou concentrações mais elevadas (10 e 15 mg.L<sup>-1</sup>AIA), houve maior inibição da diferenciação do que da divisão celular. Em outro estudo, Dalessandro e Roberts (1971), trabalhando *in vitro* com tecido parenquimático extraído do cilindro central de *Lactuca sativa*, verificaram que estes tecidos exibiram xilogênese após quatro dias no escuro com o meio contendo auxinas, citocininas e sacarose. Em todos os tratamentos testados houve necessidade da combinação auxina x citocinina para o processo de xilogênese, exceto com 2,4-D isoladamente.

Especificamente com *Ipomoea batatas*, McDavid e Alamu (1980) estudaram o efeito da aplicação foliar de diversos reguladores de crescimento sobre a tuberização de folhas enraizadas *in vivo* dessa espécie, tendo verificado que AIA (50 ppm) não apresentou efeito estimulador sobre o processo, inclusive houve produção ligeiramente inferior de tubérculos quando comparado com o controle.

Por outro lado, relacionando isoladamente os diversos efeitos fisiológicos das citocininas no crescimento e desenvolvimento das plantas, existe consenso quanto ao efeito na

mobilização de metabólitos como citam, por exemplo, Wareing e Phillips (1981), Taiz e Zeiger (1991) e Salisbury e Ross (1992).

Diversos autores têm verificado seu efeito na produção de drenos metabólicos, neste caso a indução da tuberização, principalmente em plantas do gênero *Solanum*, dentre os quais Mauk e Langille (1978) verificaram que plantas cultivadas sob condições indutivas (28°C dia/13°C noite/10h luz) apresentavam maiores teores de zeatina ribosídeo do que plantas cultivadas sob condições não-indutivas (30°C dia/26°C noite/18h luz), o mesmo sendo verificado por Forsline e Langille (1975).

Também Hussey e Stacey (1984) estudaram o efeito do fotoperíodo, BAP e concentrações de sacarose na tuberização *in vitro* de *Solanum tuberosum* onde verificaram que, aumentando a concentração de BAP de 0 para 2 mg.L<sup>-1</sup>, houve efeito positivo sobre a indução de tuberização tanto para fotoperíodo de 8h quanto 24h de luz, principalmente em concentrações de sacarose mais elevadas (5-7% p/v).

Palmer e Smith (1969) verificaram o efeito indutor de diversas citocininas (KIN, BAP e SD 8339) na tuberização *in vitro* de *Solanum tuberosum* e constataram que nas concentrações de 0,25 e 2,50 mg.L<sup>-1</sup> de qualquer das citocininas testadas houve tuberização em 80 a 100% das plântulas após dez dias de cultivo, enquanto que, na concentração de 25 mg.L<sup>-1</sup>BAP, ocorreu apenas 40% de tuberização.

Outros pesquisadores como Estrada, Tovar e Dodds (1986) conseguiram tuberizar diversos genótipos de *Solanum tuberosum* em condições *in vitro* em meio MS (Murashige e Skoog, 1962) adicionando CCC (cloreto de 2-cloroetilmetilamônio), BAP (5 mg.L<sup>-1</sup>) e aumentando a concentração de sacarose para 8%, conseguindo assim a formação de tubérculos com diâmetro médio em torno de 5 mm após 40 dias no escuro.

Mantell e Hugo (1989), estudando a interação entre meio mineral, fotoperíodo e cinetina na tuberização *in vitro* de *Dioscorea alata* e *Dioscorea bulbifera*, verificaram que a presença de 2,5 $\mu$ M de cinetina no meio de cultivo possibilitou em ambas as espécies melhor resposta em termos de produção de microtubérculos do que quando foram cultivadas em ausência de cinetina.

Teixeira (1989), trabalhando com produção de tubérculos *in vitro* de *Solanum tuberosum*, verificou que com 3% de sacarose no meio de cultivo e BAP na concentração de 10 mg.L<sup>-1</sup> proporcionou maior número, maior diâmetro e maior produção de matéria seca de microtubérculos, o mesmo resultado tendo sido constatado por Wang e Hu (1982).

Especificamente com *Ipomoea batatas*, McDavid e Alamu (1980) estudaram a aplicação de BAP (50 ppm) via foliar na tuberização de folhas enraizadas *in vivo* desta espécie, tendo verificado que houve maior produção em número e em peso da matéria seca dos minitubérculos produzidos comparado com os demais tratamentos, indicando efeito estimulador deste regulador de crescimento sobre o processo de tuberização. Porém, mesmo o controle tuberizou, indicando que houve algum mecanismo anterior à aplicação do regulador de crescimento que induziu o início do processo, tendo o BAP apenas efeito sinérgico.

Em condições *in vitro*, o único trabalho encontrado foi de Nakatani (1994) que conseguiu induzir a tuberização em raízes destacadas de plântulas de batata-doce, colocando-as em presença de ácido jasmônico em meio sólido e BA (benzil adenina) em meio líquido, concomitantemente, após sete meses de cultura, tendo constatado que apenas as partes das raízes que ficaram expostas ao ar se diferenciaram em raízes tuberosas. Entretanto, quando AIA foi aplicado juntamente com ácido jasmônico, não ocorreu a diferenciação das raízes tuberosas *in vitro*.

Verifica-se assim que há carência de informações na literatura consultada a respeito da influência de auxinas e citocininas sobre a formação de raízes tuberosas *in vitro* de *Ipomoea batatas*.

## 2.2 OBJETIVO

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos isolados e combinados de diversas concentrações de ANA e BAP na formação de raízes tuberosas *in vitro* de *Ipomoea batatas*.

## 2.3 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras.

Utilizou-se como explantes plântulas inteiras de *Ipomoea batatas* (L.) Lam. cv. Brazlândia Branca com 30 dias de idade, crescidas em meio Murashige e Skoog (MS) (1962) sólido (0,7% p/v ágar), sem reguladores de crescimento e com 3% p/v de sacarose, as quais encontravam-se em tubos de ensaio de 150 mm x 28 mm com 10 mL de meio por tubo.

As plântulas foram transferidas para o meio de indução (MI), apoiando-as em formas de papel de alumínio previamente esterilizadas de tal forma que somente as raízes entrassem em contato com o MI (Figura 1).

O MI que constituiu os tratamentos foi composto pelo meio MS líquido com 6% p/v de sacarose acrescido de ANA nas concentrações de 0; 5,37; 10,74 e 21,48 $\mu$ M e de BAP nas concentrações de 0; 44 e 88 $\mu$ M, combinados em esquema fatorial. Foram utilizados frascos de

vidro de 300 mL, contendo cada frasco 20 mL de MI e um suporte de alumínio, vedados com tampa plástica transparente. Os frascos foram autoclavados a 120°C por 20 minutos. Na etapa seguinte, dentro da câmara de fluxo laminar esterelizada, procedeu-se a inoculação das plântulas. Posteriormente, os frascos foram selados com fita plástica e transferidos para sala de crescimento, sob regime de 16h luz/ 8h escuro, temperatura de  $25 \pm 1^\circ \text{C}$  e com radiação fotossinteticamente ativa (RFA) de  $42 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  com lâmpada GE de 40W luz do dia especial.



FIGURA 1. Visualização da metodologia utilizada para indução da microtuberização em *Ipomoea batatas*, apresentando as plântulas sobre suporte de papel alumínio.

O delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casualizado com três repetições, sendo cada repetição composta por cinco plântulas.

O experimento foi conduzido por um período de 43 dias, ao final do qual as estruturas semelhantes a tubérculos (EST) foram destacadas das raízes, classificadas por tamanho em diâmetro menores que 5 mm, entre 5 e 10 mm e maiores que 10 mm, contadas, pesadas a fresco e armazenadas em etanol 70%. Avaliou-se também o peso da matéria fresca e seca das partes aéreas e dos sistemas radiculares. Posteriormente procedeu-se a extração protéica macerando as estruturas em solução tampão conforme Hattori, Nakagawa e Nakamura (1990) e o sobrenadante foi utilizado para quantificar a proteína total conforme Bradford (1976), tendo como padrão BSA (soro bovino albumina). Visando identificar a presença de esporamina, o sobrenadante foi utilizado em eletroforese de gel descontínuo de poliacrilamida com SDS (SDS-PAGE) a 12%, conforme esses mesmos autores.

A quantificação das bandas protéicas expressas no gel foi realizada utilizando-se o Biomed Instruments Densitometer.

## 2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste experimento houve a formação de órgãos com proeminente crescimento secundário no sistema radicular à medida em que se alterava as condições do MI, as quais foram denominadas estruturas semelhantes a tubérculos (EST); os resultados estão apresentados na Tabela 1 e na Figura 4.

Verificou-se que as estruturas menores que 5 mm e entre 5 e 10 mm de diâmetro eram estruturas de forma predominantemente circular, tenras, macias e bem definidas e que as

TABELA 1. Valores Médios da Percentagem de Plântulas de Batata-doce com EST (PL.C/ EST), Número e Peso da Matéria Fresca das Estruturas Produzidas (EST), classificadas segundo seu diâmetro (mm) e Peso da Matéria Seca da Parte Aérea (PMSPA) ao final de 43 dias

Trat.	BAP ( $\mu$ M)	ANA ( $\mu$ M)	PL.TUB (%)	Número de Estruturas (EST)				Peso Matéria Fresca (EST) (mg)			PMSPA (mg)
				<5mm	5-10mm	<10 <sup>1</sup> mm	>10mm	<5mm	5-10mm	>10mm	
1	0	0	0 B	0	0	0 B	0 C	0	0	0 C	187,4 A
2	0	5,37	0 B	0	0	0 B	0 C	0	0	0 C	162,9 AB
3	0	10,74	0 B	0	0	0 B	0 C	0	0	0 C	134,9 ABC
4	0	21,48	0 B	0	0	0 B	0 C	0	0	0 C	153,4 AB
5	44	0	55,67 AB	3,11	0,67	3,78 AB	1,78 A	14	41	2017,8 A	117,0 ABCD
6	44	5,37	77,67 A	1,53	1,50	3,03 AB	1,25 AB	39	181	1484,5 AB	55,3 CDE
7	44	10,74	100 A	7,00	2,33	9,33 AB	0,67 ABC	30	129	279,5 C	96,3 BCDE
8	44	21,48	93,33 A	10,66	2,07	12,73 A	0,80 ABC	28	145	699,8 BC	88,5 BCDE
9	88	0	83,33 A	4,67	0,50	5,17 AB	0,67 ABC	16	196	731,6 BC	32,4 E
10	88	5,37	77,67 A	6,44	1,00	7,44 AB	1,00 ABC	18	134	1100,6 ABC	41,8 DE
11	88	10,74	100 A	8,00	2,22	10,22 AB	1,00 ABC	26	160	643,7 BC	43,7 DE
12	88	21,48	100 A	9,07	1,92	10,97 A	0,56 BC	24	160	224,2 C	61,7 CDE
D.M.S.			56,03	-	-	10,37	1,13			1200,6	83,5

1 - Somatório das EST menores que 5 mm com as entre 5 e 10 mm.

Os valores seguidos da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

estruturas maiores que 10 mm eram estruturas amorfas e desuniformes (calos) oriundos da proliferação desordenada de tecidos localizados na base dos explantes entre a parte aérea e o sistema radicular, estimulados a se desenvolverem em função dos reguladores de crescimento presentes no MI (Figuras 2 e 3).

Analisando-se os dados sobre a produção de EST, verificou-se que, independentemente da concentração de ANA, na ausência de BAP não houve formação de EST, comportamento este comprovado pelos dados de percentagem de plantas tuberizadas (Tabela 1). Por outro lado, na ausência de ANA e na presença de BAP ocorreu formação de estruturas (Tratamentos 5 e 9), indicando assim a importância dessa citocinina para a indução do processo de formação de EST *in vitro*.

Verifica-se ainda que, para uma mesma concentração de BAP, aumentando-se as concentrações de ANA, as percentagens de plântulas tuberizadas não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos; isto se deve provavelmente à elevada variação normalmente apresentada em análise de experimentos *in vitro*, o qual foi verificado neste experimento. Porém, houve maior diferenciação de estruturas menores que 5 mm e entre 5 e 10 mm, sendo as maiores quantidades obtidas quando se combinou 21,48 $\mu$ M de ANA com 44 $\mu$ M e 88 $\mu$ M de BAP (Tabela 1). Visando confirmar este resultado, fez-se uma análise de cada fator (ANA e BAP) separadamente, conforme apresentado na Tabela 2.

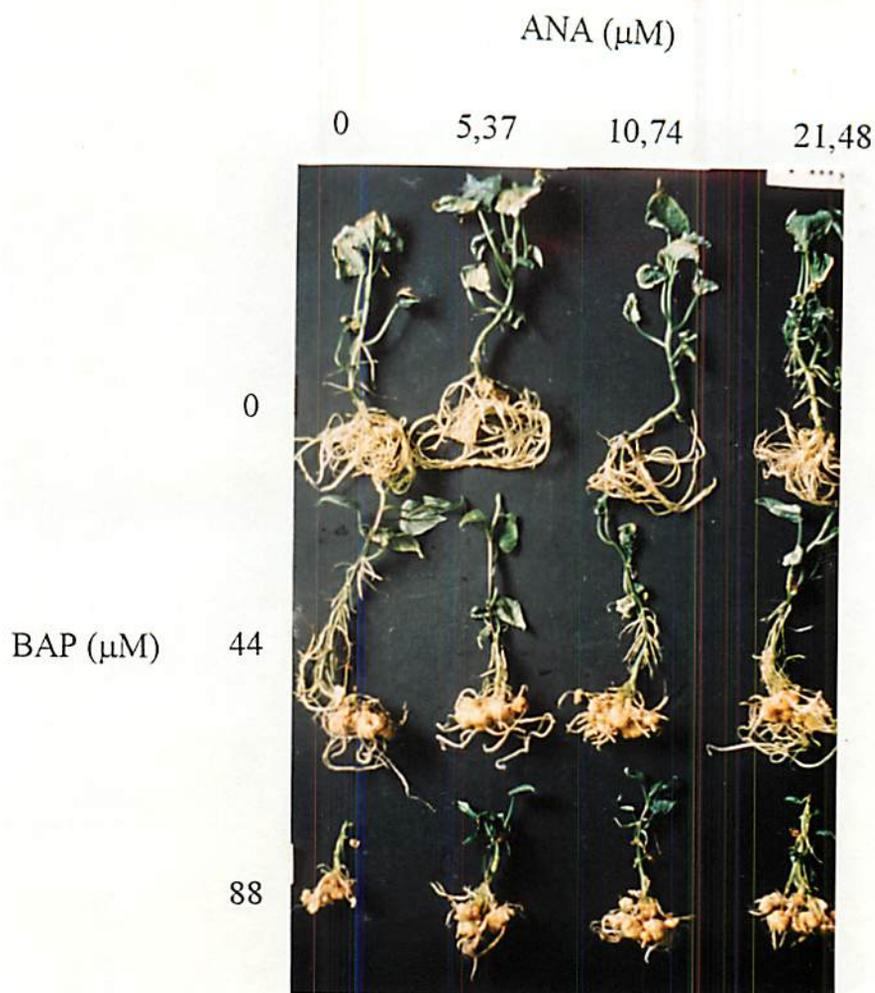


FIGURA 2. Visualização geral dos resultados do experimento das diversas combinações de ANA e BAP na microtuberização de batata-doce, apresentando o desenvolvimento da parte aérea e a formação de estruturas semelhantes a tubérculos (EST) nos sistemas radiculares.



FIGURA 3. Estruturas semelhantes a tubérculos (EST) em plântulas de batata-doce em meio líquido de indução da microtuberização suplementado com  $88\mu\text{M}$  BAP;  $21,48\mu\text{M}$  ANA e 6% p/v de sacarose.

