

LÚCIO FLÁVIO DE ALENCAR FIGUEIREDO

INDUÇÃO DE RAÍZES TUBERIFORMES DE MANDIOCA
(*Manihot esculenta* Crantz.) *IN VITRO* E EM HIDROPONIA.

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

Orientadora
DAMARES DE CASTRO MONTE-NESHICH

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
1996

29120
MFN=10000

LÚCIO FLÁVIO DE ALENCAR FIGUEIREDO

INDUÇÃO DE RAÍZES TUBERIFORMES DE MANDIOCA (*Manihot esculenta* Crantz.) *IN VITRO* E EM HIDROPONIA.

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

Orientadora

DAMARES DE CASTRO MONTE-NESHICH

Propagação in vitro de Mandioca
Tuberização in vitro de Mandioca
Propagação in vitro de Mandioca
Tuberização in vitro de Mandioca
Propagação in vitro de Mandioca
Tuberização in vitro de Mandioca

CDD-633.4

MINAS GERAIS - BRASIL

1996

Ficha Catalográfica preparada pela Seção de Classificação e Catalogação da
Biblioteca Central da UFLA

Figueiredo, Lúcio Flávio de Alencar

Indução de raízes tuberiformes de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz.) *in vitro* e em hidroponia / Lúcio Flávio de Alencar Figueiredo. -- Lavras: UFLA, 1996.

99p. : il.

Orientador: Damares de Castro Monte-Neshich.

Dissertação (Mestrado) - UFLA.

Bibliografia.

Mandioca - 1. Tuberização. 2. hidroponia. 3. Raiz.
4. Regulador de crescimento. 5. Propagação *in vitro*. 6. Cultura
de tecido. 7. Micropropagação.

I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

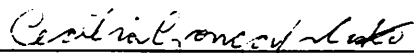
CDD-633.4

LÚCIO FLÁVIO DE ALENCAR FIGUEIREDO

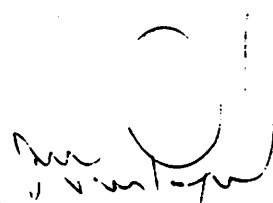
**INDUÇÃO DE RAÍZES TUBERIFORMES DE MANDIOCA
(*Manihot esculenta* Crantz.) *IN VITRO* E EM HIDROPONIA.**

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”.

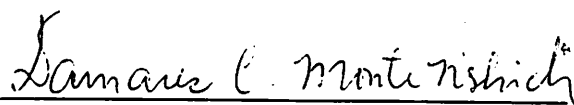
APROVADA em 15 de março de 1996.



Prof. Cecília Gonçalves Costa



Prof. Moacir Pasqual



Prof. Damara de Castro Monte-Neshich
(Orientadora)

DEDICATÓRIA

“Certamente ao longo da vida haverão outros esforços e barreiras, e com elas conquistas, porém gostaria de dedicar este trabalho a minha mãe, Josélia Dias de Alencar, a quem tenho imensa, admiração, amor e agradecimentos. Dedico ainda a memória do meu grande amigo e tio, José Dias de Alencar.”

Qualquer caminho é apenas um caminho e não constitui insulto algum - para si mesmo ou para os outros - abandoná-lo quando assim ordena o seu coração (...). Olhe cada caminho com cuidado e atenção. Tente-o tantas vezes quantas julgar necessárias... Então, faça a si mesmo e apenas a si mesmo uma pergunta: possui esse caminho um coração ? Em caso afirmativo o caminho é bom. Caso contrário, esse caminho não possui importância alguma.

Carlos Castañeda
(Os ensinamentos de Dom Juan)

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras (UFLA), em especial ao Departamento de Biologia, área de Fisiologia Vegetal, pela formação;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) cujo financiamento possibilitou-me a realização do curso de pós-graduação;

A Dr^a Damares de Castro Monte-Neshich pela orientação, amizade e formação profissional;

Ao Dr. Luis Joaquim Castelo Branco de Carvalho por oportunizar a participação em um projeto tão fascinante e desafiante;

Ao Prof. José Donizete Alves, pelos seus conhecimentos, co-orientação e amizade;

A Prof^a. Irene da Costa A. Mendes e Cecília Gonçalves Costa por me introduzirem nos conhecimentos básicos de anatomia ;

Ao Centro Nacional de Pesquisa em Biotecnologia e Recursos Genéticos (CENARGEN/EMBRAPA), em especial as áreas de biologia celular, citogenética, biologia molecular e patologia de sementes, pela oportunidade da realização de todo o trabalho;

A Universidade Católica de Brasília (UCB), em especialo Departamento de Biologia, pelo apoio;

Ao laboratório de Anatomia Vegetal/UnB, pela realização das lâminas permanentes,

Ao laboratório de Produtos Florestais/IBAMA, pela parte fotográfica das lâminas;

Aos professores Terezinha Paviane e Elder, pelas revisões da parte anatômica;

A Dr^a Célia Maria Torres Cordeiro, pelo auxílio nas análises estatísticas;

Aos professores do curso de mestrado da UFLA e UnB, pelos seus conhecimentos;

Aos pesquisadores e amigos Sérgio A. Figueiredo, Cristiano Lacorte e Isabel Bezerra, pelas inúmeras revisões e as riquíssimas discussões ao longo do trabalho;

Ao Dr. João Batista Teixeira, pelos seus conhecimentos e apoio,

A Josefino Fialho pelos conhecimentos da cultura da mandioca e colaborações;

Ao seu Eronildes pela sua contribuição na parte de anatomia e pela amizade;

Pelos trabalhos técnicos realizados por Cláudio (foto), Mário e Elso (desenho), Evaristo e Tanham (laboratório), Isonel e Eustáquio (secretaria), Onório, Chaguinhas, e outros (campo);

A Jussara Maria Dias de Alencar, pela revisão gramatical;

A banca examinadora, pelas correções e críticas construtivas para a melhoria do trabalho;

Aos alunos de iniciação científica, que me auxiliaram no trabalho realizado na UFLA, Samuel, Jussara, Mônica e Salete;

Aos meus companheiros, ao longo dessa jornada: Marcos César, Cláudio Brondani, Nelson Delu, Douglas Bardouche, Clóvis, e Marly Coelho;

A Ana Cristina, pelo apoio, companheirismo, paciência e amor ao longo de todo o trabalho;

As minhas irmãs, tios, primos, avó e amigos, pelo apoio;

A todos que, de uma maneira ou de outra, contribuíram na realização deste trabalho.

Muito obrigado,

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS.....	vi
LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xiii
RESUMO.....	xv
SUMMARY.....	xvii
CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO GERAL.....	1
1.1 A mandioca (<i>Manihot esculenta</i> Crantz).....	2
1.2 Conceitos de raízes e caules tuberosos.....	4
1.3 Processo de tuberização.....	9
CAPÍTULO 2 - ONTOGENIA DE RAÍZES DE MANDIOCA NO CAMPO.....	16
2.1 INTRODUÇÃO.....	16
2.1.1 Anatomia da raiz de mandioca e de outras estruturas tuberosas.....	16
2.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	18
2.2.1 Preparo das lâminas permanentes das raízes de mandioca do campo em diferentes estágios de desenvolvimento.....	19
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	22
2.4 CONCLUSÕES.....	27
CAPÍTULO 3 - ESTRATÉGIAS PARA A OBTENÇÃO DE RAÍZES TUBEROSAS DE MANDIOCA <i>IN VITRO</i>	28
3.1 INTRODUÇÃO.....	28
3.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	34

	Página
3.2.1 Ação dos fotoperíodos associados a diferentes concentrações de sacarose.....	35
3.2.2 Aplicação de reguladores de crescimento.....	35
3.2.3 Ação do carvão ativado associado a diferentes concentrações de sacarose.....	37
3.2.4 Preparo das lâminas permanentes das raízes tuberiformes.....	37
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
3.3.1 Efeito dos fotoperíodos associados as diferentes concentrações de sacarose.....	38
3.3.2 Respostas das plantas tratadas com reguladores de crescimento.....	41
3.3.3 Efeito da sacarose e do carvão ativado na altura das plantas.....	48
3.3.4 Análise anatômica das raízes tuberiformes.....	53
3.4 CONCLUSÕES.....	60
CAPÍTULO 4 - ESTRATÉGIAS PARA A OBTENÇÃO DE RAÍZES TUBEROSAS DE MANDIOCA EM HIDROPONIA.....	61
4.1 INTRODUÇÃO.....	61
4.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	63
4.2.1 Canteiro de propagação rápida.....	63
4.2.2 Enraizamento e brotação das estacas em hidroponia.....	64
4.2.3 Indução com reguladores de crescimento.....	65
4.2.4 Preparo das lâminas permanentes das raízes tuberiformes.....	68
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	68
4.3.1 Brotação das manivas e crescimento das plantas nos canteiros de areia.....	68
4.3.2 Respostas das plantas tratadas com reguladores de crescimento.....	69
4.3.3 Sistema de hidroponia.....	71
4.3.4 Análise anatômica das raízes tuberiformes.....	73
4.5 CONCLUSÕES.....	77
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	78
LISTA DE APÊNDICES.....	100