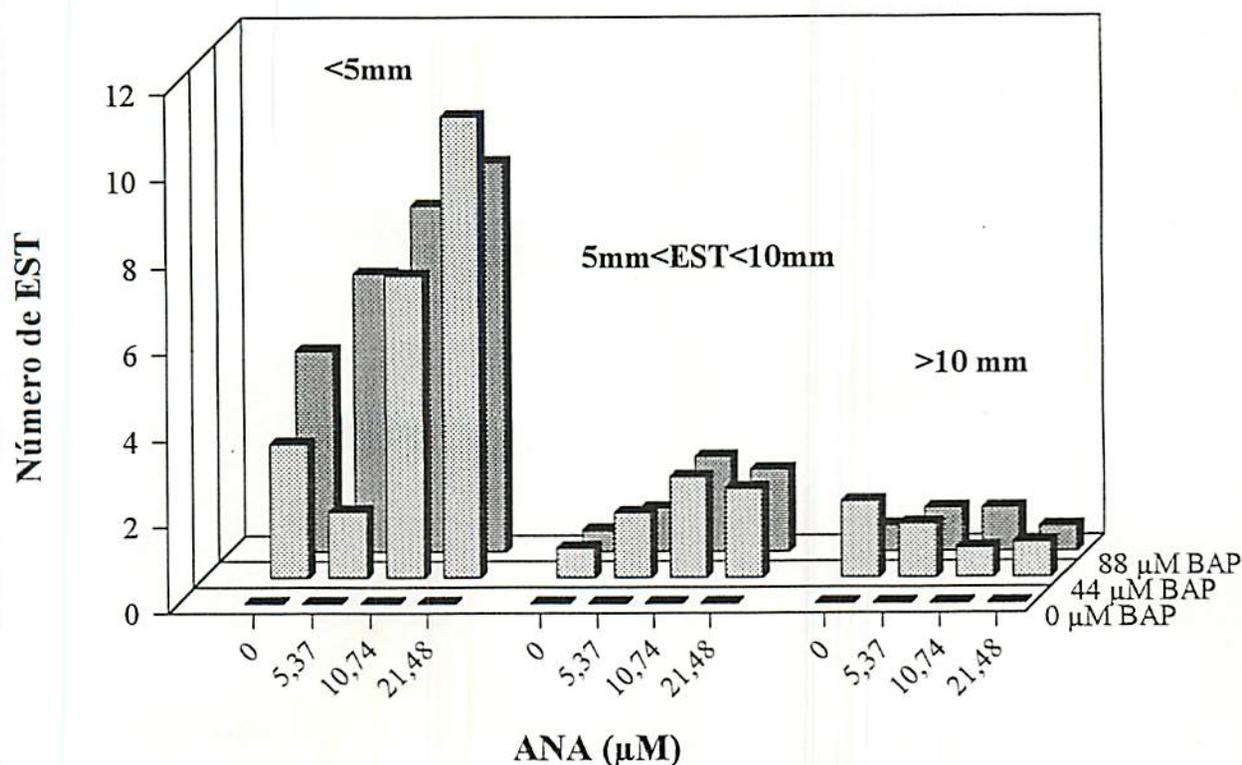


FIGURA 4. Valores médios do número de estruturas semelhantes a tubérculos (EST) produzidos em batata-doce, classificados em três categorias.

TABELA 2. Efeito dos Fatores ANA e BAP sobre a Produção de Estruturas (EST) Menores que 10mm de Diâmetro.

BAP(μM)	ANA (μM)				Média
	0	5,37	10,74	21,48	
0	0	0	0	0	0 B
44	3,78	3,03	9,33	12,73	7,22 A
88	5,17	7,44	10,22	10,97	8,45 A
Média	2,98 B	3,49 AB	6,52 AB	7,90 A	

D.M.S.<sub>ANA</sub> : 4,58 ; D.M.S.<sub>BAP</sub> : 3,59

Os valores seguidos da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

Nota-se, conforme anteriormente citado, a importância do BAP para a produção das estruturas (EST); sem BAP não houve sua formação e com este regulador de crescimento ocorreu sua indução, independente da concentração utilizada ( $44\mu\text{M}$  ou  $88\mu\text{M}$ ). Porém, avaliando-se o ANA, observa-se que quanto maior sua concentração, maior a individualização destas estruturas.

Observa-se também que na ausência de ANA e presença de  $44\mu\text{M}$  de BAP houve maior desenvolvimento de calos (EST > 10 mm) em termos numéricos e de peso da matéria fresca, o mesmo sendo verificado quando ANA foi ministrado em baixas concentrações ( $5,37\mu\text{M}$ ), valor este que reduz quando BAP é aplicado em concentração maior ( $88\mu\text{M}$ ). Por outro lado, ANA nas concentrações mais elevadas e em presença de BAP ( $44\mu\text{M}$  ou  $88\mu\text{M}$ ), houve redução do calo formado e maior produção das estruturas diferenciadas (estruturas menores que 5 mm mais as entre 5 e 10 mm).

Assim, em termos de produção de estruturas menores que 10 mm, pode-se concluir que BAP é essencial para sua indução e que ANA, nas concentrações mais elevadas possibilita a maior individualização das mesmas, além de reduzir o número e peso da matéria fresca do calo formado.

Considerando-se o peso da matéria seca da parte aérea produzida, verifica-se que houve redução deste parâmetro à medida em que se aumentava a concentração de reguladores de crescimento no meio, principalmente BAP e, quando se compara o peso da matéria seca da parte aérea com o número de estruturas menores que 10 mm, percebe-se um direcionamento do dreno em direção ao sistema radicular quando ANA mais BAP foram aplicados ao meio, pois à medida que aumentava o número de estruturas menores que 10 mm de diâmetro, diminuía a matéria seca

da parte aérea, comportamento este comprovado por apresentar correlação negativa entre os dois parâmetros considerados (dados não apresentados) (Figura 5).

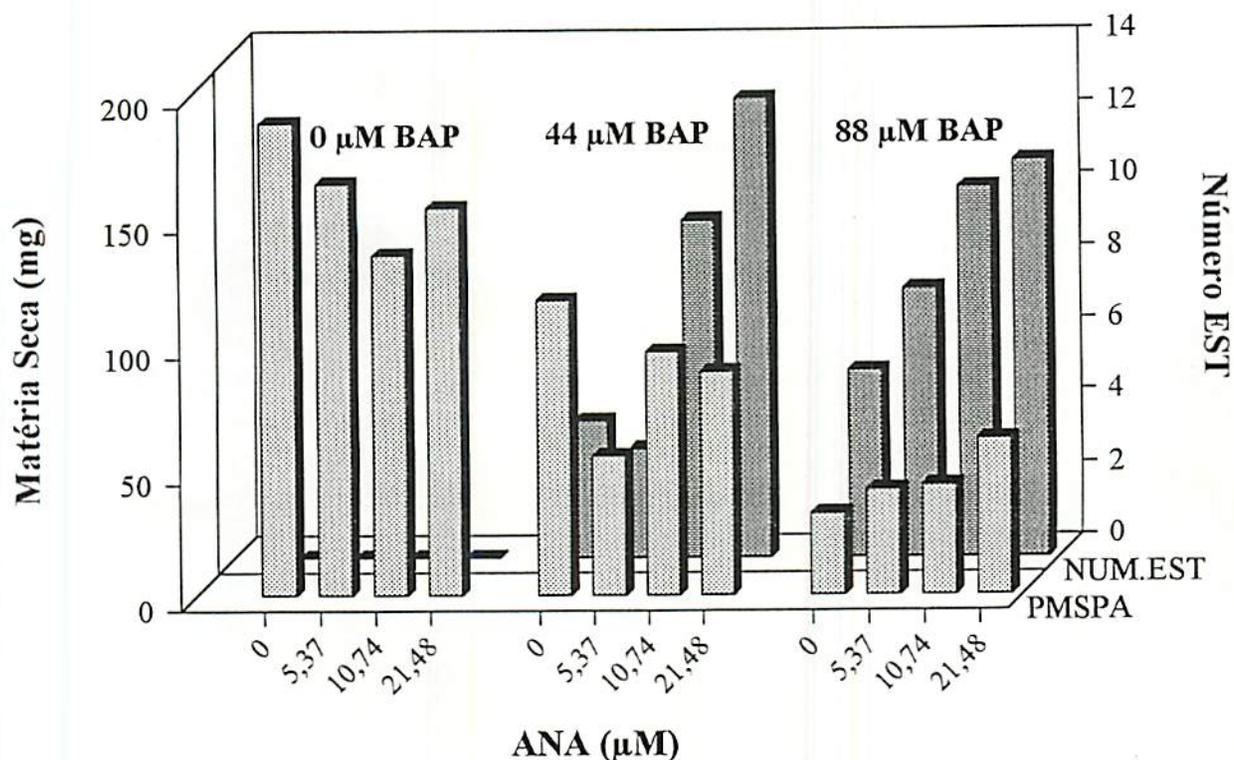


FIGURA 5. Médias dos pesos da matéria seca da parte aérea (PMSPA) e do número de estruturas de diâmetro menor que 10 mm produzidas em plântulas de batata-doce nos diversos tratamentos.

Analisando-se morfológicamente as estruturas semelhantes a tubérculos (EST), percebe-se que eram provenientes de crescimento secundário de determinadas regiões dispersas pelo sistema radicular. Entretanto, uma avaliação morfológica destas estruturas *per si* não é indicador suficiente para que se possa afirmar tratar-se de uma raiz tuberosa de *Ipomoea batatas*, necessitando para tal a realização de testes comprobatórios que possam confirmar ou sugerir a sua formação. Vários testes poderiam ser realizados, tais como: 1) confecção de cortes histológicos

destas estruturas e análise anatômica comparativa dos tecidos produzidos nas EST com os de uma raiz tuberosa desta espécie produzida no campo, visando identificar seu crescimento secundário anômalo, bem como a diferenciação de parênquima de reserva rico em amido; 2) teste iodo-lugol no qual poder-se-ia visualizar se estaria ocorrendo acúmulo de amido nas estruturas; 3) teste para avaliar se as estruturas seriam capazes de brotar e dar origem a nova plântula; e, 4) detecção da expressão de um determinado gene ou proteína tubérculo-específico que, no caso da batata-doce, é uma proteína de reserva denominada esporamina, utilizando-se a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida.

Optou-se pelo último teste como forma de verificar a ocorrência do crescimento secundário como etapa do processo de diferenciação de microtubérculos, conforme apresentado na Figura 6.

Por este gel pode-se verificar que houve a expressão da esporamina, uma proteína de reserva específica de raízes tuberosas de *Ipomoea batatas*, com peso molecular em torno de 25 KDa, que se destaca no tubérculo de campo (coluna 2), uma vez que corresponde a cerca de 60 a 80% do total de proteínas de reserva dessas raízes tuberosas (Maeshima, Sasaki e Asaki, 1985). Observa-se que nas EST entre 5 e 10 mm (coluna 4) também houve a sua expressão em níveis elevados; entretanto, não foi claramente expressa nas estruturas menores que 5 mm (coluna 3). Por outro lado, considerando-se os órgãos vegetativos, na parte aérea e nas raízes de plântulas de batata-doce *in vitro* em meio MS sem sacarose não houve a detecção dessa proteína (colunas 5 e 6, respectivamente). Quando o meio foi suplementado com sacarose, ambos sem reguladores de crescimento, ela se expressou nas raízes (coluna 7), indicando que a sacarose estaria relacionada com a indução da expressão dessa proteína.

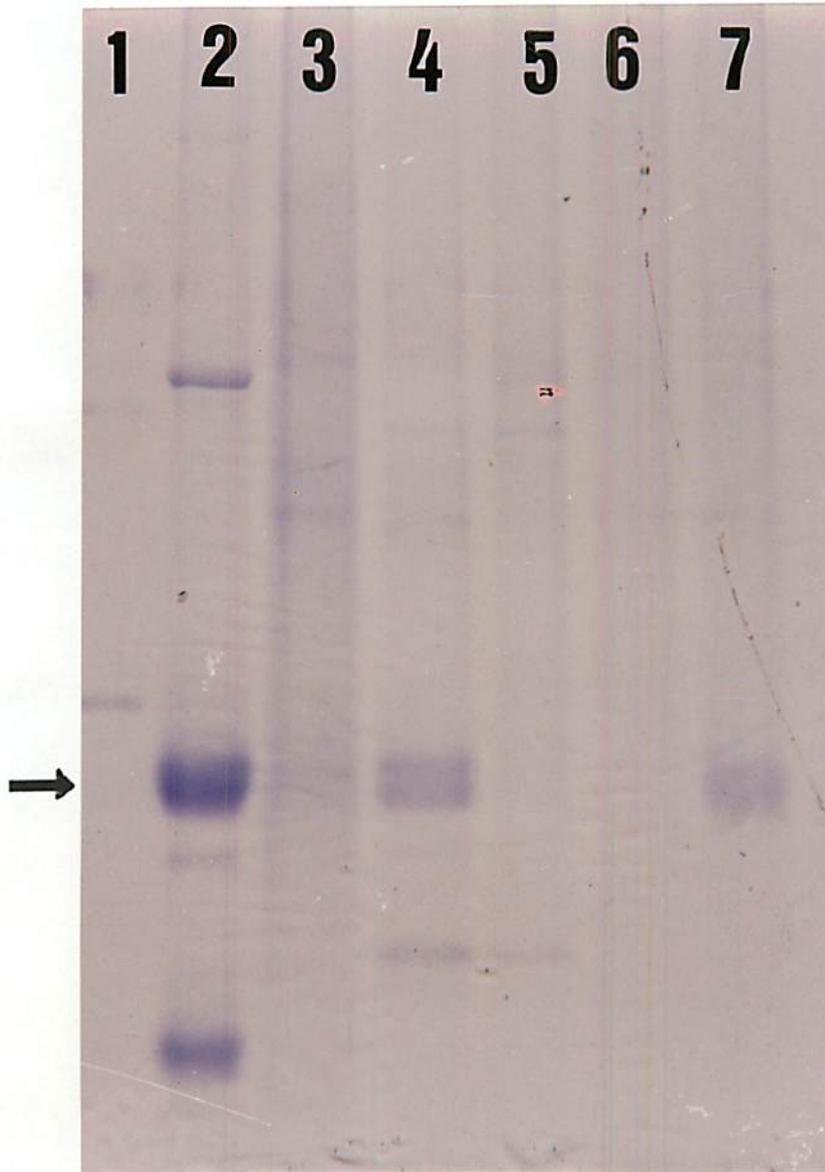


FIGURA 6. Gel de poliacrilamida descontínuo a 12% com SDS, corado com Coomassie Blue, apresentando na coluna 1 os marcadores protéicos de peso molecular definido; na coluna 2, raiz tuberosa de batata-doce cultivada no campo; coluna 3, EST < 5 mm; coluna 4, 5 < EST < 10 mm; coluna 5, parte aérea de plântulas de batata-doce cultivadas *in vitro* sem sacarose; coluna 6, raízes de plântulas de batata-doce cultivadas *in vitro* sem sacarose; coluna 7, raízes de batata-doce cultivadas *in vitro* com sacarose.

Observa-se porém, que a quantidade de esporamina nas estruturas entre 5 e 10 mm (coluna 4) foi maior do que nas raízes normais *in vitro* em presença de sacarose (coluna 7), análise esta realizada por densitometria e estatisticamente significativa (dados não apresentados), sugerindo assim que poderia estar ocorrendo a influência de algum outro mecanismo que seria desencadeado pela diferenciação dos microtubérculos em função dos tratamentos aos quais as plântulas de batata-doce foram submetidas.

Desta forma, os dados sugerem que a diferenciação de microtubérculos somente estaria ocorrendo nas estruturas entre 5 e 10 mm de diâmetro e que as estruturas menores que 5 mm seriam apenas um incipiente crescimento secundário de determinados pontos das raízes que não se desenvolveram completamente em microtubérculos por alguma razão desconhecida.

Assim sendo, os dados obtidos neste experimento mostraram que as melhores concentrações de reguladores de crescimento testados para se obter a maior percentagem de plântulas microtuberizadas, maior produção de estruturas menores que 5 mm de diâmetro, as quais estariam aptas a tuberizarem e de estruturas entre 5 e 10 mm de diâmetro, as quais pode-se inferir serem microtubérculos, e menor produção de calos foram as combinações de 44 $\mu$ M ou 88 $\mu$ M de BAP com 10,74 $\mu$ M ou 21,48 $\mu$ M de ANA.

Com este trabalho iniciou-se o estudo da tuberização *in vitro* de *Ipomoea batatas*, visto que há carência na literatura sobre este tópico e em centros de pesquisa no País (contato pessoal com Dra. Conceição Gama - EMBRAPA-CENARGEM) e no exterior [contato pessoal com Dr. George Kuo - AVRDC - Asian Vegetable Research and Development Center (Taiwan-China); Dr. Zozimo Huaman - CIP - International Potato Center (Lima-Peru)].