LISTA DE TABELAS

Tabela		Página
1	Características agronômicas e botânicas das raízes e caules tuberosos mais comercializados.....	6
2	Respostas das plantas de mandioca, cv. MColl 22, <i>in vitro</i> para a formação de raízes tuberiformes mediante aplicação das diferentes soluções de reguladores de crescimento.....	44
3	Formação de raízes tuberiformes de plantas de mandioca, cv. MColl 22, induzidas <i>in vitro</i>	47
4	Avaliação da influência da sacarose e do carvão ativado (CA) no crescimento de plantas de mandioca, cv. MColl 22, <i>in vitro</i>	48
5	Valores médios observados e esperados para as análises das alturas das plantas de mandioca, cv. MColl 22, <i>in vitro</i> , cultivadas em meio de cultura de MS, com diferentes concentrações de sacarose, na presença de carvão ativado.....	49

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Utilizações da mandioca, parte aérea e raiz (CNPMPF, 1993).....	3
2	Plantas de mandioca, cv. Pioneira, oriundas do campo: a) Manivas não tuberizadas, 14 dias após o plantio (barra da escala = 2,1 cm); b) manivas tuberizadas, 14 dias após o plantio (barra da escala = 2,3 cm); c) e d) destaque para as raízes tuberizadas da maniva da Figura 2b (Figura 2c barra da escala = 0,97 cm); (Figura 2d barra da escala = 0,6 cm); e) raízes tuberizadas com 60 dias (barra da escala = 4,6 cm).....	20
3	Diagrama da raiz tuberosa de mandioca, cv. Pioneira, proveniente do campo após 180 dias do plantio, mostrando as sete regiões (R) analisadas.....	21
4	Anatomia das raízes tuberosas de mandioca, cv. Pioneira, oriundas do campo. a) Raiz com protoxilema pentarco, 14 dias após o plantio, sem tuberização (barra da escala = 30 μ m), no destaque aspecto do corte na mesma escala que as Figuras 4b, 4c e 4d (barra da escala = 300 μ m); b) raiz tuberosa com	

Figura

Página

- com protoxilema pentarco, 14 dias após o plantio no campo; c) raiz tuberosa com protoxilema pentarco, 25 dias após o plantio; d) raiz tuberosa 40 dias após o plantio. Destaque para o início do crescimento do secundário, sendo observado ainda os pólos do protoxilema da estrutura primária em forma pentarca (Figuras 4b, 4c e 4d; barra da escala = 300 μm)..... 24
- 5 Anatomia da raiz tuberosa de mandioca, cv. Pioneira, 180 dias após o plantio no campo (R1, Figura 3). a) Corte transversal mostrando crescimento secundário no campo. EV = elementos de vaso, FS = floema, C = câmbio, R = ritidoma (barra da escala = 300 μm). b) Em luz polarizada, destaque para o elemento de vaso, dos grãos de amido (GA) em forma de cruz de malta e do câmbio (C) (barra da escala = 30 μm)..... 25
- 6 Raízes tuberiformes de mandioca, cv. MColl 22, *in vitro* induzidas com 1,6 μM ANA + 0,4 μM BAP (C-controle e I-induzida). a) Plantas com 5 dias após a indução, b) plantas com 30 dias após a indução. Formação de raízes tuberiformes com a morfologia muito semelhante a tubérculos do campo, c) plantas com 30 dias após a indução, formação desuniforme de algumas raízes tuberiformes..... 45
- 7 Raízes tuberiformes de mandioca, cv. MColl 22, *in vitro*, induzidas com 0.4 μM DHZ + 1.6 μM ANA (C-controle e I-induzidas). a) Plantas 30 dias após a

Figura	Página
indução, b) destaque da morfologia das raízes tuberiformes induzidas.....	46
8 Porcentagens de raízes tuberiformes de mandioca, cv. MColl 22, <i>in vitro</i> , obtidas com as duas melhores fontes de citocinina, testadas em diferentes concentrações	47
9 Influência da concentração de sacarose e presença do carvão ativado na altura de plantas de mandioca, cv. MColl 22, <i>in vitro</i>	50
10 Efeito da luz no desenvolvimento das raízes de plantas de mandioca, cv.MColl 22, <i>in vitro</i> . (CL - com luz; SL - sem luz). a) Plantas em meio de cultura de MS com uma camada do mesmo meio contendo carvão ativado à 1,0% e com cobertura de papel em torno do tubo de ensaio na altura do sistema radicular (SL), e plantas com o sistema radicular exposto à luz (CL), b) raízes crescidas no escuro (SL) e com luz (CL), destaque para a síntese de clorofila e maior volume das raízes na presença de luz (CL).....	52
11 Anatomia de raiz controle (não induzidas) de mandioca, cv. MColl 22, <i>in vitro</i> . Protoxilema pentarco no centro da raiz (barra da escala = 30 μ m), em destaque aspecto geral do corte (barra de escala = 300 μ m).....	55

Figura	Página
12 Anatomia de raiz tuberiforme de mandioca, cv. MColl 22, <i>in vitro</i> , induzida com 0.4 μ M BAP + 1.6 μ M ANA. Pequena ativação dos vasos condutores no cilindro central, elevada ativação do córtex, com células periféricas do córtex apresentando vários rompimentos (barra da escala = 300 μ m).....	55
13 Anatomia de raiz tuberiforme de mandioca, cv. MColl 22, <i>in vitro</i> , induzida com 0.4 μ M DHZ + 1.6 μ M ANA. Elevada divisão e expansão celular, desorganização dos tecidos vasculares com muitos rompimentos das células periféricas do córtex. Destaque para a formação da faixa cambial (C) (barra de escala = 300 μ m).....	55
14 Anatomia de raízes de mandioca cv. MColl 22, <i>in vitro</i> , com crescimento secundário na ausência de luz (Figura 10, tubos SL). a) Elementos de vaso com distribuição radial (barra da escala = 300 μ m); b) grãos de amido (GA) no parênquima xilemático, atividade do felogênio (FE) e câmbio vascular (C) (barra da escala = 80 μ m); c) Destaque para os grãos de amido (GA) em luz polarizada, em forma de cruz de malta (barra da escala = 30 μ m).....	57
15 Respostas das raízes das plantas de mandioca, cv. Pioneira, para as induções realizadas em hidroponia. a) Estágios de indução: estágio 1 - plantas com sistema radicular pouco desenvolvido, estágio 2 - plantas com sistema radicular mais desenvolvido; b) resposta das raízes das plantas à indução realizada somente na	

Figura

Página

- parte aérea; **c)** resposta das plantas de mandioca, cv. Pioneira, à indução realizada nos dois estágios de crescimento no sistema radicular, espessamento uniforme ao longo de toda raiz; **d)** resposta das plantas de mandioca, cv. IAC 12829, à indução realizada nos dois estágios de crescimento do sistema radicular, espessamento uniforme somente nas extremidades das raízes..... 66
- 16 Diagrama de raízes de plantas controle de mandioca, cv. Pioneira, em hidroponia, mostrando os quatro níveis analisados..... 67
- 17 Diagramas de raízes tuberiformes das plantas de mandioca, cv. Pioneira, induzidas em hidroponia com 0,4 μM BAP, mostrando as nove regiões analisadas (A e B)..... 67
- 18 Anatomia da raiz controle de mandioca, cv. Pioneira, em hidroponia (Figura 15c 16). **a)** Corte na região 1 (Figura 16), parte central em diferenciação, cercada por um anel de células do procâmbio (barra da escala = 30 μm), em destaque, aspecto geral do corte (barra de escala = 300 μm); **b)** corte na região 2, mostrando protoxilema tetrarco em luz polarizada (barra da escala = 300 μm); **c)** corte na região 3, mostrando protoxilema tetrarco com pouco destaque dos elementos de vaso (barra da escala = 80 μm), em destaque aspecto geral do corte (barra de escala = 300 μm); **d)** corte na região 4, zona de transição raiz-caule, em luz polarizada, mostrando protoxilema poliarco. Observa-se o espessamento das células

Figura	Página
da endoderme (E) (barra da escala = 30 μm), em destaque aspecto geral do corte (barra de escala = 300 μm).....	75
19 Raiz tuberiforme de mandioca, cv. Pioneira, induzida com 0,4 μM BAP em hidroponia (Figura 16c e 17). a) corte na região 3, protoxilema tetraarco. Elementos de vaso do protoxilema (px) e do metaxilema (mx) no centro, elevada ativação do córtex com células periféricas desuniformes (barra da escala = 300 μm); b) detalhe do corte na região 3 em luz polarizada, mostrando o início da instalação do câmbio reentrante (barra da escala = 30 μm).....	76

LISTA DE ABREVIATURAS

μM	- micromolar.
μm	- micrômetro.
CA	- carvão ativado.
C	- câmbio.
cv.	- cultivar.
EV	- elemento de vaso.
FE	- felogênio.
FS	- floema secundário.
g	- grama.
GA	- grão de amido.
GL	- Gay Lussac.
L	- litro.
m	- metro.
mg	- miligrama.
mL	- mililitro.
MS	- sais e vitaminas do meio de cultura de MURASHIGE & SKOOG (1962).
$^{\circ}\text{C}$	- graus Celsius.
R	- ritidoma.
RAF	- radiação fotossinteticamente ativa.