Neste trabalho observou-se que na ausência de auxina e na presença de citocinina houve formação de EST, fato esse que condiz com diversos estudos da tuberização *in vitro* de *Solanum tuberosum* já bem definido e largamente divulgado em literatura. Em concordância com a

importância das citocininas na indução de microtubérculos, Palmer e Smith (1969) relataram a influência positiva da aplicação exógena de citocininas sobre a microtuberização de *Solanum tuberosum*, mostrando que as respostas eram dependentes da concentração e do tipo de citocinina utilizada. Wang e Hu (1982) também verificaram que, mantendo todas as condições de ambiente e do meio constantes, tendo BAP no meio de indução, ocorreu a microtuberização que variou segundo a concentração deste regulador. Estrada, Tovar e Dodds (1986) obtiveram semelhante indução da microtuberização em aproximadamente 50 genótipos de *Solanum tuberosum* adicionando 5 mg BAP.L<sup>-1</sup> conjuntamente com CCC, bem como com 8% de sacarose e sob ausência de luz.

Outros trabalhos também demonstram o papel das citocininas para indução da microtuberização em plântulas de *Solanum tuberosum* como, por exemplo, Mauk e Langille (1978); Lentini e Earle (1991); Levy, Seabrook e Coleman (1993). Entretanto, ainda há controvérsias, uma vez que Jameson, McWha e Haslemore (1985) avaliaram as mudanças em termos de citocinina durante a tuberização em condições *in vivo*, constatando a atividade semelhante à citocinina (“cytokinin-like activity”) por intermédio de bioensaios para este fitohormônio. Estes pesquisadores demonstraram que o aumento nos meios endógenos de citocininas ocorria somente quando os tubérculos *in vivo* apresentavam diâmetro maior que 7,5 mm. Desta forma, sugeriram que a indução da tuberização *per se* parecia não ser devido à citocinina e sim devido a outro fator não identificado. Por outro lado, a aplicação de citocininas ao meio afeta positivamente a microtuberização de *Solanum tuberosum*, conforme verificado nos trabalhos citados anteriormente.

Mantell e Hugo (1989) relataram que tanto *Dioscorea alata* quanto *Dioscorea bulbifera* responderam positivamente à formação de microtubérculos quando ao meio era adicionado cinetina ( $2,5\mu\text{M}$ ) comparado com o controle sem este regulador de crescimento. Entretanto, para *Dioscorea alata*, o fotoperíodo de 8h luz era pré-requisito essencial para a tuberização, sendo que a presença de cinetina tinha efeito sinérgico sobre o processo, enquanto *Dioscorea bulbifera* era menos dependente do fotoperíodo, produzindo microtubérculos tanto sob 8 como sob 16h luz mas, mesmo assim, a citocinina apresentava resultado sinérgico sobre o processo em si.

Analisando as auxinas isoladamente constatou-se que, na ausência de citocinina, independentemente da concentração de auxina presente ( $5,37$ ;  $10,74$  ou  $21,48\mu\text{M ANA}$ ), não houve formação de EST, ou seja, a auxina testada não estava relacionada com a indução da microtuberização de *Ipomoea batatas*, não influenciando seu crescimento secundário. Estes resultados divergem do que foi constatado por Sengupta, Mitra e Sharma (1984) que conseguiram induzir a microtuberização em 70% das plântulas de *Dioscorea floribunda* acrescentando  $0,5\text{ mg.L}^{-1}$  ANA ao meio de indução.

Entretanto, constatou-se neste experimento que ANA e BAP supridos conjuntamente ao meio de indução induziram a formação de estruturas (EST) na raízes, com maior diferenciação destas estruturas ( $\text{EST} < 5\text{ mm}$  mais  $5 < \text{EST} < 10\text{ mm}$ ) quanto maior a concentração de auxina aplicada, sugerindo haver interação entre ANA e BAP. Diversos pesquisadores têm relatado a importância da combinação de auxinas e citocininas para a formação dos tecidos de condução. Dalessandro e Roberts (1971) constataram xilogênese em células do tecido parenquimático do cilindro vascular de *Lactuca sativa* em presença de auxina e citocinina, assim como Fosket e Torrey (1969) que avaliaram o controle hormonal na diferenciação de xilema

em calos de *Glycine max* em presença de auxina e citocinina. Embora estes trabalhos citados relatassem a formação de tecidos de condução em tecidos não relacionados com o câmbio vascular, divergindo assim do presente estudo, pode-se concluir que sua diferenciação foi induzida pela combinação de reguladores de crescimento e inferir que mecanismo semelhante poderia estar ocorrendo no câmbio vascular.

O efeito interativo destes reguladores de crescimento sobre a indução da atividade do câmbio vascular também pode ser verificado pelo trabalho de Torrey e Loomis (1967) no qual avaliaram o efeito de auxinas e citocininas sobre o meristema secundário em raízes *in vitro* de *Raphanus sativus*. Nesta espécie, a ausência de auxina, fosse ela ANA, 2,4-D ou AIA, no meio indutor eliminava completamente a iniciação do câmbio vascular, enquanto que, na ausência de citocinina, não havia engrossamento das raízes, ou seja, era necessário que os dois estivessem presentes em determinadas concentrações para que houvesse atividade do câmbio vascular. Mesmo em diversos genótipos de *Solanum tuberosum*, Kwiatkowski *et al.* (1988) obtiveram a formação de microtubérculos acrescentando ao meio indutor 0,05 mg .L<sup>-1</sup> cinetina, 0,10 mg.L<sup>-1</sup> AIA e 8% de sacarose sob temperatura de 19°C.

Entretanto, o único trabalho encontrado relatando a tuberização *in vitro* de *Ipomoea batatas* foi Nakatani (1994) que conseguiu ligeiro incremento em diâmetro (aproximadamente 5mm) em determinadas partes de raízes destacadas, após um período de 6 a 7 meses de cultura, quando combinou ácido jasmônico com BA (Benzil adenina). No presente estudo, trabalhando-se com plântulas inteiras e outros reguladores de crescimento, conseguiu-se induzir proeminentes crescimentos secundários nas raízes que foram numericamente maiores e mais bem conformados morfológicamente, tendo-se conseguido respostas em prazos menores (43

dias), sendo que, após 2-3 semanas, já se verificava sua diferenciação nos sistemas radiculares (dados do autor).

Considerando-se a utilização do marcador protéico para confirmação do processo de microtuberização de *Ipomoea batatas*, faz-se necessário ressaltar que, por várias evidências indiretas, entre as quais a similaridade do peso molecular da destacada proteína encontrada no gel considerada como esporamina; sua concordância com a característica abundância em raízes tuberosas dessa espécie; por sua tecido-especificidade *in vivo* (Maeshima, Sasaki e Asahi, 1985) e pela sua indução e acúmulo em outros órgãos pela sacarose (Hattori *et al.*, 1991), que é possível considerá-la como sendo esporamina. Entretanto, a única evidência direta possível para identificar a esporamina seria obtida através de “Western Blot” com anticorpo específico, o qual não foi disponível neste experimento.

Embora, como observado por Hattori *et al.* (1991) que a presença de altas concentrações de sacarose possam induzir o acúmulo de esporamina em diferentes órgãos de plântulas de batata-doce, o seu maior acúmulo sob determinadas combinações de reguladores de crescimento, como neste experimento, possibilitou maior expressão nas estruturas entre 5 e 10 mm do que em qualquer outra estrutura ou órgão em presença de sacarose, sugerindo que algum fator tubérculo-específico estaria atuando nestas estruturas, sendo responsável pelo aumento no acúmulo de esporamina.

Assim sendo, somente as estruturas entre 5 e 10 mm de diâmetro apresentaram fortes evidências de que estaria ocorrendo diferenciação típica de tuberização de raízes, com proeminente crescimento secundário, possibilitando chamá-las de microtubérculos.

## 2.5 CONCLUSÕES

A análise dos resultados deste experimento permitem concluir que:

. ANA isoladamente não teve influência alguma sobre o processo de microtuberização;

. BAP favoreceu o desenvolvimento de maior dreno em direção ao sistema radicular;

. As EST menores que 5 mm eram apenas incipientes crescimentos secundários radiculares que não completaram sua diferenciação; apenas as EST entre 5 e 10 mm de diâmetro foram constatadas serem microtubérculos pela significativa expressão da esporamina em SDS-PAGE e as EST maiores que 10 mm eram calos que se desenvolveram nas bases dos explantes e não nas raízes e, portanto, sem interesse;

. BAP teve efeito indutor sobre a produção de EST e na concentração de 44 ou 88 $\mu$ M, combinado com 10,74 ou 21,48 $\mu$ M de ANA, apresentou as maiores percentagens de plântulas microtuberizadas, as maiores produções de EST menores que 10 mm e a menor produção de calos;

. Há necessidade de estudos mais profundos sobre a produção tanto qualitativa quanto quantitativa das EST, avaliando sua interação com outros fatores que poderiam estar relacionados com este processo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALONI, R. Differentiation of vascular tissues. **Annual Review in Plant Physiology**, Palo Alto, v.38, p.178-204, 1987.
- ALONI, R. Role of auxin and sucrose in the differentiation of sieve and tracheary elements in plant tissue culture. **Planta**, Berlin, v.150, n.3, p.255-263, Nov.1980.
- BRADFORD, M.M. A rapid and positive method for quantitation of microgran quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v.72, n.1, 2, p. 248-254, May 1976.
- DALESSANDRO, G. Interaction of auxin, cytokinin, and gibberelin on cell division and xylem differentiation in cultured explants of Jerusalem artichoke. **Plant and Cell Physiology**, Osaka, v.14, n.6, p.167-1176, Dec. 1973.
- DALESSANDRO, G.; ROBERTS, L.W. Induction of xylogenesis in pith parenchyma explants of *Lactuca*. **American Journal of Botany**, Baltimor, v.58, n.5, p.378-385, May/June 1971.
- ESAU, K. **Anatomia da planta com sementes**. São Paulo: Edgard Brücher, 1976. 293p.
- ESTRADA, R.; TOVAR, P.; DODDS, J.H. Induction of *in vitro* tubers in a broad range of potato genotypes. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.7, n.1, p.3-10, Jan. 1986.
- FAHN, A. **Plant anatomy**. 4<sup>th</sup> ed. Oxford, Pergamon Press, 1990. 588p.
- FORSLINE, P.L.; LANGILLE, A.R. Endogenous cytokinin in *Solanum tuberosum* as influenced by photoperiod and temperature. **Physiologia Plantarum**. Copenhagen, v.34, n.01, p.75-77, 1975.
- FOSKET, D.E.; TORREY, J.G. Hormonal control of cell proliferation and xylem differentiation in cultured tissues of *Glycine max.* var Biloxi. **Plant Physiology**, Maryland, v.44, n.06, p.871-880, June 1969.
- HATTORI, T.; FUKUMOTO, H.; NAKAGAWA, S.; NAKAMURA, K. Sucrose-induced expression of genes coding for the tuberous root storage protein, sporamin, of sweet potato in leaves and petioles. **Plant and Cell Physiology**, Osaka, v.32, n.01, p.79-86, Jan. 1991.
- HATTORI, T.; NAKAGAWA, S.; NAKAMURA, K. High-level expression of tuberous root storage protein genes of sweet potato in stems of plantlets grown *in vitro* on sucrose medium. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v.14, n.3, p.595-604, 1990.

- HUSSEY, G.; STACEY, N.J. Factors affecting the formation of *in vitro* tubers of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Annals of Botany*, London, v.53, n.04, p.565-578, Apr. 1984.
- JAMESON, P.E.; McWHA, J.A.; HASLEMORE, R.M. Changes in cytokinins during initiation and development of potato tubers. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v.63, n.01, p.53-57, Jan. 1985.
- KWIATKOWSKI, S.; MARTIN, M.W.; BROWN, C.R.; SLUIS, C.J. Serial microtuber formation as a long-term conservation method for *in vitro* potato germoplasm. *American Potato Journal*, Orono, v.65, n.6, p.369-375, June 1988.
- LENTINI, Z.; EARLE, E.D. *In vitro* tuberization of potato clones from different maturity groups. *Plant Cell Reports*, Berlin, v.9, n.4, p.691-695, 1991.
- LEVY, D.; SEABROOK, J.E.A.; COLEMAN, S. Enhancement of tuberization of axillary shoot buds of potato (*Solanum tuberosum* L.) cultivars cultured *in vitro*. *Journal of Experimental Botany*, Oxford, v.44, n.259, p.381-386, Feb. 1993.
- MAESHIMA, M., SASAKI, T.; ASAHI, T. Characterization of major proteins in sweet potato tuberous roots. *Phytochemistry*, Oxford, v.24, n.9, p.1899-1902, 1985.
- MANTELL, H.S.; HUGO, S.A. Effects of photoperiod, mineral medium strength, inorganic ammonium, sucrose and cytokinin on root, shoot and microtuber development in shoot cultures of *Dioscorea alata* L. and *Dioscorea bulbifera* L. yams. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Dordrecht, v.16, n.1, p.23-42, Jan. 1989.
- MAUK, C.S.; LANGILLE, A.R. Physiology of tuberization in *Solanum tuberosum* L. *Plant Physiology*, Maryland, v.62, n.3, p.438-442, Sept. 1978.
- McDAVID, C.R.; ALAMU, S. The effect of growth regulators on tuber initiation and growth in rooted leaves of two sweet potato cultivars. *Annals of Botany*, London, v.45, n.3, p.363-364, Mar. 1980.
- MURASDHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v.15, n.3, p.473-497, 1962.
- NAKATANI, M. *In vitro* formation of tubers in sweet potato, *Japanese Journal of Crop Science*, Tóquio, V. 63, n.1, p.158-159, Mar. 1994.
- PALMER, C.E.; SMITH, O.E. Cytokinins and tuber initiation in potato *Solanum tuberosum* L. *Nature*, London, v.221, n.18, p.279-280, Jan. 1969.
- RUDALL, P. Lateral meristems and stem thickening growth in monocotyledons. *The Botanical Review*, New York, v.57, n.2, p.150-163, Apr./June 1991.

- SALISBURY, F.B.; ROSS, C.W. **Plant physiology**. 4<sup>th</sup> ed. Belmont: Publishing Company, 1992. 682p.
- SENGUPTA, J.; MITRA, G.C.; SHARMA, M. Organogenesis and tuberization in cultures of *Dioscorea floribunda*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrechst, v.3, n.3, p.321-331, Dec. 1984.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant physiology**. Redwood City: The Benjamim Cummings Publishing Company, 1991. 559p.
- TEIXEIRA, D.M.C. **Influência do N, sacarose, BAP e idade de plântula sobre a minituberização da batata (*Solanum tuberosum* L. cv. Bintje) *in vitro*** Lavras: ESAL, 1989. 55p. (Dissertação - Mestrado em Agronomia).
- TORREY, J.G.; LOOMIS, R.S. Auxin-cytokinin control of secondary vascular tissue formation in isolated roots of *Taphanus*. **American Journal of Botany**, Columbus, v.54, n.9, p.1098-1106, Oct. 1967.
- WANG, P.; HU, C. ***In vitro* mass tuberization and virus-free seed-potato production in Taiwan**. **American Potato Journal**, Orono, v.59, n1, p.33-37, Jan. 1982.
- WAREING, P.F.; PHILLIPS, I.D.J. **Growth and differentiation in plants**. 3<sup>th</sup> ed. Oxford, Pergamon Press, 1981. 338p.

### **CAPÍTULO 3**

## **EFEITO DO CCC, ABA E SUAS INTERAÇÕES COM ANA E BAP NA MICROTUBERIZAÇÃO DE *Ipomoea batatas* (L.) Lam.**

### **RESUMO**

O efeito de CCC e ABA na indução da tuberização *in vitro* de *Ipomoea batatas* (L.) Lam. cv. Brazlândia Branca foi estudado em dois experimentos. Em cada um destes experimentos, os fatores CCC e ABA foram avaliados isoladamente e em combinação com 21,48 $\mu$ M ANA e 88 $\mu$ M BAP. Em ambos foi constatado que os fatores isoladamente não tiveram efeito algum sobre a microtuberização deste cultivar. Por outro lado, em presença de ANA mais BAP, houve a formação de EST (estruturas semelhantes a tubérculos) nas raízes, porém muito pequenas e não se desenvolveram morfológicamente como uma raiz tuberosa típica. Estas, entretanto, não estavam relacionadas com o processo de tuberização *in vitro*, uma vez que a expressão do marcador protéico, uma proteína de reserva desta espécie denominada esporamina, em SDS-PAGE foi inexpressiva, indicando que as EST constituíram apenas um incipiente crescimento secundário radicular induzido pelos reguladores de crescimento presentes no meio.