Reguladores de crescimento, enzimas e outras

ABA	- Ácido abscísico.
ADPG -Pi	- Adenosina difostato glicose pirofosforilase.
AIA	- Ácido indolacético.
AIB	- Ácido indolbutírico.
AJ	- Ácido jasmônico.
ANA	- Ácido naftalênico acético.
BAP	- 6-Benzilaminopurina.
BS	- Enzima de ramificação (Branching enzyme).
DHZ	- Dihidrozeatina.
FAA 70	- 90 ml álcool 70° GL + 5 ml ácido acético glacial + 5 ml formaldeído 40%.
AG	- Ácido giberélico.
GBSS	- Enzima de síntese de grânulos de amido (Granule-bound starch synthase).
HCN	- Ácido cianídrico.
Z	- Zeatina.
ZR	- Zeatina ribosídeo.

Centros de pesquisa, universidades e laboratórios:

EMBRAPA	- Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária.
CENARGEN	- Centro Nacional de Pesquisa em Recursos Genéticos e Biotecnologia.
CPAC	- Centro Nacional de Pesquisa do Cerrado.
IBAMA	- Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis.
UFLA	- Universidade Federal de Lavras.
UnB	- Universidade de Brasília.

RESUMO

FIGUEIREDO, L.F.A. **Indução de raízes tuberiformes de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz.) *in vitro* e em hidroponia.** Lavras: UFLA, 1996. 105p. (Dissertação de mestrado em Fisiologia Vegetal)*.

O objetivo deste trabalho foi o de desenvolver um sistema de tuberização da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz.) *in vitro* e em hidroponia, visando possibilitar o estudo dos fatores envolvidos no processo de desenvolvimento da raiz tuberosa da mandioca. Plantas tratadas com diversas combinações de reguladores de crescimento, *in vitro*, formaram raízes tuberiformes, preferencialmente com 0,4 μ M BAP + 1,6 μ M ANA e/ou 0,4 μ M DHZ + 1,6 μ M ANA. Embora estas raízes tenham apresentado semelhança morfológica com as raízes tuberosas de mandioca, o estudo anatômico das mesmas mostrou que estas resultaram de uma elevada divisão e expansão do córtex com ausência de crescimento secundário e acúmulo de amido. Por outro lado, plantas *in vitro*, cujo sistema radicular se desenvolveu na ausência da luz, formaram raízes tuberosas com presença de amido, câmbio e felogênio, isto é, com as características típicas de crescimento secundário. Plantas *in vitro* submetidas a diferentes fotoperíodos e concentrações de sacarose não apresentaram nenhum espessamento de suas raízes. Em condições de hidroponia, ocorreu um espessamento das raízes quando tratadas com 0,4 μ M BAP ou 1,6 μ M ANA + 0,4 μ M BAP, aplicados diretamente na solução nutritiva. Nestas raízes, como nas *in vitro*, foi observado um

* - Orientadora: Damares de Castro Monte-Neshich. Membros da banca: Cecília Gonçalves Costa e Moacir Pasqual.

elevado espessamento aproximadamente 48-72 h após a aplicação das soluções indutoras. Anatomicamente, as raízes tuberiformes obtidas em hidroponia, apresentaram as mesmas características das plantas induzidas *in vitro*. Análises anatômicas das raízes tuberosas de mandioca provenientes do campo em estágios iniciais, sugerem que somente a raiz tuberiforme desenvolvida na ausência de luz, *in vitro*, tenha tuberizado de maneira semelhante ao processo natural. Foi ainda observado, que as raízes em estágios iniciais de tuberização no campo, não apresentam crescimento secundário nem acúmulo de amido, observações não relatadas na literatura.

SUMMARY

Cassava (*Manihot esculenta* Crantz.) tuberiform roots induction in *in vitro* and in hydroponic system.

The aim of this work was to develop an *in vitro* and a hydroponic tuberization system for cassava (*Manihot esculenta* Crantz.) in order to study the developmental process of a tuberous root and regulatory factors involved. *In vitro* plants were submitted to a variety of hormonal treatments. The plants treated preferably with 0.4 μM BAP + 1.6 μM ANA and/or 0.4 μM DHZ + 1.6 μM ANA produced tuberiform roots. Although these roots have shown a morphological resemblance to actual cassava roots, anatomical studies revealed that they were a consequence of high cell division and cortex expansion, without any secondary growth or starch deposition. *In vitro* grown plants, whose root system were developed in the absence of light, produced tuber-like roots showing starch deposition and other secondary growth features. When submitted to different photoperiods and sucrose concentrations they did not show any root thickening. Plants grown under hidropony conditions produced enlarged roots when treated with BAP 0.4 μM or ANA 1.6 μM + BAP 0.4 μM directly in the grown solution. Like the *in vitro* plants roots, a thickening of the roots was observed approximattely 48-72 hours after treatment with growth regulators. Anatomical studies of tuber-like roots obtained in hydroponic system revealed the same anatomical features of the *in vitro* plants. Simultaneously, anatomical analysis of field grown roots

in early stage, of development suggest that neither *in vitro* nor hydroponic treatments. Exception of that were the tuber-like roots obtained in the absence of light. tuberized in the same manner as the natural process. On the other hand, anatomical analysis of the field grown roots in the very early stage of development indicated the absence of secondary growth and starch deposition (not yet described).

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO GERAL

Até o momento, são poucas as informações existentes sobre os fatores endógenos e exógenos que controlam o processo de tuberização da mandioca. De modo geral, os centros de pesquisa que estudam este processo, apenas traçam um paralelo aos vários parâmetros e resultados já obtidos com a tuberização da batata (*Solanum tuberosum* L.). Desta forma, há necessidade de estudos básicos que forneçam informações sobre os fatores e mecanismos responsáveis pelo processo de tuberização da mandioca, em especial, aqueles que determinam o início do processo. O estabelecimento de um sistema sincronizado de tuberização servirá como uma ferramenta para o estudo, identificação e manipulação dos genes que regulam este processo.

O estudo referente ao desenvolvimento do sistema radicular apresenta várias dificuldades, principalmente, com relação ao acompanhamento do desenvolvimento do órgão. Tendo em vista estas dificuldades, o desenvolvimento de um sistema de tuberização sob condições controladas, em hidroponia e *in vitro*, pode contribuir para a identificação e o estudo dos indutores endógenos e exógenos do processo de tuberização, dos mecanismos envolvidos na relação fonte e dreno no início e ao longo do processo e, para o estudo da regulação e manipulação de genes envolvidos no processo de tuberização.

Paralelamente, o estudo anatômico ontogenético da tuberização no campo é o passo inicial para que estruturas tuberiformes, obtidas sob condições controladas de cultivo tenham seus

padrões de desenvolvimento comparados ao processo natural de desenvolvimento, gerando importantes informações para o estudo do processo de tuberização da mandioca e outras espécies tuberosas.