### 3.1 REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1.1 Cloreto de 2-cloroetilmetilamônio

As giberelinas (GA's) são uma classe de substâncias reguladoras de crescimento que ocorrem em todos os vegetais, atuando na germinação de sementes, florescimento, desenvolvimento de frutos partenocárpicos e, principalmente, no crescimento da parte aérea onde atua a nível de divisão e alongamento celular (Horgan, 1984; Salisbury e Ross, 1992). Pelo fato das GA's estimularem o crescimento de órgãos, geralmente reprimem os processos de indução-iniciação de órgãos (Murashige, 1974).

Segundo Vreugdenhil e Struik (1989), em *Solanum tuberosum* as GA's previnem, inibem ou retardam a iniciação da formação dos tubérculos. Porém, sob condições de dias curtos, quando então ocorre naturalmente redução do nível endógeno de GA's, ocorrem dois efeitos: redução do crescimento da parte aérea e a possibilidade de iniciação dos tubérculos. Entretanto, segundo estes mesmos autores, não se pode afirmar que a redução no teor de GA's *per si* seja o fator preponderante no processo de iniciação da tuberização, podendo ter apenas efeito inibitório enquanto que outros fatores teriam efeitos regulatórios indutivos sobre este processo.

Artificialmente a redução do nível endógeno de GA's pode ser induzida pela aplicação de diversos retardadores de crescimento, dentre os quais podemos citar diaminozida (ácido mono(dimetilhidrezida) butanedóico), ancimidol (álcool a-ciclo propil-4-metoxi-(piridimina-5-il)-benzil), paclobutrazol ((2RS, 3RS)-1-(4-clorofenil)-4,4-dimetil-2-(1,2,4-triazol-1-il) pentan-3-ol) e CCC ou cloromequat (cloreto de 2-cloroetilmetilamônio) às plântulas (Harvey *et al.*, 1991). No caso específico de CCC, esta substância inibe a biossíntese de

GA's, atuando sobre esta rota impedindo as reações de conversão de geranyl-geranyl pirofosfato a copalil pirofosfato e este a ent-caureno (Horgan, 1984; Salisbury e Ross, 1992).

Desta forma, diversos pesquisadores têm procurado estudar o comportamento do CCC sobre o processo de tuberização em diversas espécies, sendo o gênero *Solanum* o mais estudado. Dentre diversos trabalhos nesta área pode-se citar Estrada, Tovar e Dodds (1986) que induziram a formação de tubérculos *in vitro* em diversos genótipos de *Solanum tuberosum* cultivados em meio líquido aumentando a concentração de BAP e sacarose no meio de cultivo e adicionando CCC a esse mesmo meio.

Hussey e Stacey (1984), trabalhando com diversos cultivares de *Solanum tuberosum*, verificaram que a presença de GA's no meio de cultivo foi inibitório ao crescimento de tubérculos, tendo sido constatado inclusive seu efeito antagônico ao processo promovendo reversão morfológica do crescimento e desenvolvimento dos internódios em direção à parte aérea. Estes mesmos autores verificaram também o efeito da adição de CCC, na concentração de 500 a 1000 mg.L<sup>-1</sup>, ao meio de cultivo sobre a tuberização, tendo constatado seu efeito indutor sobre o processo, principalmente sob condições de dias curtos. Além disso, quando ao meio também foi adicionado BAP, o estímulo à tuberização foi maior.

Garcia-Torres e Gomez-Campo (1973) verificaram o efeito inibitório das GA's na tuberização *in vitro* de *Solanum* e citam que Okazawa (1959) e Tizio (1964) relataram este mesmo comportamento das GA's neste processo e que Tizio (1964) ainda constatou efeito indutor do CCC nas mesmas condições, promovendo tuberização rápida do material testado.

Harvey *et al.* (1991) trabalharam com diversas substâncias retardadoras do crescimento visando incrementar a formação de microtubérculos de *Solanum tuberosum*, tendo comprovado o efeito indutor do CCC no processo, acrescentando ainda que houve correlação

entre a concentração de CCC utilizada e o cultivar de *Solanum* testado, podendo em alguns casos ser mais ou menos eficiente.

O efeito antagônico das GA's à microtuberização de *Solanum* foi estudado a nível protéico por Hannapel, Miller e Park (1985) pela detecção da proteína denominada "patatina" que é encontrada em maiores concentrações nos tubérculos de *Solanum*, utilizando eletroforese em gel de poliacrilamida. Estes pesquisadores constataram que, quando o material vegetal foi tratado com GA's, houve reversão a nível bioquímico dos eventos relacionados com a tuberização mesmo após sua iniciação, ou seja, houve inicialmente produção desta proteína específica e, após este tratamento, houve a degradação da mesma não por efeito inibitório *per si* mas, possivelmente, por aumento da força de outros drenos.

No entanto, especificamente com *Ipomoea batatas*, há carência de informações na literatura disponível sobre a influência de CCC no processo de formação de raízes tuberosas tanto *in vivo* quanto *in vitro*. O único trabalho encontrado na literatura disponível foi o de McDavid e Alamu (1980) que estudaram o efeito da aplicação foliar de giberelina na produção de minitubérculos em folhas enraizadas *in vivo* dessa espécie e constataram que folhas tratadas com GA<sub>3</sub> produziram menos tubérculos do que o próprio controle que não sofreu tratamento algum, sugerindo que as GA's retardariam o desenvolvimento de tubérculos, acumulando as reservas no pecíolo. Neste mesmo trabalho, estes pesquisadores também aplicaram CCC às folhas visando avaliar o efeito deste inibidor de síntese de GA's sobre o processo de tuberização e constataram que, embora houvesse ocorrido maior produção de minitubérculos quando comparado com o tratamento com GA's, estes ainda foram inferiores ao controle, ou seja, havia pouco efeito do CCC sobre a tuberização em folhas enraizadas de *Ipomoea batatas*.

Em assim sendo, por este experimento procurou-se estudar a influência de CCC na tuberização *in vitro* de *Ipomoea batatas*.

### 3.1.2 Ácido Abscísico

Outro fator estudado foi a influência do ácido abscísico (ABA) no processo de tuberização. Além dos diversos efeitos do ABA sobre a fisiologia vegetal, dentre os quais pode-se citar a dormência de gemas, controle da abertura/fechamento estomático, influência sobre a síntese protéica e abscisão de órgãos (Taiz e Zeiger, 1991; Salisbury e Ross, 1992), verifica-se relação com a senescência da planta de maneira generalizada.

Segundo Pharis e Reid (1985), as plantas que apresentam como órgãos de reserva os tubérculos (como plantas do gênero *Solanum*) ou raízes tuberosas (como plantas do gênero *Ipomoea* e *Dioscorea*) são estimuladas a acumularem suas reservas nesses órgãos como processo que possibilita a perpetuação da espécie, principalmente quando a planta entra no processo de senescência que ocorre ao final do ciclo, justamente na fase em que ocorre maior acúmulo de ABA nos tecidos.

Diversos autores têm estudado o efeito do ABA sobre o processo de tuberização, dentre os quais Jean e Cappodocia (1992) que estudaram o efeito interativo do ABA e fotoperíodo na microtuberização de *Dioscorea alata*, tendo constatado que com fotoperíodo de 8h luz, embora a quantidade de microtubérculos produzidos permanecesse constante, à medida em que aumentou a concentração de ABA no meio de cultura, houve acréscimo no peso médio dos microtubérculos. Por outro lado, sob 16h luz não houve este efeito do ABA no peso médio dos microtubérculos produzidos. Estes autores ainda citam que Ammirato (1982) conseguiu induzir a

tuberização *in vitro* de *Dioscorea alata* e *Dioscorea bulbifera* com  $1\mu\text{M}$  de ABA sob luz contínua.

Wareing e Jennings (1980), citados por Vreugdenhil e Struik (1989), avaliaram o possível envolvimento de ABA na tuberização de *Solanum tuberosum*. Estes pesquisadores, trabalhando com folhas destacadas de plantas que se encontravam sob condições indutivas, verificaram que houve a iniciação da tuberização quando a folha permaneceu ligada ao pecíolo. Entretanto, quando a folha foi separada do pecíolo, não houve sua tuberização, efeito este que foi revertido pela aplicação de ABA ao local onde a folha se encontrava ligada ao pecíolo. Verificaram ainda que este processo não ocorreu nestas partes da planta quando esta não se encontrava submetida a condições indutoras, independentemente da aplicação exógena de ABA ou não, indicando que este fitohormônio participa do processo, mas que não age isoladamente e sim interagindo com algum(s) outro(s) fator(es) que deve(m) estar relacionado(s) com o processo.

Hussey e Stacey (1984) avaliaram o efeito da aplicação de ABA sobre a microtuberização de *Solanum tuberosum*, variando a concentração de ABA de  $0,015$  a  $32\text{ mg.L}^{-1}$ . Quando testaram ABA isoladamente, verificaram que na concentração entre  $0,015$  e  $0,060\text{ mg.L}^{-1}$  ABA, houve ligeiro acréscimo tanto em número quanto em peso da matéria fresca com 3% e 6% de sacarose no meio de cultivo porém, nas concentrações acima de  $0,25\text{ mg.L}^{-1}$  ABA, houve redução em número e em peso da matéria fresca dos microtubérculos produzidos. Quando combinado com BAP, a adição de ABA ao meio de cultivo, em qualquer concentração, promoveu a redução dos mesmos parâmetros, ou seja, ABA não apresentou, nas condições testadas, efeito indutivo sobre o processo de tuberização *in vitro* de *Solanum tuberosum*.

Em se tratando de *Ipomoea batatas*, o único trabalho encontrado foi de Nakatani (1994) que estudou a tuberização *in vitro* de raízes destacadas de plântulas desta espécie, tratando

parte da raiz com determinada combinação de reguladores de crescimento em meio sólido e outra parte com outra combinação em meio líquido, não tendo obtido a diferenciação de microtubérculos no tratamento em que adicionou ABA (0,1 $\mu$ M) com BA (1 $\mu$ M) ao meio líquido.

Desta forma, verifica-se que há carência de trabalhos na literatura consultada abordando a influência na indução da diferenciação da raízes tuberosas *in vivo* e *in vitro* em *Ipomoea batatas*, razão pela qual se desenvolveu este experimento.

### 3.2 OBJETIVOS

Os objetivos destes experimentos foram avaliar a influência do inibidor da biossíntese de giberelina (CCC), isoladamente ou em combinação com ANA e BAP e a influência de ABA, nas mesmas condições, na indução de microtubérculos de *Ipomoea batatas*.

### 3.3 MATERIAL E MÉTODOS

Foram realizados dois experimentos no Laboratório de Cultura de Tecidos da Universidade Federal de Lavras (MG): o primeiro com CCC e o segundo com ABA. Em ambos os experimentos as plântulas foram cultivadas em sala de crescimento com fotoperíodo de 16h luz/ 8h escuro, temperatura  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  e radiação fotossinteticamente ativa (RFA) em torno de  $42\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , com lâmpadas GE de 40W luz do dia especial.

Nos dois experimentos foram utilizados como explantes plântulas inteiras de *Ipomoea batatas* (L.) Lam. cv. Brazlândia Branca (BB) com 30 dias de idade crescidas em meio Murashige e Skoog (1962) com 6% p/v de sacarose e 0,45% p/v de ágar, segundo Levy,

Seabrook e Coleman (1993), estando as mesmas em tubos de ensaio de 150 mm x 28 mm contendo cada tubo 15 mL de meio.

No primeiro experimento, os tratamentos utilizados foram três concentrações de CCC (1, 10 e 100 ppm v/v) combinados com e sem 21,48 $\mu$ M ANA mais 88 $\mu$ M BAP, os quais foram aplicados assepticamente sobre o meio 30 dias após subcultivo, além do controle com e sem esses reguladores de crescimento, num total de oito tratamentos. Após a aplicação dos tratamentos, os tubos foram fechados com fita plástica e transferidos para a mesma sala de crescimento de onde os explantes foram retirados. O delineamento estatístico utilizado foi inteiramente casualizado com quatro repetições, sendo cada repetição composta por quatro plântulas.

No segundo experimento, os tratamentos foram três concentrações de ABA (0,1; 1 e 10 $\mu$ M) também interagidas com e sem ANA e BAP nas mesmas concentrações utilizadas no experimento anterior, inclusive com o controle e, para a aplicação dos tratamentos, procedeu-se de modo idêntico ao acima mencionado. O delineamento estatístico utilizado também foi inteiramente casualizado com quatro repetições, sendo cada repetição composta por quatro plântulas.

Ao final de cada experimento, que corresponde a 68 e 88 dias para o primeiro e segundo experimentos, respectivamente, procedeu-se a desmontagem dos mesmos, fazendo-se as avaliações de produção de estruturas no sistema radicular (número e peso da matéria fresca), da parte aérea (peso da matéria fresca, seca, comprimento, número de folhas senescentes e folhas metabolicamente ativas) e do sistema radicular (peso da matéria fresca e seca). As EST (estruturas semelhantes a tubérculos) foram armazenadas a -4°C. Procedeu-se a extração de proteínas macerando-se as estruturas em solução tampão conforme descrito por Hattori, Nakagawa e

Nakamura (1990). O sobrenadante foi usado para quantificar a proteína total segundo Bradford (1976), tendo como padrão BSA (soro bovino albumina). Visando identificar a presença de esporamina, o sobrenadante foi submetido à eletroforese em gel descontínuo de poliacrilamida com SDS (SDS-PAGE) a 12%, segundo esses mesmos autores.

A quantificação das bandas protéicas expressas no gel foi realizada utilizando-se o Biomed Instruments Densitometer.

### 3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.4.1 Cloreto de 2-cloroetilmetilamônio

Os resultados do CCC isoladamente e combinados com ANA mais BAP sobre a microtuberação de *Ipomoea batatas* encontram-se na Tabela 3.

Verifica-se pelos dados da Tabela 3 que o CCC isoladamente não teve efeito nenhum sobre a tuberação *in vitro* dessa espécie, independentemente da concentração utilizada, visto que não houve produção de estruturas nos sistemas radiculares. Porém, quando ao meio foi adicionado ANA juntamente com BAP, houve produção de estruturas nas raízes (EST), independentemente de estarem na ausência ou presença de CCC nas menores concentrações (0, 1 e 10 ppm v/v), indicando não haver efeito interativo do CCC com os reguladores de crescimento testados sobre o processo de microtuberação de batata-doce nestas concentrações, uma vez que a quantidade de estruturas produzidas nas raízes não diferiram significativamente entre si. Entretanto, na concentração mais elevada de CCC (100 ppm v/v), esse produto foi extremamente tóxico, provocando a morte das plântulas, o que se verifica na Tabela 2 pelo reduzido peso da

matéria fresca tanto das raízes quanto da parte aérea, não possibilitando o desenvolvimento de estruturas (EST) nas raízes.

Observa-se também que houve produção de calos quando ao meio foram adicionados 21,48 $\mu$ M ANA e 88 $\mu$ M BAP porém, estes não eram provenientes das raízes das plântulas e sim de tecidos localizados na base dos explantes que deram origem às plântulas.

TABELA 3. Valores Médios da Percentagem de Plântulas de Batata-doce com EST (PL.C/ EST); Número de Estruturas (NUM.EST) e de Calos Produzidos (NUM.CALOS); Peso da Matéria Fresca das Estruturas (PMF.EST) e dos Calos (PMF.CALOS); Peso da Matéria Seca da Parte Aérea (PMSPA) e das Raízes (PMSR) e Particionamento de Matéria Fresca para o Sistema Radicular (PART) ao final de 68 dias.