1.1 A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz.)

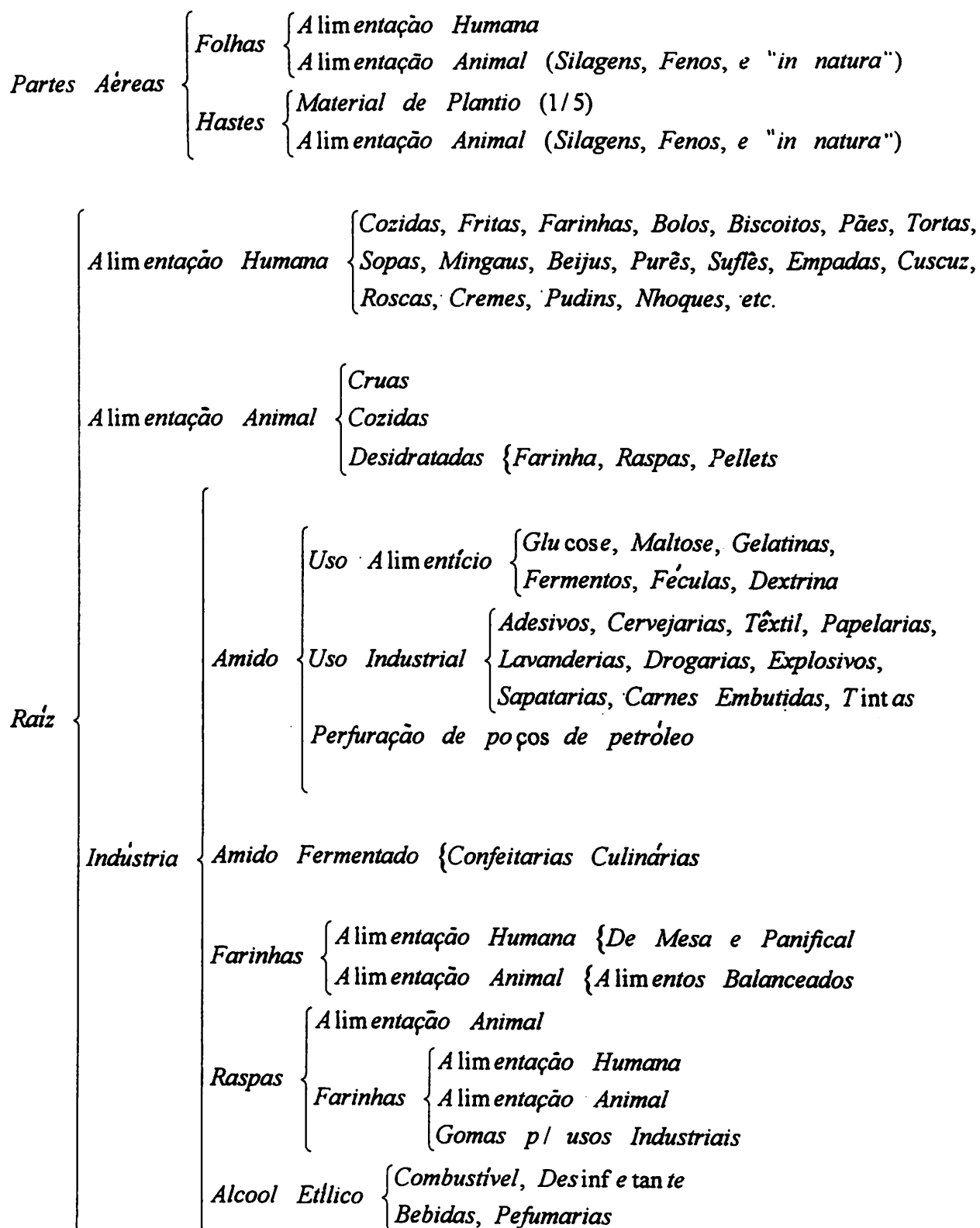
A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz.) é uma planta arbustiva, dicotiledônea, perene, heliófila, da família Euphorbiaceae. O gênero *Manihot* possui cerca de 200 espécies estudadas (Conceição, 1979), e ocorre principalmente em regiões de clima tropical. Existem mais de 5000 variedades de mandiocas quanto à adaptação, à genética e à morfologia (CIAT, 1993).

Sua provável origem, há mais de 5000 anos, é na América Tropical (CIAT, 1993), mais precisamente na América do Sul (Allem e Goedert, 1991). Alguns estudos sugerem ter sido descoberta por tribos Tupis, Guaranis ou Tapuias, no Norte e Nordeste do Brasil que, em função da falta de alimento, procuravam raízes de plantas que pudessem ser utilizadas como tal (Viégas, 1976). Trabalhos mais recentes sugerem que sua origem provável é mesmo no Brasil (CBN, 1994).

A planta da mandioca tem diversas utilidades (Figura 1), é o 6º alimento mais produzido mundialmente (Woolfe, 1992), sendo o alimento básico de mais de 500 milhões de pessoas (CIAT, 1993), principalmente nos países de terceiro mundo. Sua principal parte, sob o aspecto econômico, são suas raízes tuberosas, ricas em amido. Já a parte aérea da planta, geralmente desprezada, tem grande potencial na alimentação animal (Carvalho, 1994) e humana (Motta *et al.*, 1994).

De um modo geral, todas as partes da planta apresentam-se tóxicas devido à presença de compostos glicosídeos cianogênicos, a linamarina, que quando hidrolisada, libera o ácido cianídrico (HCN). Em função da concentração de HCN nas raízes tuberosas da mandioca, esta é

FIGURA 1 - Utilizações da mandioca, parte aérea e raiz (EMBRAPA/CNPMPF, 1993).



classificada como mansa ou brava, sendo que a concentração varia em função do genótipo, do genótipo, do estado fisiológico da planta, condições ambientais e métodos de cultivo (Lorenzi e Dias, 1993; Carvalho e Carvalho, 1979).

A mandioca apresenta bons índices de produção em solos de baixa fertilidade e condições ambientais estressantes, principalmente, quando comparada a outras culturas (CIAT, 1993). A pouca exigência quanto à fertilidade do solo, deve-se à associação de suas raízes com micorrizas, sendo que elevadas quantidades de fósforo (P) no solo, diminuem a efetividade da associação do fungo com a raiz e o conteúdo de P nas folhas da planta (Corrêa, Pinto e Oliveira, 1992; Allem e Goedert, 1991; Carvalho *et al.*, 1982; Ezeta e Carvalho, 1982).

O Brasil é o maior produtor mundial de mandioca, com 24 milhões de toneladas (ton) anuais. O consumo *per capita* é de aproximadamente 70 kg/hab/ano. A Região Nordeste tem o consumo de 150 kg/hab/ano, constituindo-se a maior parte deste consumo como farinha (60 kg/hab/ano), ressaltando-se ainda que, cerca de 50% da produção é utilizada como ração animal (CIAT, 1993; Lorenzi e Dias, 1993).

Os continentes africano (69 milhões de ton/ano) e asiático (51 milhões de ton/ano) são os maiores produtores mundiais, onde países como o Zaire chega a ter um consumo de 390,9 kg/hab/ano (CIAT, 1993), sugerindo que a mandioca seja a principal fonte alimentar de seus habitantes, condição típica para os países do terceiro mundo (FAO, 1991).

1.2 Conceitos de raízes e caules tuberosos

As espécies tuberosas apresentam órgãos de reserva com desenvolvimento subterrâneo, sendo que alguns tubérculos podem ocorrer na parte aérea (Modesto e Siqueira, 1981; Strasburger, *et al.*, 1960). A forma de tumor das tuberosidades é consequência, principalmente, da

elevada produção de elementos de xilema e floema provenientes da atividade do câmbio, seguida do depósito de substâncias de reserva, principalmente amido e sacarose, nas células parenquimáticas (Ho, 1988; Modesto e Siqueira, 1981; Font Quer, 1975; Schultz, 1973).

Existem várias definições para a classificação dessas estruturas tuberosas, podendo ocorrer divergências, inclusive, dentro de uma mesma área de concentração.

Para fins estatísticos e comerciais, a Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 1987-1988) classifica os órgãos subterrâneos de reserva mais utilizados na alimentação, como tubérculos (Tabela 1). A Organização das Nações Unidas Para o Desenvolvimento da Agricultura e Alimentação (FAO), fornece dados individuais dos principais tubérculos na produção e no consumo (FAO, 1992), como raízes e batatas (FAO, 1995), ou como raízes e tubérculos (FAO, 1991).

Na olericultura, Filgueira (1972) classifica os principais órgãos subterrâneos comestíveis (Tabela 1) como tubérculos, enquanto Makishima (1987) classifica estas hortaliças em raízes, tubérculos, rizomas ou bulbos.

Na botânica, as divergências ocorrem quanto à origem das raízes e dos caules tuberosos. Alguns autores definem os caules subterrâneos em estruturas especializadas, classificando-os como bulbos, rizomas, tubérculos, cormos e xilopódios. Estes órgãos são perenes, de reserva alimentícia, com propagação vegetativa e presença de gemas (Mauseth, 1991; Walker, 1989; Modesto e Siqueira, 1981; Pereira, 1980; Tortora, Cicero e Pamh, 1970). Outros autores definem as estruturas tuberosas de origem caulinar e radicular como tubérculos (Soares, 1993; Ferri, Menezes e Monteiro, 1981; Abercrombe, Hickmen e Johson, 1969; Usher, 1966). Strasburger *et al.* (1960) definem os tubérculos radiculares e os tubérculos caulinares como órgãos análogos, distinguindo-se alguns tubérculos caulinares pela sua origem, que pode ser dos primórdios foliares ou um espessamento da região inferior do caule.

TABELA 1 - Características agronômicas e botânicas dos órgãos subterrâneos de reserva mais comercializados.