Trat	CCC (ppm)	A+B <sup>1</sup>	PL.C/EST (%)	NUM.EST	PMF.EST (mg)	NUM Calos	PMF Calos (mg)	PMSPA (mg)	PMSR (mg)	PART <sup>2</sup> (%)
1	0	-	0	0 B	0	0	0	143,8 BC	49,8 B	26,30 B
2	0	+	93,75	9,67 A	9,01	1	422,8	185,5 A	67,3 A	44,88 A
3	1	-	0	0 B	0	0	0	147,2 BC	36,5 BC	21,07 B
4	1	+	93,75	9,33 A	5,96	1	357,3	175,5 AB	45,8 BC	39,08 A
5	10	-	0	0 B	0	0	0	124,4 C	31,2 C	23,45 B
6	10	+	93,75	8,94 A	7,17	1	410,3	166,7 AB	39,4 BC	41,15 A
7	100	-	0	0 B	0	0	0	30,7 D	10,9 D	41,65 A
8	100	+	0	0 B	0	0	0	37,1 D	15,4 D	45,67 A
D.M.S.				2,21	-	-	-	32,6	15,7	9,80

1 - A+B = 21,48 $\mu$ MANA + 88 $\mu$ MBAP

2 - Para o cálculo da percentagem da matéria fresca nas raízes, tornam-se a soma dos pesos da matéria fresca propriamente ditas (PMFR), das estruturas (PMFE) e dos calos (PMFC) produzidos em relação ao peso da matéria fresca total (PMFT) - Anexo 1.

Os valores sugeridos da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Analisando-se os dados da Tabela 3 e a Figura 7, pode-se notar que, para uma mesma concentração de CCC, quando ao meio foi adicionado ANA mais BAP, houve redirecionamento da matéria fresca para o sistema radicular como um todo, indicando assim que o CCC isoladamente não foi capaz de redirecionar o dreno metabólico para as raízes e sim, que os reguladores de crescimento presentes no meio é que induziram este processo. De acordo com estes dados sobre o redirecionamento do dreno metabólico e pelo insignificante efeito do CCC na microtuberização dessa espécie, pode-se concluir que a formação destas estruturas deu-se em função do ANA e BAP presentes no meio e não do CCC e que este não apresentou, para *Ipomoea batatas*, efeito sinérgico sobre o processo de tuberização *in vitro*.

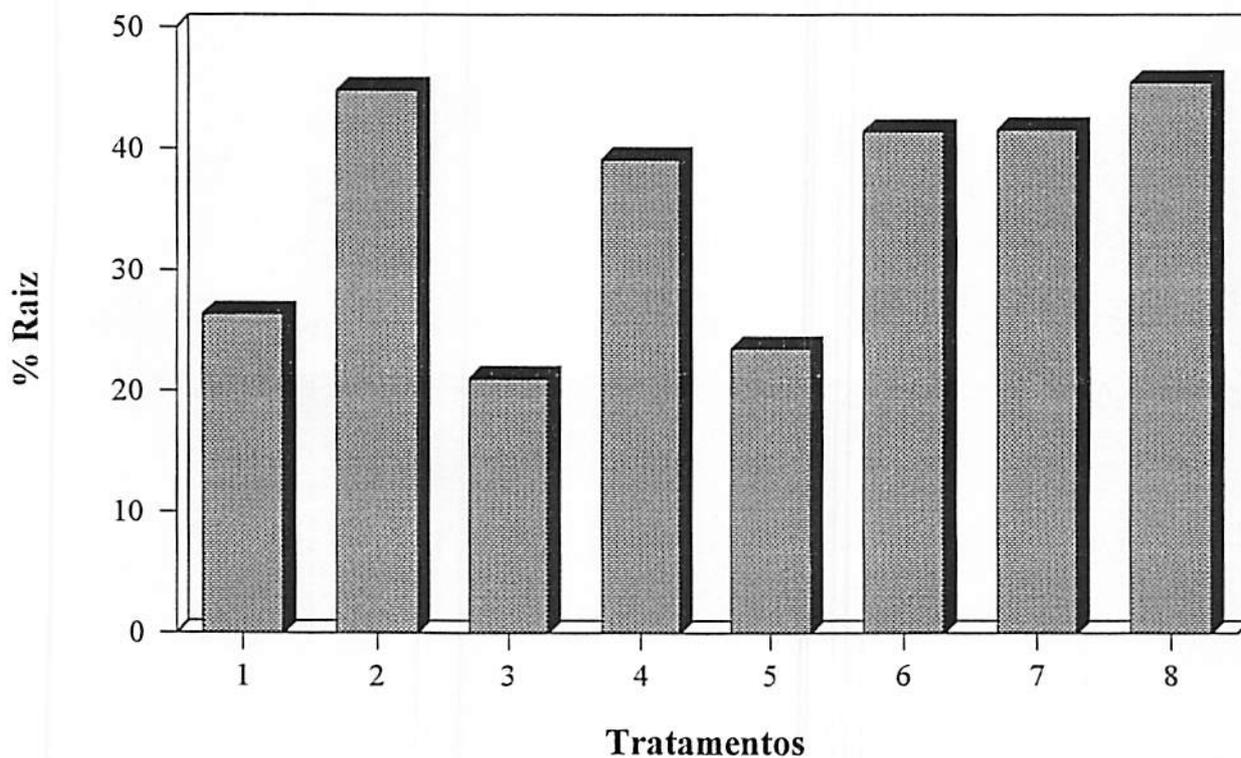


FIGURA 7. Percentagem da matéria fresca no sistema radicular como um todo em relação ao peso da matéria fresca total nos diversos tratamentos.

Pode-se ainda verificar que as estruturas formadas não apresentaram tendência de comportamento e que as mesmas eram muito pequenas com diâmetro variando de 1 a 2 mm, pesando de 5,96 a 9,01 mg e apresentando formato geralmente arredondado e não o de raízes tuberosas típicas de *Ipomoea batatas* (Figura 8). Mesmo assim, com a finalidade de verificar se estava ocorrendo algum processo relacionado com a tuberização, procedeu-se a extração de proteínas solúveis totais segundo a metodologia proposta por Hattori, Nakagawa e Nakamura (1990), utilizando a técnica de SDS-PAGE a 12%, conforme apresentado na Figura 9.

Nota-se a nítida expressão de esporamina nos tubérculos de batata-doce obtidos do campo (coluna 2) com peso molecular em torno de 25 KDa a qual se destacou com uma banda mais nítida, uma vez que esta proteína corresponde a aproximadamente 60-80% da proteína total das raízes tuberosas dessa espécie (Maeshima, Sasaki e Asaki, 1985). Observa-se também que nos tratamentos com ABA (coluna 6) e CCC (coluna 7), ambos combinados com ANA mais BAP e em presença de sacarose, houve acúmulo em ambos os tratamentos de proteínas de 25 KDa, sugerindo a expressão da esporamina nestas estruturas (EST), porém em quantidades ínfimas. Entretanto, utilizando-se como controle a parte aérea (coluna 3) e raízes (coluna 4) de plântulas de batata-doce cultivadas *in vitro* em meio sem sacarose e raízes também *in vitro* porém com sacarose no meio de cultura (coluna 5), todos sem reguladores de crescimento, observa-se que nas duas primeiras situações não houve a expressão da esporamina mas que, nas raízes em presença de sacarose, essa proteína se expressou, indicando a influência da sacarose sobre esse processo, conforme reportado por Hattori, Nakagawa e Nakamura (1990) e Hattori *et al.* (1991). Pela densitometria (dados não apresentados) pode-se verificar que a expressão da esporamina no tratamento com CCC combinado com ANA mais BAP em presença de sacarose, foi estatisticamente diferente do tratamento de raízes de plântulas de batata-doce em presença



FIGURA 8. Estruturas semelhantes a tubérculos (EST) produzidas nos tratamentos com CCC e ABA combinados com ANA e BAP.

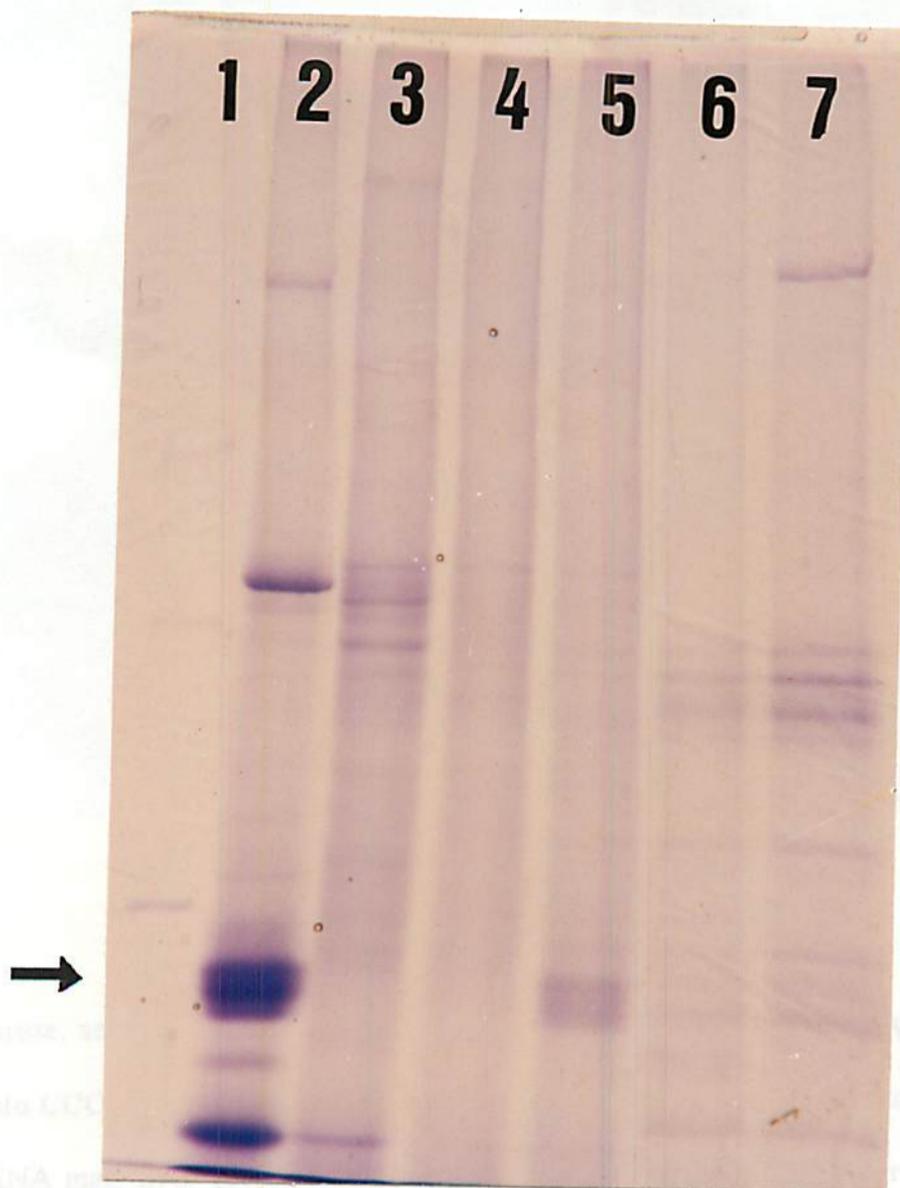


FIGURA 9. Gel de poliacrilamida descontínuo a 12% com SDS, corado com Coomassie Blue, apresentando os marcadores protéicos com pesos moleculares definidos (coluna 1); raízes tuberosas de batata-doce cultivadas no campo (coluna 2); parte aérea de plântulas de batata-doce cultivadas *in vitro* sem sacarose (coluna 3); raízes de plântulas de batata-doce cultivadas *in vitro* sem sacarose (coluna 4); raízes de plântulas de batata-doce cultivadas *in vitro* com sacarose (coluna 5); estruturas (EST) radiculares produzidas em meio com ABA (coluna 6) e CCC (coluna 7), ambos combinados com ANA mais BAP.

das plântulas comparado com o controle, exceto na sua maior concentração testada, tanto em termos de peso da matéria seca da parte aérea quanto das raízes, porém com uma tendência de redução deste parâmetro nas dosagens mais elevadas, culminando com a sua morte na maior concentração de CCC. Numa análise dos tratamentos na presença de CCC com ANA mais BAP, observa-se também que houve redução da produção da matéria seca, tanto da parte aérea quanto do sistema radicular, embora houvesse ocorrido maior produção de matéria seca quando comparado com os tratamentos em que somente CCC foi aplicado, evidenciando o efeito dos reguladores de crescimento presentes no meio de indução, os quais estariam estimulando a



somente de sacarose, sendo a expressão deste maior do que daquele. Estas informações sugerem que no tratamento CCC, embora tenha ocorrido ligeiro crescimento secundário radicular, este foi em função de ANA mais BAP presente no meio e que o CCC interferiu negativamente sobre o processo, uma vez que a quantidade de esporamina presente neste tratamento foi inferior ao controle raiz com sacarose sem ANA mais BAP.

Baseando-se nessas considerações e como sugerido pela morfologia das estruturas produzidas, pode-se inferir que a presença da esporamina nos tratamentos com CCC foram em função da sacarose e não dos reguladores de crescimento presentes no meio. Portanto, as estruturas obtidas nos tratamentos com CCC mais ANA e BAP não estavam relacionadas com a tuberação *in vitro* de batata-doce e faz-se necessário um estudo mais detalhado deste processo como um todo.

Em relação à produção de matéria seca (Figura 10), observa-se nos tratamentos em que CCC foi ministrado isoladamente que não houve influência significativa sobre o crescimento das plântulas comparado com o controle, exceto na sua maior concentração testada, tanto em termos de peso da matéria seca da parte aérea quanto das raízes, porém com uma tendência de redução deste parâmetro nas dosagens mais elevadas, culminando com a sua morte na maior concentração de CCC. Numa análise dos tratamentos na presença de CCC com ANA mais BAP, observa-se também que houve redução da produção da matéria seca, tanto da parte aérea quanto do sistema radicular, embora houvesse ocorrido maior produção de matéria seca quando comparado com os tratamentos em que somente CCC foi aplicado, evidenciando o efeito dos reguladores de crescimento presentes no meio de indução, os quais estariam estimulando a produção de matéria seca total.

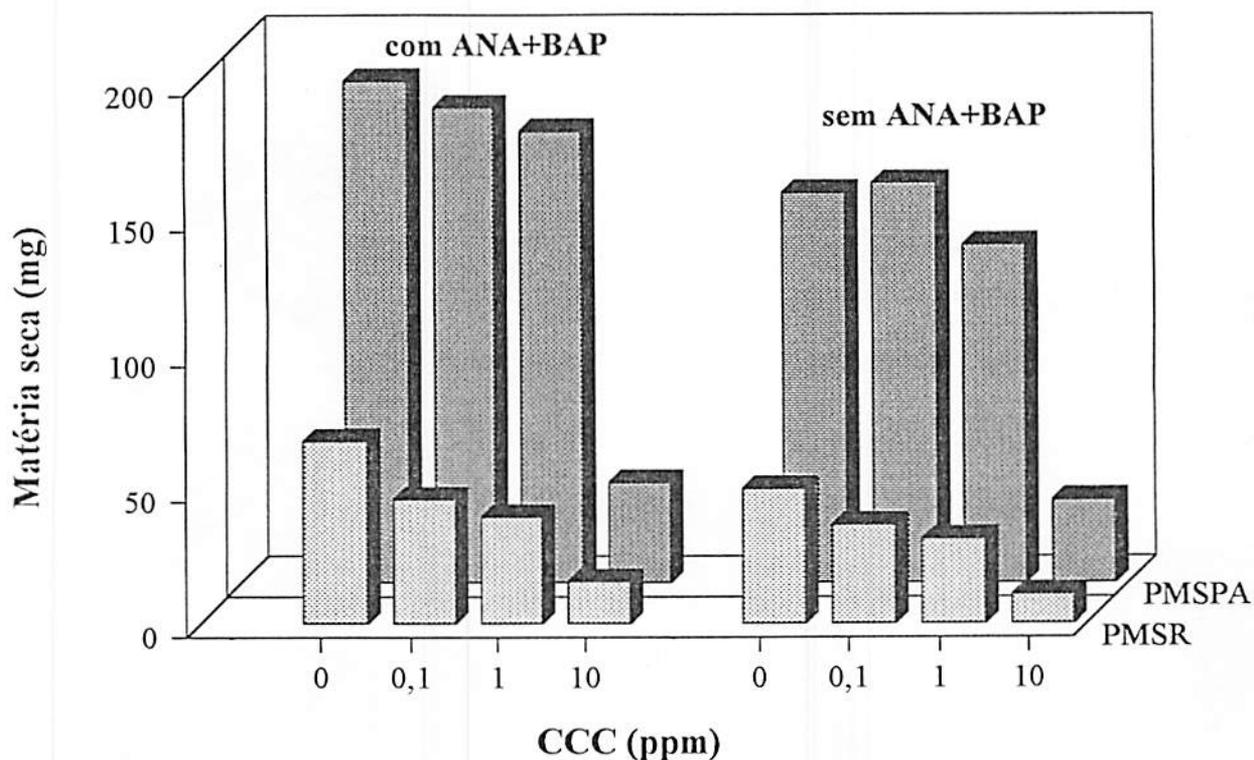


FIGURA 10. Produção de matéria seca da parte aérea (PMSPA) e das raízes (PMSR) nos diferentes tratamentos.

Em relação à produção de EST, os resultados obtidos assemelham-se às respostas encontradas por McDavid e Alamu (1980) os quais, embora trabalhando com folhas enraizadas *in vivo* de *Ipomoea batatas*, constataram que quando foi feita aplicação via foliar de CCC, houve efeito inibitório deste sobre a tuberização das folhas, uma vez que os minitubérculos produzidos eram, em número, inferiores ao controle. Entretanto, estes pesquisadores não detectaram a(s) causa(s) primária(s) da indução da tuberização, uma vez que inclusive o controle tuberizou.

Por outro lado, aumentando-se a concentração de CCC, principalmente na maior concentração, houve redução da produção da matéria seca, resultado este esperado e comprovado por outros pesquisadores, dentre os quais pode-se citar Menzel (1980) que, embora trabalhando com *Solanum tuberosum*, verificou o efeito do CCC sobre a tuberização *in vivo* desta espécie,

tendo constatado que aumentando a concentração de CCC no meio, houve redução do crescimento da parte aérea. Contrastando com os resultados do presente experimento com *Ipomoea batatas*, *Solanum tuberosum* respondeu positivamente à aplicação exógena de CCC isoladamente, ocorrendo um estímulo substancial para a planta tuberizar em condições inibitórias ao processo, ou seja, em elevadas temperaturas. Por essa razão evidenciou-se que as diversas espécies respondem de maneira específica e individualizada aos estímulos aos quais são submetidas.

Constatou-se também que, quando ao meio foi adicionado ANA e BAP havia a produção de EST nas raízes, sem efeito significativo da combinação com CCC sobre sua produção. Embora não se tenha encontrado na literatura disponível referências a este assunto em *Ipomoea batatas*, existem trabalhos relativos a *Solanum tuberosum* como o trabalho de Estrada, Tovar e Dodds (1986) no qual eles induziram a microtuberização em uma grande quantidade de genótipos desta espécie adicionando BAP, CCC e aumentando a concentração de sacarose no meio. Harvey *et al.* (1991) constataram a relação CCC e BAP na microtuberização de *Solanum tuberosum* em diversos cultivares. Para o cultivar Cara houve 100% de tuberização das plântulas no meio suplementado com BAP sem CCC, porém, a adição de CCC a este meio causou uma redução de 60% na percentagem de tuberização. Entretanto, com o cultivar Desirre, no meio sem CCC houve aproximadamente 50% das plântulas tuberizadas; quando o meio foi suplementado com CCC na concentração de 1mM, houve 100% de tuberização, indicando que, além da variabilidade de resposta interespecífica, existe também variabilidade intraespecífica.

Lentini e Earle (1991) relataram também a influência do CCC juntamente com BAP na microtuberização de diferentes clones de *Solanum tuberosum*. Estes pesquisadores observaram que quando plântulas foram induzidas a tuberizarem, reduzindo-se a concentração de CCC de

500 mg.L<sup>-1</sup> para 250 mg.L<sup>-1</sup>, houve atraso de, aproximadamente, sete dias na tuberização com formação de menor número de microtubérculos de maior tamanho comparativamente com a maior concentração de CCC.

Em última análise, verificou-se um resultado não esperado no controle (Tratamento 1: 0 ppm v/v CCC; 21,48µM ANA; 88µM BAP); esperava-se a formação de EST mais bem conformadas de acordo com os resultados do experimento anterior (Capítulo II) e de testes preliminares satisfatórios (dados do autor não apresentados), mas que não se desenvolveram no decorrer do experimento por razões desconhecidas. Assim, a metodologia utilizada para indução dos tratamentos: redução da concentração de ágar no meio de 0,70% para 0,45% visando tornar o meio mais aerado e poroso, o que facilitaria a penetração dos reguladores de crescimento no meio, não se mostrou satisfatória para a indução da microtuberização em *Ipomoea batatas*, embora esta estratégia tenha se mostrado satisfatória para microtuberização de *Solanum tuberosum* conforme relatam Levy, Seabrook e Coleman (1993).

### 3.4.2 Ácido Abscísico

Os resultados do ABA isolados e combinados com ANA mais BAP sobre a microtuberização de *Ipomoea batatas* encontram-se na Tabela 4.

Pela Tabela 4 verifica-se que, em se tratando de *Ipomoea batatas* (L.) Lam. cv. BB, o ABA isoladamente não proporcionou efeito algum sobre a sua tuberização *in vitro*, independentemente da concentração utilizada. Entretanto, quando ao meio foi adicionado 21,48µM ANA e 88µM BAP nas diversas concentrações de ABA, houve a produção de estruturas (EST) nos sistemas radiculares destas plântulas, bem como a produção de calos. Estes calos,

TABELA 4. Valores Médios da Percentagem de Plântulas de Batata-doce com Estruturas (PL.C/EST); Número de Estruturas (NUM.EST) e de Calos Produzidos (NUM.CALOS); Peso da Matéria Fresca das Estruturas (PMF.EST) e dos Calos (PMF.CALOS); Peso da Matéria Seca da Parte Aérea (PMSPA) e das Raízes (PMSR) e Particionamento de Matéria Fresca para o Sistema Radicular (PART) ao final de 88 dias.

Trat	ABA ( $\mu$ M)	A+B <sup>1</sup>	PL.C/EST (%)	NUM.EST	PMF.EST (mg)	NUM Calos	PMF Calos (mg)	PMSPA (mg)	PMSR (mg)	PART <sup>2</sup> (%)
1	0	-	0	0 B	0	0	0	109,9 DE	41,3 AB	27,70 CD
2	0	+	100	10,44 A	15,72	1	453,2	175,8 ABC	57,8 A	51,51 B
3	0,1	-	0	0 B	0	0	0	121,6 CDE	40,2 ABC	26,17 D
4	0,1	+	100	10,50 A	9,80	1	670,8	185,9 AB	51,5 AB	52,33 B
5	1	-	0	0 B	0	0	0	108,1 DE	33,8 BC	27,33 CD
6	1	+	100	15,88 A	12,62	1	675,8	197,3 A	34,0 BC	52,11 B
7	10	-	0	0 B	0	0	0	73,5 E	32,3 BC	37,49 C
8	10	+	100	12,19 A	10,51	1	1214,3	138,9 BCD	19,4 C	64,86 A
D.M.S.				7,37	-	-	-	54,9	21,1	10,78

1 - A+B = 21,48 $\mu$ M ANA + 88 $\mu$ M BAP

2 - Para o cálculo da percentagem da matéria fresca nas raízes, tomam-se a soma dos pesos da matéria fresca propriamente ditas (PMFR), das estruturas (PMFE) e dos calos (PMFC) produzidos em relação ao peso da matéria fresca total (PMFT) - Anexo 1.

Os valores seguidos da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

porém, eram advindos da proliferação celular desordenada de tecidos localizados nas bases dos explantes que deram origem às plântulas e não nas raízes propriamente ditas. Desta forma, pode-se concluir que as estruturas formadas nas raízes foram em função do ANA mais BAP adicionados ao meio e não em função do ABA e que este sequer apresentou algum efeito interativo com os reguladores de crescimento testados.

Em relação ao particionamento da matéria fresca, verifica-se pela figura 11 que para uma mesma concentração de ABA, este não apresentou efeito sobre o redirecionamento da

matéria fresca produzida para o sistema radicular, exceto na maior concentração, sendo este redirecionamento em função dos reguladores de crescimento presentes no meio. Assim sendo, pode-se concluir que ANA mais BAP, nas concentrações testadas, é que promoveram o redirecionamento do dreno metabólico para o sistema radicular.

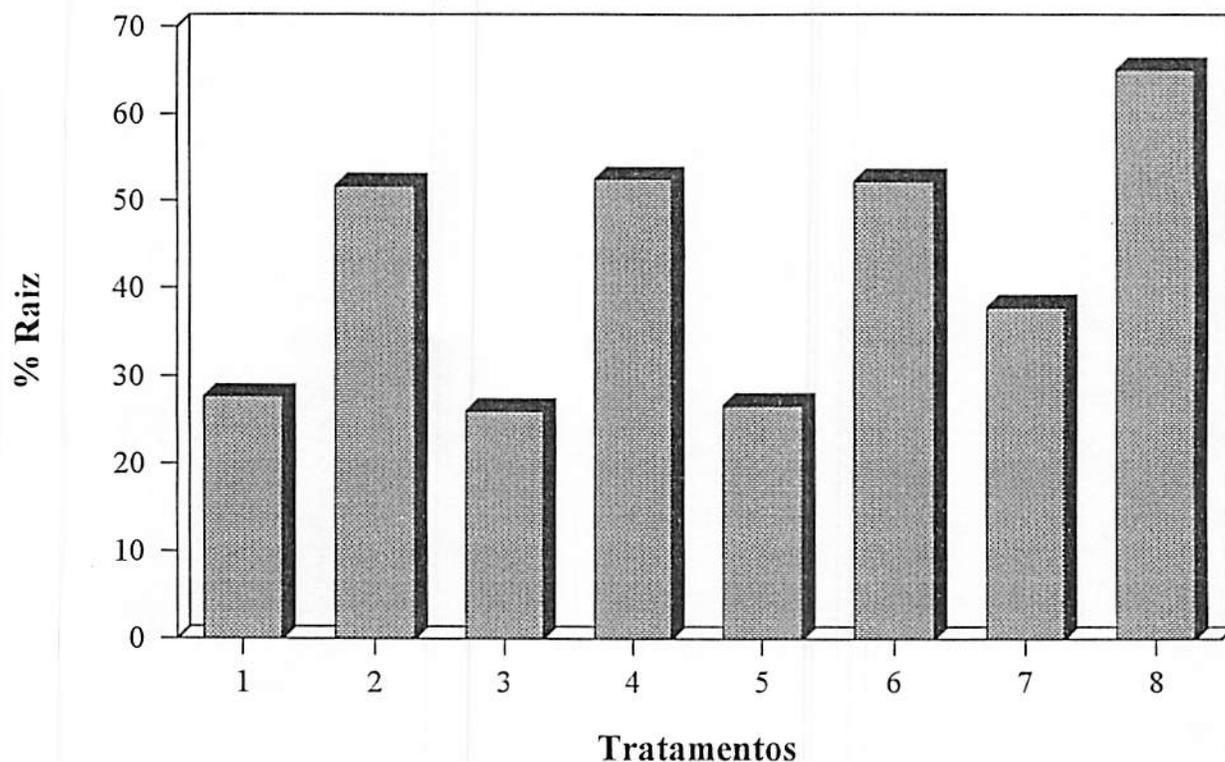


FIGURA 11. Percentagem da matéria fresca no sistema radicular como um todo em relação ao peso da matéria fresca total nos diversos tratamentos.

Apesar de ter ocorrido alteração morfológica do sistema radicular nos tratamentos com ABA mais ANA e BAP, as estruturas formadas eram geralmente arredondadas, muito pequenas com diâmetro variando de 1 a 3 mm, e peso médio da matéria fresca em torno de 12 mg. Houve reduzido crescimento secundário de determinadas regiões das raízes que, no entanto, não

resultaram na formação de raízes típicas de *Ipomoea batatas*, e sim de crescimentos secundários incipientes isolados nas raízes.

Assim sendo, visando comprovar se essas estruturas eram realmente raízes tuberosas ou não, apesar da sua morfologia e tamanho, procedeu-se a extração de proteína total através da metodologia proposta por Hattori, Nakagawa e Nakamura (1990) utilizando a técnica de SDS-PAGE em gel a 12% (Figura 9).

Verifica-se por este gel que no tratamento com ABA combinado com ANA mais BAP (coluna 6) houve a expressão de uma banda protéica muito fraca em torno de 25 KDa, a qual provavelmente corresponde à esporamina. Entretanto, comparando-a com o controle raiz de batata-doce *in vitro* em meio MS sem reguladores de crescimento mas com sacarose (coluna 5), verifica-se a influência marcante da sacarose na indução da expressão desta proteína de reserva da batata-doce, a qual não se expressou em raízes *in vitro* sem reguladores de crescimento e sem sacarose no meio (coluna 4). Desta forma, pode-se inferir que, embora possa ter ocorrido crescimento secundário em determinados pontos do sistema radicular, estes não estavam relacionados com o processo de microtuberização dessa espécie. Da mesma forma como analisado para o tratamento com CCC, o tratamento com ABA mais ANA e BAP em presença de sacarose houve a expressão da esporamina, a qual foi constatada pela densitometria em quantidade significativamente inferior ao controle raiz de batata-doce *in vitro* sem ANA mais BAP, somente com sacarose, possibilitando-se assim inferir que o ABA influenciou negativamente sobre o acúmulo e expressão desta proteína de reserva. Observa-se também que houve a indução de proteínas com pesos moleculares semelhantes nos tratamentos com ABA e CCC combinados com ANA mais BAP, com exceção de uma banda de peso molecular mais elevado.

Em relação à produção de matéria seca da parte aérea (Figura 12), verifica-se que na ausência de ANA e BAP, o ABA, nas concentrações de 0,1 e 1 $\mu$ M, não influenciou no crescimento e desenvolvimento das plântulas com produção praticamente igual ao controle (0 $\mu$ M ABA). Apenas na sua maior concentração testada é que inibiu o crescimento das mesmas, fato esse esperado e divulgado na literatura (Taiz e Zeiger, 1991; Salisbury e Ross, 1992). Esse mesmo comportamento foi constatado para o sistema radicular.

Para os tratamentos com ANA mais BAP, comportamento semelhante se verifica para a parte aérea, mas é mais nítido nas raízes (tabela 3). Verifica-se também que há estímulo de ANA mais BAP sobre a produção de matéria seca total (Figura 12).

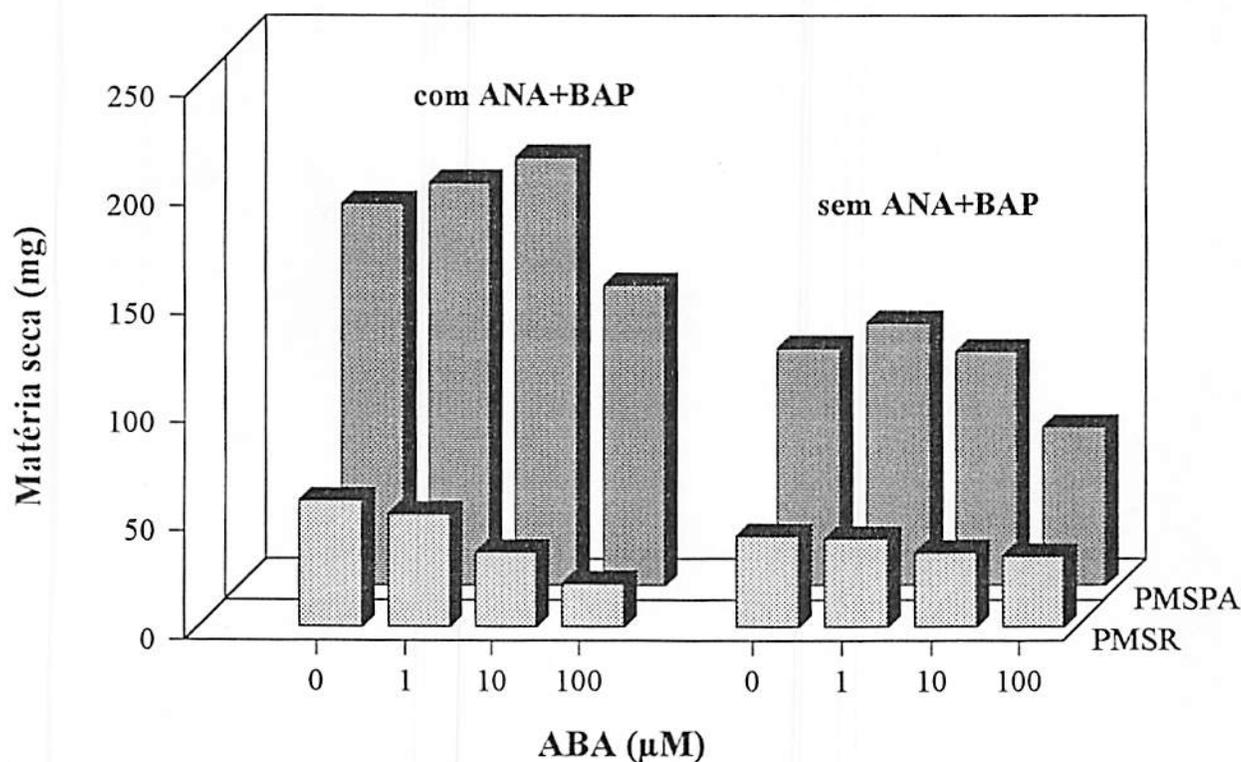


FIGURA 12. Produção de matéria seca da parte aérea (PMSPA) e das raízes (PMSR) em plântulas de batata-doce *in vitro* em função dos tratamentos.