NOME VULGAR	NOME CIENTÍFICO	MATERIAL DE PROPAGAÇÃO (1)	CICLO meses (1)	ÓRGÃO DE RESERVA (2)	ESTRUTURA TUBEROSA (2)	RENDIMENTO MÉDIO (kg/ha/ciclo)(3)	CONSUMO PER CAPITA NO BRASIL (kg/hab/ano) (4)
Alho	<i>Allium sativum</i>	Bulbilho	4-6	Caule	Bulbo	4549	0.33
Batata	<i>Solanum tuberosum</i>	Tubérculo	3-4	Caule	Tubérculo	14026	13.06
Batata-doce	<i>Ipomoea batatas</i>	Tubérculo	3-4	Raiz	Raiz secundária	10150	0.74
Beterraba	<i>Beta vulgaris</i>	Semente	3-4	Raiz	Raiz principal	-	0.92
Cará	<i>Dioscorea batatas</i>	Tubérculo	6-9	Caule	Tubérculo	-	0.09
Cebola	<i>Allium cepa</i>	Semente	2-4	Caule	Bulbo	11579	6.55
Cenoura	<i>Daucus carota</i>	Semente	3-4	Raiz	Raiz principal	-	2.71
Inhame	<i>Colocasia esculenta</i>	Rizoma	6-8	Caule	Cormo	-	0.53
Mandioca	<i>Manihot esculenta</i>	Maniva	9-12	Raiz	Raiz secundária	12616	6.08
Nabo	<i>Brassica rapa</i>	Semente	9	Raiz	Raiz principal	-	0.05
Rabanete	<i>Raphanus sativus</i>	Semente	1	Raiz	Raiz principal	-	0.06

1 - Makishima (1992).

2 - Modesto e Siqueira (1981).

3 - Anuário Estatístico do Brasil (IBGE, 1993).

4 - Pesquisa Orçamentária Familiar (IBGE, 1987/88).

- => dados não fornecidos pelo IBGE (1993).

Os anatomistas classificam estas estruturas tuberosas em função do órgão de origem, caule ou raiz, e em função do tipo de crescimento secundário apresentado, podendo este ser normal ou anômalo. As estruturas tuberosas com crescimento secundário normal, são abundantes em parênquima de reserva, que é o resultado da atividade do câmbio vascular, como por exemplo a raiz da cenoura (Cutter, 1987; Esau, 1959). Já as raízes ou caules com crescimento secundário anômalo, são aquelas nas quais o câmbio apresenta desenvolvimento irregular ou desigual em determinadas regiões, tendo maior produção de xilema em relação a floema ou vice-versa, ou ainda, a presença de câmbios adicionais com abundância em parênquima de reserva (Cutter, 1987; Fhan, 1982; Esau, 1959). O desenvolvimento da raiz tuberosa da mandioca decorre da atividade cambial, produzindo maior proporção de xilema em relação ao floema, sendo que o depósito de amido é feito no parênquima do xilema secundário (Lowe, Mahon e Hunt, 1982; Indira e Kurian, 1977).

Fisiologicamente, as raízes e caules tuberosos são órgãos que podem se apresentar como fonte ou como dreno. Fonte, durante a brotação (batata), e dreno durante o processo de desenvolvimento, como na batata, beterraba, cenoura e outras (Salisbury e Ross, 1992). A formação das raízes de reserva é determinada pela quantidade de assimilados provenientes da parte aérea e mobilizados para os drenos, e por uma variação no conteúdo dos níveis dos hormônios (Vreugdenhil e Struik, 1989; Elliott *et al.*, 1983; Leopold e Kriedemann, 1975; Vince-Prue, 1975). O processo de desenvolvimento das raízes e caules tuberosos é compreendido em três estágios: i) divisão celular; ii) expansão das células; e iii) armazenamento de carboidratos (Duncan e Ewing, 1984; Hole, Thomas e Mckee, 1984). Observa-se também que há uma paralisação do crescimento, tanto da parte aérea como das raízes (Duncan e Ewing, 1984; Heath e Holdsworth, 1948 citado por Leopold e Kriedemann, 1975; Parot, 1973). Jameson, Mckha e Haslemore (1985) sugerem que um bom indicador do início da tuberização em batata é a redução

no conteúdo de açúcares solúveis acompanhada principalmente do depósito de amido, nos ápices dos estolões.

Ao nível molecular, foram isolados genes que se expressam especificamente na raiz (Aeschbacher, 1994; Conkling *et al.*, 1990). No entanto, para o processo da tuberização, não foi identificado qualquer gene específico (Visser *et al.*, 1994; Jackson, Sonnewald e Willmitzer, 1993). Jackson, Sonnewald e Willmitzer (1993) detectaram um gene, que é expresso em folhas de batata durante a tuberização e nas folhas, durante a indução da floração do tomate e do tabaco. Os autores sugerem que este gene pode estar envolvido na regulação do início do processo de dreno, processo este que é comum aos eventos de floração e tuberização. Foram também clonados genes codificadores de três enzimas envolvidas no processo de síntese de amido: enzima de ramificação (“branching enzyme” - BE), amido sintetase ligada ao grão (“granule-bound starch synthase” - GBSS) e adenosina difosfato glicose pirofosforilase (ADPG-Pi). Com o objetivo de estudar a expressão destes genes e visando manipular a qualidade do amido, foram obtidas plantas transgênicas de batata contendo o antisense da ADPG-Pi e (Müller-Röber, Sonnewald e Willmitzer, 1992) e GBSS (Salehuzzman, Jacobsen e Visser, 1993). Em ambos os trabalhos foi observada somente uma diminuição na expressão desses genes e no conteúdo de amido, com um aumento no conteúdo de sacarose nos tubérculos. Não foi relatada nenhuma variação na relação amilopectina / α -amilase.

As raízes tuberosas da mandioca, no início do processo de tuberização, podem ser denominadas de túberas (Carvalho e Ezeta, 1983), enquanto no seu estado desenvolvido são chamadas de raízes tuberosas (Lowe, Mahon e Hunt, 1976; Nair e Sinha, 1968), raízes de reserva (Lorenzi e Dias, 1993; Keating, Wilson e Evenson, 1985; Conceição, 1979), ou tubérculos (Salehuzzaman Jacobsen e Visser, 1994; Indira e Ramanujam, 1979; Indira e Maini, 1973; Sinha, 1973).

Neste trabalho, a palavra tuberiforme, ou seja, semelhante a um tubérculo (Ferri, Menezes e Monteiro, 1981; Font Quer, 1975), será adotada ao longo do texto, para as plantas, cujas raízes apresentarem um espessamento em resposta aos tratamentos com soluções compostas por reguladores de crescimento, em condições *in vitro* ou em condições hidropônicas.

1.3 Processo de tuberização

A tuberização é definida como um forte dreno de armazenamento, podendo a estrutura tuberosa atuar em algumas espécies como fonte, quando em condições de crescimento da planta ou em condições de estresse (Ho, 1988; Lenton, 1984).

Gregory (1956), em estudos com batata, estabeleceu que a tuberização é induzida por estímulos transmitidos da parte aérea, sob determinadas condições de fotoperíodo e temperatura. A partir deste trabalho, passou-se a enfatizar bastante estes dois fatores. Madec (1961) aplicou o extrato foliar de plantas de batata, sob condições indutoras, em estacas de batata e observou, após uma semana, o início da tuberização, já o controle, tratado com extrato foliar de outra planta, não tuberizou. Sinha (1973), trabalhando com enxerto de *M. esculenta* (que forma raízes tuberosas) em *M. glaziovii* (que não forma raízes tuberosas) e vice-versa, observou que ocorria tuberização somente quando a *M. esculenta* era enxertada em *M. glaziovii*. Os estudos citados acima, sugerem a presença de um produto endógeno proveniente da parte aérea, o qual induz o processo de tuberização.

Baseado nas conclusões de Gregory (1956), fotoperíodos curtos e temperaturas noturnas amenas seriam os principais indutores da tuberização em batata. Plantas de batata submetidas a temperaturas extremas (32/18 ou 32/28 °C) diminuíram sua produção (Menzel, 1980 e Reynold e Ewing, 1989). Menzel (1983) observou que o aumento da temperatura provocou um aumento no conteúdo de ácido giberélico (AG) nas gemas e não nas folhas de batata. Forsline e Langille (1975)

observaram, em batata, que condições não indutoras (30°C/16 h), diminuíram os níveis de citocinina. Em jacatupé (*Pachyrrhizus tuberosus*), elevadas temperaturas (30/25 °C) inibiram totalmente a tuberização, conforme Alvarenga e Válio (1989).

Wheeler e Tibbts (1986) observaram que algumas cultivares de batata, sob luz contínua, tuberizaram melhor do que outras sob fotoperíodo curto, contrariando afirmações de Gregory (1956), onde o processo de tuberização ocorreu e fotoperíodo curtos. Também em batata-doce foram obtidos melhores resultados com fotoperíodo longo, quando se obteve, inclusive, maior produção (Bonsi *et al.*, 1992).

Bolhuis *et al.* (1966, citado por Conceição, 1979) observaram que fotoperíodos curtos (10-12 h) são melhores para a produção de raízes tuberosas de mandioca. Esses dados foram confirmados por Moligner, Orioli e Blettler (1967) com fotoperíodo de 6 e 10 h, por Lowe, Mahon e Hunt (1976) com fotoperíodo de 8h e Carvalho e Ezeta (1983) com fotoperíodo de 12 h. Em contrapartida, Nair e Sinha (1968) verificaram maior número de raízes tuberosas de mandioca em fotoperíodos longos, de 12 e 16 h. Resultados similares foram obtidos por Indira e Ramanujam (1979), com fotoperíodo de 16 e 20 h e Keating, Wilson e Eveson (1985) com fotoperíodo de 16 h. Kasele *et al.* (1986) observou que o sombreamento atrasou em 40 dias o início da tuberização, diminuindo o tamanho das células, como também o peso da matéria seca, com fotoperíodo de 12 h. Para alguns dos autores citados acima, existe um consenso de que, a fim de se verificar estes resultados contraditórios, o ideal seria a realização dos experimentos com 9-10 meses, com a integridade dos fotoperíodos. É importante ressaltar, no entanto, que os trabalhos anteriormente citados utilizaram variedades diferentes.

O papel dos hormônios endógenos no processo da tuberização tem sido amplamente estudado, principalmente na batata, onde se observaram o envolvimento e mudança em vários deles durante o processo de desenvolvimento das estruturas tuberosas (Vreugdenhil e Struik, 1989; Elliott *et*

al., 1983). Entretanto, nenhum demonstrou ser o sinal indutor para o início do processo de tuberização (Jackson e Wilmitizer, 1994; Prat *et al.*, 1990; Jameson, Mcwha e Haslemore, 1985).

O papel dos hormônios na tuberização foi demonstrado por Palmer e Smith (1969) em batata cultivada *in vitro*, quando consideraram a cinetina o melhor composto citocinínico da indução, sendo as citocininas sugeridas como indutoras de um dreno metabólico desencadeado na formação do tubérculo. Forsline e Langille (1975), trabalhando com batata em condições indutoras (26 °C/12°C e fotoperíodo de 8 h), observaram um aumento de compostos citocinínicos, o que não ocorreu em condições não indutoras (28 °C de dia por 25 °C de noite, fotoperíodo de 16 h). Esses resultados também foram observados por Mauk e Langille (1978) em tecidos de batata em condições indutoras, por Hashizume Suye e Sugiyama (1985), com tubérculos de batata e em raízes tuberosas de batata-doce (Sugiyama e Hashizume, 1989). Compostos citocinínicos, como zeatina ribosídeo (ZR), diidroxizeatina ribosídeo (DHZ) e zeatina (Z), foram também detectados por Melis e van Standem (1984) em raízes tuberosas de mandioca. Plantas de batata tratadas com solução de cinetina, tiveram seus tubérculos mais uniformes em tamanho (Blunden e Wildgoose, 1977). Em contrapartida, Jameson, Mcwha e Haslimore (1985) não observaram variações nos níveis de citocininas em fases iniciais da tuberização, sugerindo não serem estas responsáveis pelo desencadeamento do processo de tuberização. Da mesma forma, Baijal *et al.* (1983) observaram que o ácido indolacético (AIA) e a cinetina, não tiveram nenhum papel na tuberização de batatas sementes, sendo que o AG favoreceu tanto a indução como a produção de tubérculos.

Koda e Okazawa (1988) detectaram um composto ácido nas folhas de batata sob condições indutoras, o qual aumenta ao longo da tuberização. Os autores o denominaram de indutor da tuberização, tendo atividade cromatográfica maior e diferente das citocininas e do ácido abscísico (ABA). Após a determinação da estrutura química, o indutor da tuberização foi denominado como ácido tuberônico, o qual tem estrutura semelhante à do ácido jasmônico (AJ) (Yoshihara, 1989; citado

por Koda e Kikuda, 1991). Conforme descrito anteriormente, Koda e Kikuda (1991) sugeriram ser o AJ o real indutor da tuberização, baseado no fato de compostos derivados do AJ terem sido detectados em folhas de cará (monocotiledônea). Jackson e Willmitzer (1994) observaram que o AJ, quando aplicado em plantas sob condições não indutoras no campo, não reverteu a condição não indutora, sugerindo que o AJ tem algum papel na tuberização somente após a indução. Yoshihara *et al.* (1992), trabalhando com *Helianthus tuberosus* L. (forma tubérculo em fotoperíodo curto, como a batata) não detectaram nenhuma fração do ácido tuberônico na parte aérea, sendo encontrados apenas compostos acetilênicos. Tendo em vista os diferentes resultados citados acima, Yoshihara *et al.* (1992) sugerem que o processo de tuberização nas diferentes espécies tem mecanismos e indutores distintos, influenciados pelo ambiente.

Enquanto para alguns autores o etileno é tido como indutor da tuberização em batata, tendo um papel na diminuição dos conteúdos inibidores do AG (Hammes e Nel, 1975; Cathchpole e Hillman, 1969), outros o consideram inibidor, atuando de forma a diminuir os níveis de citocinina endógena (van Staden e Dimalia, 1977). Vreugdenhil e Van Dijk (1989) observaram o mesmo efeito inibitório do precursor do etileno, ácido 1-aminociclopropanóico-1 (ACC), na tuberização da batata, sugerindo a inibição devido a uma paralisação no crescimento do estolão. Shanmugam e Shanmughavelu (1974) aplicaram diferentes doses de “Ethrel” e observaram aumento do número de tubérculos de mandioca no campo. Em contrapartida, Indira e Maini (1973), observaram que o CCC inibiu o enraizamento e depósito de amido. Já no rabanete, Vreugdenhil, Harro e Bouwneester (1989) observaram o mesmo efeito inibidor do etileno, *in vitro*.

Baijal *et al.* (1983), trabalhando com batata, demonstraram uma das poucas situações em que o ácido giberélico (AG) apresenta um papel de indutor da tuberização. Entretanto, vários outros autores demonstraram o AG como inibidor da tuberização da batata (Hannapel, Muller e Park, 1985; Pereira e Válio, 1984; Kumar e Wareing, 1974), bem como, da mandioca (Melis e van Staden, 1984).

Seu efeito pode ser revertido na presença de cloreto de 2-cloroetiltrimetilamônio (CCC) ou do ABA, quando aplicados na parte aérea da batata (Agarwal, Kumar e Alka, 1983; Menzel, 1980; Hammes e Nel, 1975). Mesmo inibindo a tuberização, o AG não altera os níveis de α -amilase nas gemas de batata inibidas, o que sugere que o AG inibe a tuberização e não afeta a hidrólise do amido (Pereira e Válio, 1984). Foi observado ainda, o seu papel como inibidor da patatina e de outras proteínas (Bourque, Miller e Park, 1987). Indira e Sinha (1970), observaram em mandioca, que o AG e o CCC inibiram o enraizamento que ocorre a partir dos calos, enquanto o ANA aumentou o mesmo, porém ambos (AG e CCC) não afetaram o enraizamento que ocorre a partir dos nós, embora tenha sido observada a inibição do crescimento secundário e depósito de amido nestas raízes. Estes resultados foram confirmados por Indira e Maini (1973), quando observaram que somente os compostos auxínicos (ácido indolilbutírico - AIB, ácido naftalênico acético - ANA, AIA, ácido indolilpropiónico - IPA) induziram a formação de raízes, aumentando o depósito de amido nas mesmas, sem afetar o número de tubérculos de mandioca no campo. Mellis e Van Staden (1984) observaram que o uso de AG induziu o crescimento da parte aérea e reduziu o crescimento das raízes tuberosas da mandioca, sugerindo que estes tiveram o papel de dreno invertido para fonte. Os autores observaram a diminuição do nível e da atividade de citocininas e ABA nos tubérculos das plantas tratadas com AG.

As proteínas de tubérculos mais estudadas são as de reserva, onde se destacam principalmente a patatina em batata (Prat *et al.*, 1990; Racusen e Foote, 1980;) e a esporamina na batata-doce (Hattori, Matsuoka e Nakamura, 1988; Maeshima, Sasaki e Asahi, 1985). Estas proteínas se acumulam nas raízes ou nos caules tuberosos durante o processo de tuberização, porém, não existe nenhuma evidência que tenham qualquer envolvimento com o desencadeamento do processo de tuberização.

A raiz tuberosa da mandioca contém baixos níveis de proteínas, cerca de 1-2% (Teles *et al.*, 1983). Assim um dos principais objetivos do melhoramento genético da mandioca é o aumento do conteúdo protéico nas raízes tuberosas, através de cruzamentos com variedades silvestres ou através da

engenharia genética. Entretanto, esta última alternativa depende de um protocolo de transformação genética, ainda não disponível (Shewry *et al.*, 1993; Nassar e Costa, 1977; Bolhuis, 1953).

Os principais polissacarídeos de reserva dos vegetais, tubérculos e raízes tuberosas são o amido (batata e mandioca), junto com a sacarose (beterraba e cenoura), porém em alguns casos podem ser as fructosanas (cebola e *Heliantus*) e inulinas (Ho, 1988; Leopold e Kridemann, 1975). Após a fixação do CO₂, o amido é sintetizado e armazenado temporariamente nos cloroplastos, e em seguida entra na biossíntese da sacarose, que é a principal forma de transporte dos carboidratos, através do floema, sendo então deslocado para as regiões de crescimento ou de armazenamento (Sonnewald., Von Shaewen e Willmitzer, 1993; Hawker, Jenner e Niemietz, 1991; Esechie, 1980). Nos órgãos de reserva, o amido é depositado nos amiloplastos, sendo que na raiz da mandioca, está entre 80-85% do peso da matéria seca (Cock, 1985).