Desta forma fez-se uma abordagem do ABA isolado e combinado com uma auxina mais citocinina sobre a microtuberização de *Ipomoea batatas*. Sabe-se que o ABA é tido como um fitohormônio ligado ao processo de senescência dos vegetais de uma maneira generalizada, tendo efeitos antagônicos com determinados hormônios e sinérgicos com outros (Taiz e Zeiger, 1991; Salisbury e Ross, 1992).

Além disso, uma planta mobiliza reservas nos órgãos de propagação quer sejam grãos, frutos, caules ou raízes, quando esta inicia seu processo de senescência e necessita garantir a perpetuação da sua espécie, fase essa em que a concentração endógena de ABA e etileno estão elevadas comparativamente com os demais fitohormônios nestes órgãos.

Deste modo, acreditava-se que o ABA pudesse estar relacionado com a formação de raízes tuberosas *in vitro* de *Ipomoea batatas*, fato esse que não foi confirmado neste experimento. Quando ABA foi aplicado isoladamente, verificou-se que não houve produção de EST nas raízes, mas sim promoveu a redução do peso da matéria seca total, o qual se destacou na maior concentração testada (10 $\mu$ M). Esta resposta confirma os resultados obtidos por Jarret e Gawel (1991) no qual o ABA foi utilizado com a finalidade de reduzir o metabolismo das plântulas de *Ipomoea batatas* em condições *in vitro* e, conseqüentemente, possibilitar sua utilização em bancos de germoplasma. Também não houve desenvolvimento de estruturas tuberosas nas raízes, apenas redução do crescimento da plântula como um todo.

Nakatani (1994) não conseguiu tuberizar *in vitro* raízes destacadas de *Ipomoea batatas*, mesmo quando adicionou ABA com BA (Benzil adenina) ao meio líquido no qual as raízes ficavam imersas, sem qualquer sinal de diferenciação. Esses dados divergem dos obtidos neste experimento no qual, apesar de não se ter conseguido a microtuberização propriamente dita, houve um incipiente crescimento secundário em diversos pontos do sistema radicular, devendo-se

ressaltar que estes resultados divergentes podem ser devidos às cultivares diferentes utilizadas nestes trabalhos, bem como da metodologia empregada para se induzir a tuberização *in vitro*.

Infelizmente não se encontrou na literatura disponível mais trabalhos relacionados com o efeito de ABA com outros reguladores de crescimento.

Apesar da limitação enorme de literatura pertinente a *Ipomoea batatas* em condições *in vitro* no que tange a microtuberização, existem trabalhos relativos a outras espécies as quais respondem de maneira particular e diferentemente desta espécie em questão. No caso de *Dioscorea alata* L. 'Brazo fuerte' *in vitro*, Jean e Cappadocia (1992) constataram que, embora houvesse praticamente 100% de plântulas tuberizadas tanto em 8 quanto em 16h luz, no fotoperíodo de 8h luz, aumentando-se a concentração de ABA no meio, houve incremento no peso da matéria fresca das raízes tuberosas produzidas enquanto que, no fotoperíodo de 16h luz não houve esse efeito. Percebe-se claramente que o fator indutor da tuberização não foi o ABA nem tão pouco o fotoperíodo e sim algum outro fator não esclarecido.

Em última análise, no controle (Tratamento 1: 0 $\mu$ M ABA; 21,48 $\mu$ M ANA; 88 $\mu$ M BAP); esperava-se a formação de EST mais bem conformadas de acordo com os resultados do experimento anterior (Capítulo II) e de testes preliminares satisfatórios (dados não apresentados), mas que não se desenvolveram no decorrer do experimento por razões desconhecidas. Assim, a metodologia utilizada para indução dos tratamentos: redução da concentração de ágar no meio de 0,70% para 0,45% visando tornar o meio mais aerado e poroso, o que facilitaria a penetração dos reguladores de crescimento no meio, não se mostrou satisfatória para a indução da microtuberização em *Ipomoea batatas*, embora esta estratégia tenha se mostrado satisfatória para microtuberização de *Solanum tuberosum* conforme relatam Levy, Seabrook e Coleman (1993).

### 3.5 CONCLUSÕES

Os resultados alcançados permitem as seguintes conclusões sobre a influência do CCC e ABA na microtuberização de *Ipomoea batatas* (L.) Lam. cv. Brazlândia Branca:

. CCC e ABA isoladamente não proporcionaram efeito sobre a produção de EST, influenciando somente sobre o crescimento das plântulas;

. CCC e ABA, quando em presença de ANA e BAP, apresentaram a formação de EST pequenas e mal formadas as quais foram constatadas não serem raízes tuberosas pela inexpressiva detecção de bandas do marcador protéico (esporamina) em SDS-PAGE.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BRADFORD, M.M. A rapid and positive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, New York, v.72, n.1/2, p. 248-254, May 1976.
- ESTRADA, R.; TOVAR, P.; DODDS, J.H. Induction of *in vitro* tubers in a broad range of potato genotypes. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Dordrecht, v.7, n.1, p.3-10, Jan. 1986.
- GARCIA-TORRES, L.; GOMEZ-CAMPO, C. *In vitro* tuberization of potato sprouts as affected by ethrel and gibberelic acid. *Potato Research*, Wageningen, v.16, n.01, p.73-79, 1973.
- HANNAPEL, D.J.; MILLER JR, J.C.; PARK, W.D. Regulation of potato tuber protein accumulation by gibberellic acid. *Plant Physiology*, Maryland, v.78, n.03, p.700-703, July 1985.
- HARVEY, B.M.R.; CROTHERS, S.H.; EVANS, N.E.; SELBY, C. The use of growth retardants to improve microtuber formation by potato (*Solanum tuberosum*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Dordrecht, v.27, n.01, p.59-64, Oct 1991.
- HATTORI, T.; FUKUMOTO, H.; NAKAGAWA, S.; NAKAMURA, K. Sucrose-induced expression of genes coding for the tuberous root storage protein, sporamin, of sweet potato in leaves and petioles. *Plant and Cell Physiology*, Osaka, v.32, n.01, p.79-86, Jan. 1991.

- HATTORI, T.; NAKAGAWA, S.; NAKAMURA, K. High-level expression of tuberous root storage protein genes of sweet potato in stems of plantlets grown *in vitro* on sucrose medium. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v.14, n.3, p.595-604, 1990.
- HORGAN, R. Cytokinins. IN: WILKINS, M.B. **Advanced plant physiology**. London: Pitman Press, 1984. p. 53-70.
- HUSSEY, G.; STACEY, N.J. Factors affecting the formation of *in vitro* tubers of potato (*Solanum tuberosum* L.). **Annals of Botany**, London, v.53, n.04, p.565-578, Apr. 1984.
- JARRET, R.L.; GAWEL, N. Abscisic acid-induced growth inhibition of sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.24, n.01, p.13-18, Jan. 1991.
- JEAN, M.; CAPPADOCIA, M. Effects of some growth regulators on *in vitro* tuberization in *Dioscorea alata* L. Brazo fuerte and *Dioscorea abyssinca* Hoch. **Plant Cell Reports**, Berlin, v.2, p.34-38, 1992.
- LENTINI, Z.; EARLE, E.D. *In vitro* tuberization of potato clones from different maturity groups. **Plant Cell Reports**, Berlin, v.9, n.4, p.691-695, 1991.
- LEVY, D.; SEABROOK, J.E.A.; COLEMAN, S. Enhancement of tuberization of axillary shoots buds of potato (*Solanum tuberosum* L.) cultivars cultured *in vitro*. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.44, n.259, p.381-386, Feb. 1993.
- MAESHIMA, M., SASAKI, T.; ASAHI, T. Characterization of major proteins in sweet potato tuberous roots. **Phytochemistry**, Oxford, v.24, n.9, p.1899-1902, 1985.
- McDAVID, C.R.; ALAMU, S. The effect of growth regulators on tuber initiation and growth in rooted leaves of two sweet potato cultivars. **Annals of Botany**, London, v.45, n.3, p.363-364, Mar. 1980.
- MENZEL, C.M. Tuberization in potato at high temperatures: responses to gibberelin and growth inhibitors. **Annals of Botany**, London, v.46, n.03, p.259-265, Sept. 1980.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, n.3, p.473-497, 1962.
- MURASHIGE, T. Plant propagation through tissue cultures. **Annual Review Plant Physiology**, Palo Alto, v.25, p.135-166, 1974.
- NAKATANI, M. *In vitro* formation of tuberous in sweet potato, **Japanese Journal of Crop Science**, Tóquio, V. 63, n.1, p.158-159, Mar. 1994.
- PHARIS, R.P.A.; REID, D.M. **Hormonal regulation of development III: role of environmental factors**. Encyclopedia of plant physiology. Herdelberg, 1985. v.11, 887p. (New Series)

- SALISBURY, F.B.; ROSS, C.W. **Plant physiology**. 4<sup>th</sup> ed. Belmont: Publishing Company, 1992. 682p.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant physiology**. Redwood City: The Benjamin Cummings Publishing Company, 1991. 559p.
- VREUGDENHIL, D.; STRUIK, P.C. An integrated view of the hormonal regulation of tuber formation in potato (*Solanum tuberosum*). **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.75, n.4, p.525-531, Apr. 1989.



## CAPÍTULO 4

### INFLUÊNCIA DO FOTOPERÍODO NA MICROTUBERIZAÇÃO DE *Ipomoea batatas* (L.) Lam.

#### RESUMO

Plântulas de *Ipomoea batatas* (L.) Lam. cv. Brazlândia Branca com 30 dias de idade foram cultivadas *in vitro* em meio Murashige e Skoog (1962) com 6% p/v de sacarose sem reguladores de crescimento por um período de 54 dias, durante os quais foram submetidas a diversos fotoperíodos (0, 8, 12, 16 e 24 horas luz). Os resultados das análises mostraram que o fotoperíodo favoreceu o crescimento vegetativo das plântulas, mas não teve efeito algum sobre a formação de raízes tuberosas *in vitro* para este cultivar.

#### 4.1 REFERENCIAL TEÓRICO

O crescimento e desenvolvimento das plantas dependem da luz para os processos fotossintéticos e de fotomorfogênese, nos quais podem estar envolvidos, isolada ou conjuntamente, os três seguintes parâmetros da luz: qualidade (comprimento de onda), quantidade (intensidade luminosa ou fluxo de fótons) e duração (fotoperíodo) (Economu e Read, 1987).

Considerando-se o fotoperíodo, sabe-se que este parâmetro afeta os níveis hormonais endógenos dos vegetais e, conseqüentemente, modifica o seu crescimento e desenvolvimento (Salisbury e Ross, 1992), atuando diferentemente nas diversas espécies.

Existe uma enorme gama de trabalhos que relacionam o efeito do fotoperíodo com a tuberização *in vivo* de *Solanum tuberosum* (Forsline e Langille, 1975; Wheller e Tibbitts, 1986; Haynes, Haynes e Swallow, 1988) e *in vitro* (Slimmon, Machado e Coffin, 1989; Pelacho e Mingo-Castel, 1991; Seabrook, Coleman e Levy, 1993). Não entanto, há carência de informações na literatura consultada a este respeito para *Ipomoea batatas*, principalmente em se tratando de tuberização *in vitro*.

Folquer (1978), estudando batata-doce, afirma que os elementos climáticos que estimulam o crescimento vegetativo são fotoperíodo longo, altas luminosidade e temperatura, enquanto que os requerimentos contrários seriam as condições necessárias para sua tuberização.

Entretanto, Bonsi *et al.* (1992) verificaram que, apesar da batata-doce ser normalmente cultivada sob fotoperíodo superior a 12h luz, três cultivares cultivadas em vasos, a partir de ramas, sob condições controladas e submetidas a fotoperíodos de 12 e 24h de luz, em luz contínua produziram mais raízes tuberosas do que as cultivadas sob fotoperíodo de 12h, indicando que a luz contínua não inibiu a iniciação das raízes tuberosas nas cultivares testadas. Porém, segundo Biswas *et al.* (1984) citado por Bonsi *et al.* (1992), 16h de luz promoveram crescimento da parte aérea e incremento em matéria seca enquanto que a produção de tubérculos em termos numéricos foi promovida por fotoperíodo de 9h de luz.

McDavid e Alamu (1980) constataram que, quando foram utilizadas ramas para propagação de *Ipomoea batatas*, a produção de raízes tuberosas foi maior sob fotoperíodo de 11,5 a 12,5h do que sob condições de dias longos (18h luz) e dias curtos (8h luz).

McDavid e Alamu (1980) estudaram ainda o efeito de diferentes fotoperíodos na produção de raízes tuberosas em folhas enraizadas de *Ipomoea batatas* e constataram que esta espécie não possui obrigatoriedade em termos fotoperiódicos para produção de tubérculos, pois produziu raízes tuberosas sob dias curtos (8h luz), dias neutros (12h luz) e dias longos (18h luz), sugerindo que o estímulo para tuberização seja independente do fotoperíodo.

Não foram encontradas informações sobre a influência do fotoperíodo na tuberização *in vitro* de *Ipomoea batatas*, razão pela qual este experimento foi proposto.

## 4.2 OBJETIVO

O objetivo deste estudo foi avaliar a influência de diversos fotoperíodos sobre a microtuberização de *Ipomoea batatas*.

## 4.3 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi montado no Laboratório de Cultura de Tecidos da Universidade Federal de Lavras e conduzido na sala de crescimento do prédio da Ecofisiologia.

Utilizou-se como explante plântulas de *Ipomoea batatas* (L.) Lam. cv. Brazlândia Branca com 30 dias de idade cultivadas em meio Murashige e Skoog (MS) (1962) sem reguladores de crescimento com 3% p/v de sacarose. Estas plântulas foram crescidas em frascos de vidro de 300 mL com três plântulas por frasco, as quais estavam cobertas com fita plástica em sala de crescimento com fotoperíodo de 16h luz/ 8h escuro, temperatura  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  e radiação fotossinteticamente ativa (RFA) em torno de  $42\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  com lâmpada GE de 40W luz do dia

especial. As plântulas foram retiradas do meio de crescimento e inoculadas em meio indutor (MI) em condições assépticas.

Como MI foi utilizado o meio MS (1962) sem reguladores de crescimento com 6% p/v de sacarose e 0,45% p/v ágar. O meio foi preparado, distribuído em frascos de 300 mL, tampados com tampa plástica e autoclavados a 120°C por 20 minutos. Após esterelização, os frascos foram transferidos para câmara de fluxo laminar previamente esterelizada onde foram adicionados 50 ppm de ampicilina a cada frasco, seguindo a metodologia fornecida pelo Dr. Roca do CIAT (comunicação pessoal).

Após inoculação com uma plântula por frasco, estes foram selados com fitas plásticas e transferidos para câmaras com radiação fotossinteticamente ativa de  $102\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  e submetidas a fotoperíodos de 0, 8, 12, 16 e 24 horas de luz, dispostos em delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições, sendo cada repetição composta por cinco plântulas.

A avaliação dos resultados foi realizado 54 dias após a montagem do experimento, sendo feita a contagem do número de folhas e suas características, comprimento da parte aérea, peso da matéria fresca e seca tanto da parte aérea quanto radicular e produção de estruturas semelhantes a tubérculos (EST).

#### 4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Verificou-se que, em condições *in vitro*, o fotoperíodo não induziu a formação de raízes tuberosas de *Ipomoea batatas* (L.) Lam. cv. Brazlândia Branca (Tabela 5).