Com relação a mandioca, as raízes são provenientes, na sua maioria, dos calos nas extremidades das manivas, tendo ainda aquelas em menor quantidade oriundas dos nós (Conceição, 1979; Indira e Sinha, 1970). Indira e Kuriam (1977) observaram raízes provenientes dos calos, após uma semana; já Sinha (1973) e Conceição (1979) observaram que as raízes são primeiramente emitidas e, após 7-10 dias, aparecem as primeiras folhas. Este fato pode estar associado a uma maior facilidade de translocação das reservas da maniva no sentido longitudinal, de onde irão se originar as raízes, do que no sentido radial, quando a translocação das reservas para os nós irá originar a parte aérea (Viégas, 1976). Estas raízes provenientes da extremidade da maniva são oriundas de calos, que parecem originar-se do câmbio e posteriormente são suberizadas externamente, sendo que suas células, no interior, transformam-se nos vasos condutores, estabelecendo uma comunicação entre a maniva e a raiz. (Viégas, 1976). As raízes tuberosas não oriundas das extremidades da maniva são provenientes de lenticelas, de cicatrizes das estípulas, ou das gemas (Conceição, 1979). Lowe, Mahon e Hunt (1982)

ressaltam que algumas raízes tuberosas apresentam um espessamento em função do crescimento secundário no início do processo, porém dão continuidade à tuberização.

Quanto ao depósito de amido e ao aumento do diâmetro das raízes tuberosas da mandioca, as informações são muito contraditórias. Segundo Viégas (1976), somente a partir de 6 meses se inicia o espessamento da raiz. Lorenzi e Dias (1993) afirmaram que o processo de tuberização se inicia por volta de 3 meses. Conceição (1979) coloca que as raízes iniciais são substituídas por outras, durando este processo de 70-80 dias, enquanto que para Keating, Wilson e Evenson (1985), duraria de 42-63 dias. Indira e Sinha (1970) observaram o início do crescimento secundário após 3 semanas, sem depósito de amido, sendo que o suprimento de sacarose e glicose nas manivas cujas gemas foram excisadas, não inibiu o crescimento secundário e depósito de amido nas raízes. Lopez e Cock (1976), Indira e Kuriam (1977) e Lowe, Mahon e Hunt (1982) observaram que o depósito de amido se inicia entre 3-6 semanas após o plantio, sendo precedido por um crescimento secundário.

Pouco se sabe sobre as mudanças assumidas pelas raízes tuberosas da mandioca no início da tuberização, e muito menos sobre o papel dos fatores endógenos e exógenos que irão desencadear o início deste processo. Diante desta lacuna, o objetivo deste trabalho foi o de desenvolver um sistema de tuberização sob condições controladas de cultivo, em hidroponia e *in vitro*. Foi realizado o estudo ontogênico de plantas provenientes do campo e análises anatômicas das raízes tuberiformes, visando avaliar se as raízes tuberiformes obtidas sob condições hidropônicas e *in vitro* apresentam o mesmo padrão anatômico de raízes de mandioca tuberizadas no campo.

CAPÍTULO 2

ONTOGENIA DE RAÍZES DE MANDIOCA NO CAMPO

2.1 INTRODUÇÃO

2.1.1 Anatomia da raiz da mandioca e de outras estruturas tuberosas

As estruturas tuberosas são especializadas no armazenamento. Em alguns casos, sua formação ocorre devido à atividade cambial desigual ou à produção de câmbios múltiplos. Nestes casos, são classificadas como estruturas secundárias anômalas, quer sejam de origem caulinar ou radicular, sendo ambas abundantes em parênquima de reserva (Cutter, 1987; Fhan, 1982; Esau, 1976). De modo geral, o crescimento secundário da raiz ocorre de forma semelhante ao do caule, ou seja, formação dos tecidos vasculares secundários oriundos da atividade do câmbio vascular. Este crescimento é uma característica comum às dicotiledôneas e gimnospermas, ausente nas criptógamas e na maioria das monocotiledôneas (Cutter, 1987; Esau, 1976).

Na mandioca, a transição da raiz para raiz tuberosa pode apresentar protoxilema tetrarco, pentarco ou hexarco (Lowe, Mahon e Hunt, 1982; Indira e Kurian, 1977; Duncam e Mcpherson, 1974; Paliwal e Kavathekar, 1971), ressaltando-se que, segundo Fahn (1982), o número de pólos do protoxilema pode variar entre as raízes de uma mesma planta. A formação da raiz tuberosa na mandioca é o resultado da atividade cambial, seguida do depósito de amido, principalmente, nas células do parênquima do xilema secundário (Indira e Kurian, 1977; Paliwal e Kavathekar, 1971).

De modo geral, considera-se que o crescimento secundário precede ao depósito de amido (Indira e Kurian, 1977; Lopez e Cock, 1976; Indira e Sinha, 1970). Indira e Sinha (1970) observaram ainda, que as raízes tuberosas, provenientes das gemas ou dos calos da região basal, não apresentaram diferenças anatômicas. Ressalte-se que alguns trabalhos sugerem que, nos estágios iniciais do desenvolvimento da raiz tuberosa da mandioca, os metabólitos seriam provenientes das reservas, encontradas na maniva (Lowe, Mahon e Hunt, 1982; Hostalácio e Corrêa, 1979).

A beterraba e a batata-doce são casos típicos de raízes tuberosas, com crescimento secundário anômalo. A raiz da beterraba, onde câmbios adicionais são formados a partir do periciclo e do floema, é constituída de parênquima de reserva encontrado entre os anéis, que são compostos de floema, voltado para o exterior e xilema, para o interior do órgão. O abundante parênquima de armazenamento entre as faixas cambiais concêntricas, é o responsável pelo aumento em diâmetro da beterraba, sendo que 75% da espessura está confinada aos 6 primeiros anéis (Cutter, 1987; Hole, Thomas e Mckee, 1984; Fahn, 1982; Esau, 1976).

A batata-doce apresenta um câmbio normal e outros câmbios anômalos, instalados ao redor dos elementos traqueais do xilema secundário. O depósito de amido ocorre em células parenquimáticas, sendo que os câmbios anômalos em torno dos vasos, levam a um crescimento do floema, rico em parênquima (Cutter, 1987; Fahn, 1982; Indira e Kurian, 1977; Govil, 1971).

No caso da batata, inicialmente, ocorre uma elevada divisão celular, seguida do alongamento das células, divisões das células parenquimáticas pré-medulares próximas ao floema, e depósito de amido (Lanvievilte e Sangwan, 1994; Ewing e Struik, 1992; Duncan e Ewing, 1984; Reeve, Hautala e Weaver, 1969).

Em outros caules e raízes tuberosas, a característica comum é abundante a presença de parênquima de reserva com crescimento secundário distinto (Esau, 1976). Na cenoura e no rabanete, o crescimento secundário é normal, observando-se uma presença inicial maior de

parênquima, oriunda do floema que se mantém posteriormente (Hole, Thomas e Mckee, 1984; Fahn, 1982). A tuberização do nabo é o resultado do espessamento do hipocótilo e de parte da raiz, sendo este o resultado da ativação do parênquima do xilema secundário, mediante uma ativação anômala do câmbio, pobre em floema (Hole, Thomas e Mckee, 1984; Fahn, 1982; Paliwal e Kavathekar, 1971).

Conforme a descrição de Fahn (1982), o crescimento secundário anômalo pode ocorrer em função de uma atividade desigual do câmbio, produzindo mais xilema em relação ao floema ou vice-versa, em determinadas regiões do órgão. A raiz tuberosa da mandioca possui abundante xilema secundário em relação ao floema (Paliwal e Kavathekar, 1971). Esta desproporção é sugerida por Duncan e Mcpherson (1974) como uma característica de estrutura secundária anômala. Já Indira e Kurian (1977) consideraram o início do crescimento secundário, quando ocorre maior produção de floema em relação a xilema, como atividade anômala do câmbio.

Diante de algumas contradições conceituais quanto ao processo de tuberização da mandioca, o objetivo deste trabalho foi o de caracterizar anatomicamente a ontogenia de raízes tuberosas de mandioca no campo, em suas fases iniciais de desenvolvimento, sendo que estas informações serão utilizadas na comparação e confirmação da anatomia das raízes tuberiformes a serem analisadas nos capítulos 3 e 4.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

O preparo das lâminas permanentes realizou-se no Laboratório de Anatomia Vegetal do Departamento de Botânica da Universidade de Brasília (UnB). A análise das lâminas foi realizada no Laboratório de Anatomia Vegetal/UnB e no Laboratório de Produtos Florestais (LPF) do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA).