TABELA 5. Valores Médios da Produção de Estruturas nas Raízes (NUM.EST) e Peso da Matéria Seca da Parte Aérea (PMSPA) e das Raízes (PMSR) ao final de 54 dias

HORAS LUZ	NUM EST	PMSPA (mg)	PMSR (mg)
0	0	61,1	35,7
8	0	354,5	130,9
12	0	176,4	64,2
16	0	390,9	196,6
24	0	538,7	371,5

Observa-se que não houve efeito sobre a produção de estruturas no sistema radicular e sim, tendência de maior produção de matéria seca da parte aérea e das raízes à medida que se aumentou o número de horas de exposição à luz, conforme apresentado na Figura 13. Entretanto, no tratamento com 12h luz, houve redução da produção de matéria seca sem explicação evidente para o fato.

As plântulas apresentaram-se visualmente diferentes quando submetidas aos diversos fotoperíodos (Figura 14).

Sob tratamento de 0h luz, as plântulas apresentaram-se completamente aclorofiladas, estioladas, com folhas pequenas e em número reduzido e com sistema radicular pouco desenvolvido e sem a presença de estruturas nas raízes.

Quando as plântulas foram submetidas a 8h luz, observou-se o desenvolvimento de folhas maiores, de coloração verde-escuro, vigorosas com senescência incipiente das folhas basais. Neste fotoperíodo, após 54 dias, já se verificava o início da emissão de raízes adventícias oriundas das gemas axilares, porém em reduzido número. Quanto às raízes, houve a formação de uma quantidade significativamente superior às produzidas no tratamento 0h luz, porém também sem estruturas nas raízes.

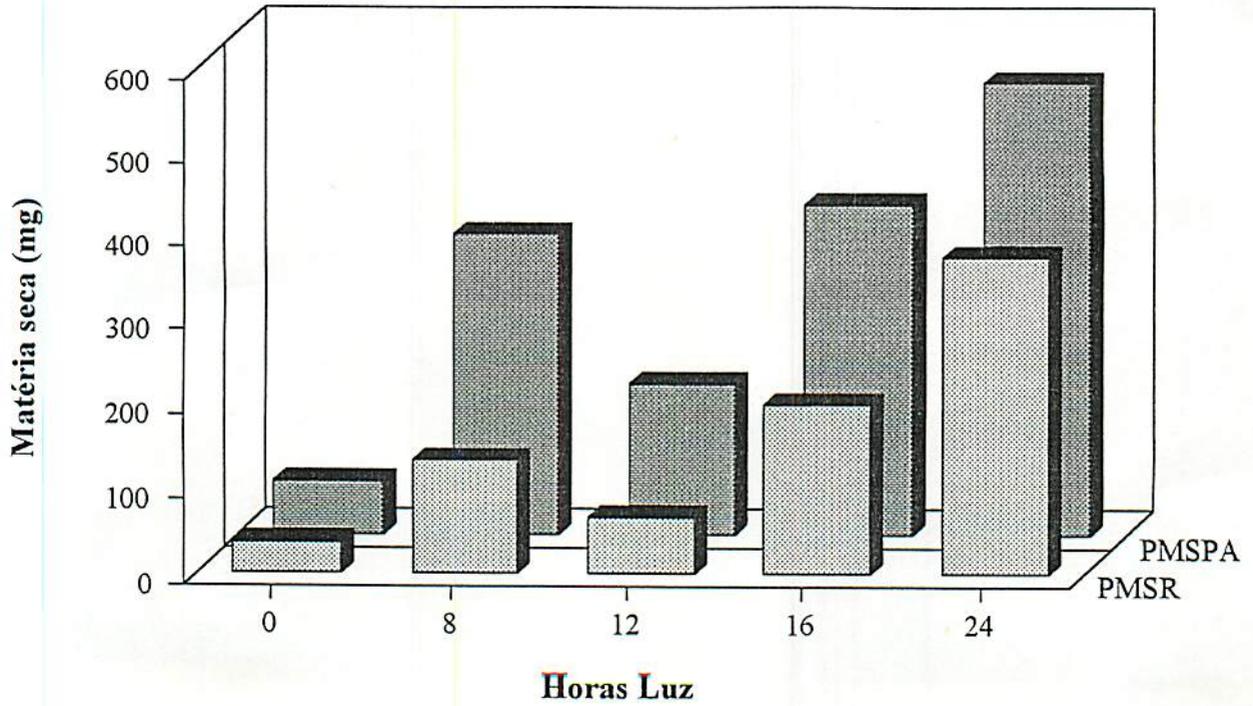


FIGURA 13. Produção de matéria seca da parte aérea (PMSPA) e das raízes (PMSR) nos diversos fotoperíodos.



FIGURA 14. Plântulas de batata-doce submetidas a diversos fotoperíodos ao final de 54 dias.

Em relação ao fotoperíodo de 12h luz, houve a produção de folhas verde-escuro bem desenvolvidas, porém com senescência das folhas basais. Apresentavam também raízes adventícias e sistema radicular bem desenvolvido ainda sem nenhum crescimento secundário nas mesmas.

Sob 16h luz, as folhas também eram verde-escuro e bem desenvolvidas e apresentavam senescência em aproximadamente 50% das mesmas; o caule era de maior diâmetro comparado com os tratamentos anteriores. Nestas condições já havia maior proliferação de raízes adventícias e a parte aérea, principalmente as folhas, apresentavam a produção de látex porém, apesar de haver maior produção de raízes do que nos demais tratamentos, mesmo assim ainda não houve a formação de estruturas semelhantes a tubérculos nas raízes.

Por último, sob fotoperíodo de 24h luz, observou-se o desenvolvimento de folhas grandes que, após 54 dias, apresentavam-se quase que totalmente senescentes; caule bem desenvolvido e escurecidos, com sistema radicular amplamente formado e, entretanto, ainda sem estruturas no sistema radicular. Neste fotoperíodo também houve a produção de látex na parte aérea. Constatou-se que a maior senescência das plântulas submetidas aos maiores fotoperíodo não foi decorrente do efeito direto da luz sobre as mesmas e sim, da maior exposição à luz, a qual induziu as plântulas a um maior metabolismo, consumindo mais rapidamente as reservas orgânicas e inorgânicas do meio de indução.

Uma vez esgotado o meio e com a contínua produção de matéria seca em função da presença de luz, houve translocação das reservas mobilizadas nas folhas para os órgãos de crescimento, promovendo assim a senescência do material vegetal. Este fenômeno, provavelmente foi acrescido dos efeitos do acúmulo de etileno e ácido abscísico dentro do recipiente lacrado, o qual deve ter contribuído para a senescência mais acentuada das plântulas (Pierik, 1987).

Em termos de avaliação do efeito do fotoperíodo em *Ipomoea batatas* em condições *in vitro*, há escassez de informações na literatura consultada porém, em condições *in vivo* existem alguns trabalhos a este respeito.

Apesar do trabalho ter sido realizado em condições de ambiente diferentes, em condições *in vitro* verificou-se que não houve efeito do fotoperíodo sobre a indução da microtuberização, apesar de permitir um período mais longo (54 dias) até que as plântulas entrassem em senescência parcial. Estes dados contradizem o que foi constatado por Bonsi *et al.* (1992) que, trabalhando sob condições *in vivo* em casa-de-vegetação, verificaram que nas plantas submetidas tanto a 12h quanto a 24h luz houve tuberização e que a 24h houve maior crescimento de raízes tuberosas, indicando que a luz, considerando-se o fotoperíodo, não influenciava a indução da formação de raízes tuberosas nas condições testadas.

Os dados deste trabalho divergem também dos resultados obtidos por McDavid e Alamu (1980). Estes pesquisadores, trabalhando com folhas enraizadas *in vivo* de *Ipomoea batatas* em casa-de-vegetação com controle de fotoperíodo, observaram que, independentemente de estarem submetendo as plantas a fotoperíodo curto (8h luz), neutro (11,5 a 12,5h luz) ou longo (18h luz) havia tuberização em todas as condições testadas, sem diferenças significativas, indicando que *Ipomoea batatas* não apresenta requerimento de fotoperíodo definido para tuberizar, ou seja, tuberiza indiferentemente do fotoperíodo ao qual está submetido.

Em condições *in vitro* não se encontrou na literatura consultada trabalhos com *Ipomoea batatas* avaliando o efeito do fotoperíodo sobre a sua microtuberização, apenas em outras espécies é que se encontrou trabalhos referentes a este tópico e, como era de se esperar, as respostas eram completamente diferentes por se tratarem de espécies também diferentes e condições diferentes.

Considerando-se o gênero *Dioscorea*, vários pesquisadores têm procurado avaliar a influência do fotoperíodo sobre as respostas quanto à tuberização, dentre os quais Lauzer *et al.* (1992) com *Dioscorea abyssinca* e *Dioscorea mangenotiana*; Ng (1988) com *Dioscorea rotundata* e Jean e Cappadocia (1992) com *Dioscorea alata* e *Dioscorea abyssinca*. Entretanto, os estudos destes pesquisadores divergiram deste estudo no ponto em que se procurou avaliar o efeito isolado do fotoperíodo, visando identificar se este fator estava relacionado diretamente com o processo de tuberização enquanto que nos demais havia no meio de crescimento algum regulador de crescimento, fosse ele uma auxina ou citocinina, ou seja, não avaliaram o efeito isolado do fotoperíodo. O único trabalho encontrado em que o efeito do fotoperíodo foi avaliado isoladamente sem reguladores de crescimento foi o de Mantell e Hugo (1989) que trabalharam com *Dioscorea alata* e *Dioscorea bulbifera* em condições *in vitro* aumentando a concentração de sacarose no meio para 4%. Ambas as espécies não tuberizaram sob 16 ou 12h luz; porém, sob 8h luz houve 80% de microtuberização das plântulas de *Dioscorea bulbifera*, enquanto que as plântulas *Dioscorea alata* permaneceram indiferentes ao mesmo fotoperíodo, indicando a influência deste fator do ambiente sobre o processo indutório dessas espécies estudadas. Estes mesmos autores relatam que, modificando as condições do meio, pode haver alteração da resposta, uma vez que há interação de mecanismos que resultam no comportamento final da resposta.

Assim como para plântulas de *Dioscorea*, em se considerando estudos de tuberização *in vitro* de *Solanum tuberosum*, as respostas são completamente diferentes em termos de resposta ao fotoperíodo, como se verifica nos trabalhos de Slimmon, Machado e Coffin (1989), de Pelacho e Míngo-Castel (1991) e de Seabrook, Coleman e Levy (1993).

## 4.5 CONCLUSÕES

O experimento permitiu as seguintes conclusões sobre *Ipomoea batatas* (L.) Lam.

cv. Brazlândia Branca:

. O fotoperíodo não proporcionou a tuberização *in vitro* deste cultivar;

. O fotoperíodo influenciou positivamente o crescimento tanto da parte aérea quanto do sistema radicular.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BONSI, C.K.; LORETAN, P.A.; HILL, W.A.; MORTLEY, D.G. Response of sweet potato to continuous light. *HortScience*, Alexandria, v.27, n.5, p.471, May 1992.
- ECONOMU, A.S.; READ, P.E. Light treatments to improve efficiency of *in vitro* propagation systems. *HortScience*, Alexandria, v.22, n.5, p.751-754, Oct. 1987.
- FOLQUER, F. La batata (camote): estudio de la planta y su produccion comercial. San Jose, 1978. 144p.
- FORSLINE, P.L.; LANGILLE, A.R. Endogenous cytokinin in *Solanum tuberosum* as influenced by photoperiod and temperature. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v.34, n.01, p.75-77, 1975.
- HAYNES, K.G.; HAYNES, F.L.; SWALLOW, W.H. Temperature and photoperiod effects on tuber production and specific gravity in diploid potatoes. *HortScience*, Alexandria, v.23, n.3, p.562-565, June 1988.
- JEAN, M.; CAPPADOCIA, M. Effects of some growth regulators on *in vitro* tuberization in *Dioscorea alata* L. Brazo fuerte and *Dioscorea abyssinica* Hoch. *Plant Cell Reports*, Berlin, v.2, p.34-38, 1992.
- LAUZER, D.; LAUBIN, G.; VINCENT, G.; CAPPADOCIA, M. *In vitro* propagation and cytology of wild yams, *Dioscorea abyssinica* Hoch. and *D. mangelotiana* Miede. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Dordrechst, v.28, n.2, p.215-223, Feb. 1992.

- MANTELL, H.S.; HUGO, S.A. Effects of photoperiod, mineral strength, inorganic ammonium, sucrose and cytokinin on root, shoot and microtuber development in shoot cultures of *Dioscorea alata* L. and *Dioscorea bulbifera* L. yams. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.16, n.1, p.23-42, Jan. 1989.
- McDAVID, C.R.; ALAMU, S. Effect of daylength on the growth and development of whole plants and rooted leaves of sweet potato (*Ipomoea batatas*). **Tropical Agriculture**, Trinidad, v.57, n.2, p.113-119, Apr. 1980.
- MURASDHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, n.3, p.473-497, 1962.
- NG, S.Y.C. *In vitro* tuberization in white yam (*Dioscorea rotundata* Poir). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.14, n.2, p.121-128, Jan. 1988.
- PELACHO, A.M.; MINGO-CASTEL, A.M. Effects of photoperiod on kinetin-induced tuberization of isolated potato stolons cultured *in vitro*. **American Potato Journal**, Orono, v.68, n.8, p.533-541, Aug. 1991.
- PIERIK, R.L.M. *In vitro* culture of higher plants. Dordrecht: Martins Nijhoff Publishers, 1987. 344p.
- SALISBURY, F.B.; ROSS, C.W. **Plant physiology**. 4<sup>th</sup> ed. Belmont: Publishing Company, 1992. 682p.
- SEABROOK, J.E.A.; COLEMAN, S.; LEVY, D. Effect of photoperiod on *in vitro* tuberization of potato (*Solanum tuberosum* L.) **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.34, n.01, p.43-51, July 1993.
- SLIMMON, T.; MACHADO, V.S.; COFFIN, R. The effect of light on *in vitro* microtuberization of potato cultivars. **American Potato Journal**, Orono, v.66, n.12, p.843-848, Dec. 1989.
- WHELLER, R.M.; TIBBITS, T.W. Growth and tuberization of potato (*Solanum tuberosum* L.). **Plant Physiology**, Maryland, v.80, n.3, p.801-804, Mar. 1986.

**ANEXOS**

TABELA 1A. Distribuição de matéria fresca produzida no experimento do CCC combinado com e sem ANA mais BAP, em miligramas

TRAT	PF EST	PF CALO	PF PA	PF FS	PF PA <sub>t</sub>	PF R	PR+ PE+PC	PF <sub>t</sub>	% RAIZ
1	0	0	1010	166	1167	417	417	1584	26,34
2	87	423	1170	248	1417	642	1152	2569	44,84
3	0	0	806	133	939	250	250	1189	21,03
4	56	357	1105	185	1291	415	828	2119	39,09
5	0	0	705	104	809	249	249	1057	23,51
6	64	410	1047	182	1230	395	869	2099	41,41
7	0	0	0	167	167	119	119	286	41,55
8	0	0	0	203	203	253	253	456	55,42

TABELA 2A. Distribuição de matéria fresca produzida no experimento do ABA combinado com e sem ANA mais BAP, em miligramas

TRAT	PF EST	PF CALO	PF PA	PF FS	PF PA <sub>t</sub>	PF R	PR+ PE+PC	PF <sub>t</sub>	% RAIZ
1	0	0	801	180	981	375	375	1355	27,63
2	164	453	914	197	1111	573	1190	2301	51,71
3	0	0	886	127	1014	357	357	1370	26,02
4	103	671	990	212	1203	553	1327	2529	52,45
5	0	0	758	124	883	332	332	1214	27,31
6	200	676	858	280	1137	368	1244	2381	52,26
7	0	0	585	105	690	420	420	1110	37,84
8	128	1214	678	172	849	253	1595	2445	65,26

PF EST: Peso da matéria fresca das estruturas semelhantes a tubérculos

PF CALO: Peso da matéria fresca dos calos

PF PA: Peso da matéria fresca da parte aérea

PF FS: Peso da matéria fresca das folhas senescentes

PF PA<sub>t</sub>: Peso da matéria fresca da parte aérea total (PF PA + PF FS)

PF R: Peso da matéria fresca das raízes

PR + PE + PC: Peso da matéria fresca das raízes mais estruturas (EST) mais calos

PF<sub>t</sub>: Peso da matéria fresca total

% RAIZ: Percentagem da matéria fresca total localizada no sistema radicular