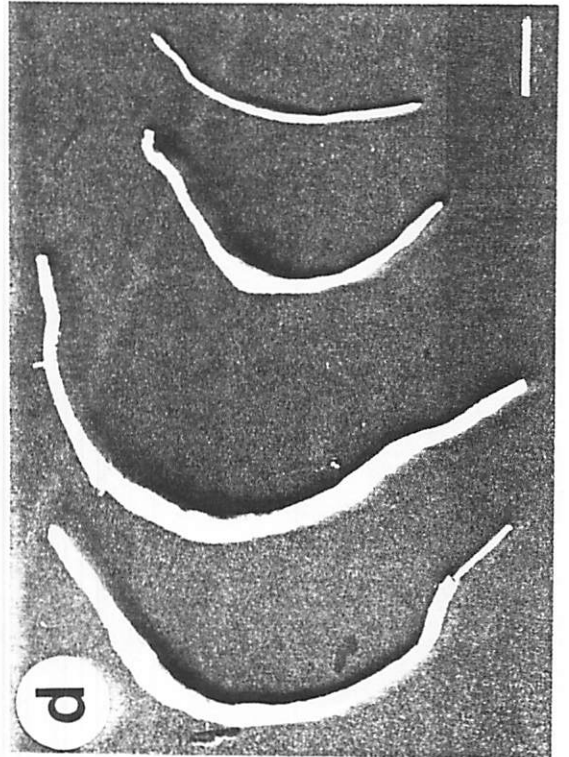
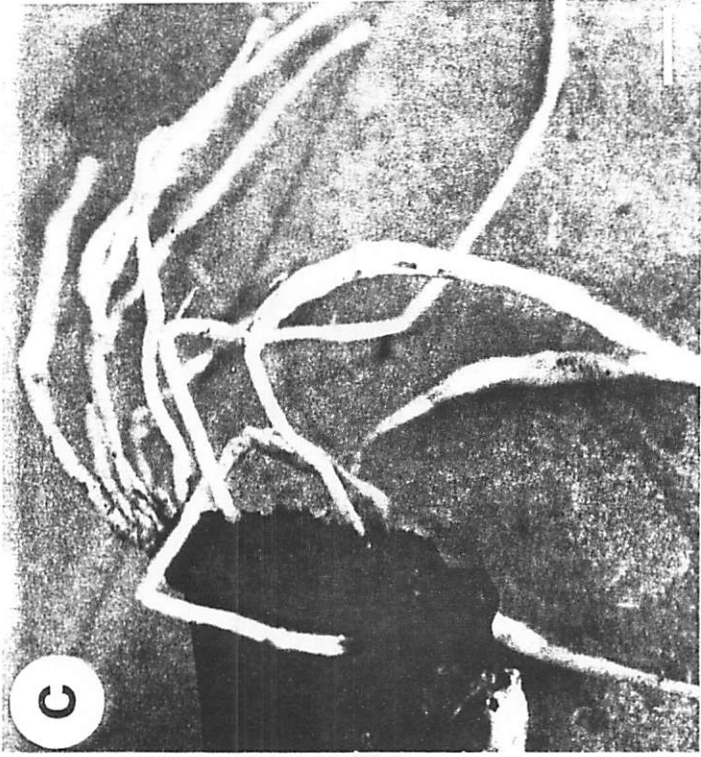
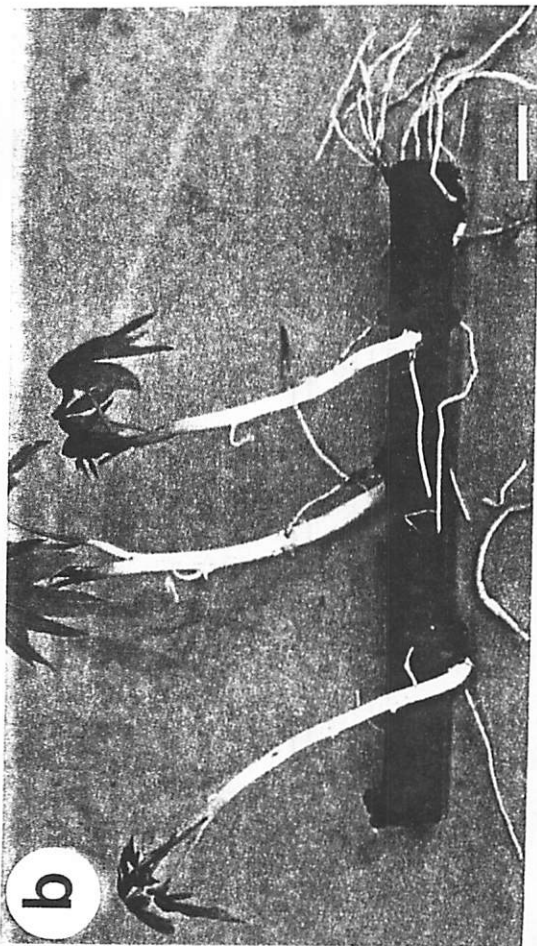
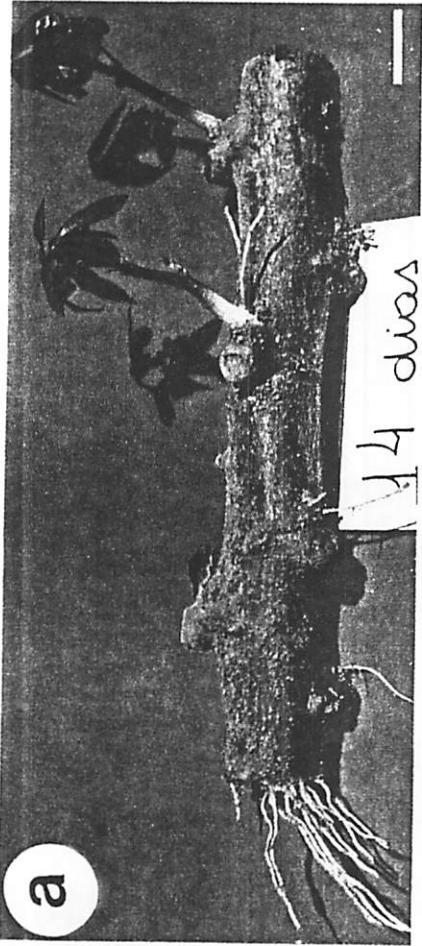
2.2.1 Preparo das lâminas permanentes das raízes de mandioca do campo em diferentes estágios de desenvolvimento.

Plantas de mandioca, cv. Pioneira, com 12 meses de idade, foram coletadas no Centro Nacional de Pesquisa do Cerrado (CPAC), das quais selecionou-se manivas em função da sua posição de origem no caule. Utilizou-se para o plantio, as segundas manivas, a partir da região basal das plantas, tendo cada maniva aproximadamente 20 cm e contendo entre 4-10 gemas. As manivas foram plantadas horizontalmente, a uma profundidade de 5-10 cm e espaçamento de 1,0 x 1,0 m. Fez-se o plantio no início de novembro de 1994, no campo experimental do Centro Nacional de Pesquisa em Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN). As coletas das raízes tuberosas das plantas foram feitas em diferentes estágios de desenvolvimento: aos 14, 25, 40, 60 e 180 dias após o plantio.

O período para coleta das raízes foi determinado em função da data do plantio das manivas. Assim, coletou-se raízes de plantas não tuberizadas com 14 dias (Figura 2a) e de plantas com raízes tuberizadas com 14 dias (Figura 2b, 2c, 2d), 25 dias, 40 dias, 60 dias (Figura 2e) e 180 dias (Figura 3). Em seguida foram lavadas e mapeadas. De cada raiz, selecionou-se amostras das regiões mais espessas, para a observação do crescimento secundário e presença de amido. As amostras com 0,5-1,0 cm de comprimento foram colocadas no fixador FAA-70° GL (Sass, 1943), por tempo mínimo de 72 h. Nas raízes tuberizadas com 180 dias foram selecionadas sete regiões (Figura 3), com diâmetro entre 0,39-2,15 cm, e comprimento entre 0,50-1,00 cm (Figura 3). Após a fixação, todas as amostras foram desidratadas em série etílica, incluídas em parafina e emblocadas (Apêndice 1). Foram feitos cortes seriados transversais com 10-15 µm, no micrótomo de rotação AO Spencer-820. A dupla coloração foi com safranina e “fast-green” (Apêndice 2) e utilizou-se o meio de montagem “Entellan” (Johansen, 1940; Sass, 1943).

As lâminas foram observadas em microscopia óptica, sob luz normal e luz polarizada.

FIGURA 2 - Plantas de mandioca, cv. Pioneira, oriundas do campo: **a)** Manivas não tuberizadas, 14 dias após o plantio (barra da escala = 2,1 cm); **b)** manivas tuberizadas, 14 dias após o plantio (barra da escala = 2,3 cm); **c)** e **d)** destaque para as raízes tuberizadas da maniva da Figura 2b (Figura 2c barra da escala = 0,97 cm); (Figura 2d barra da escala = 0,6 cm); **e)** raízes tuberizadas com 60 dias (barra da escala = 4,6 cm).



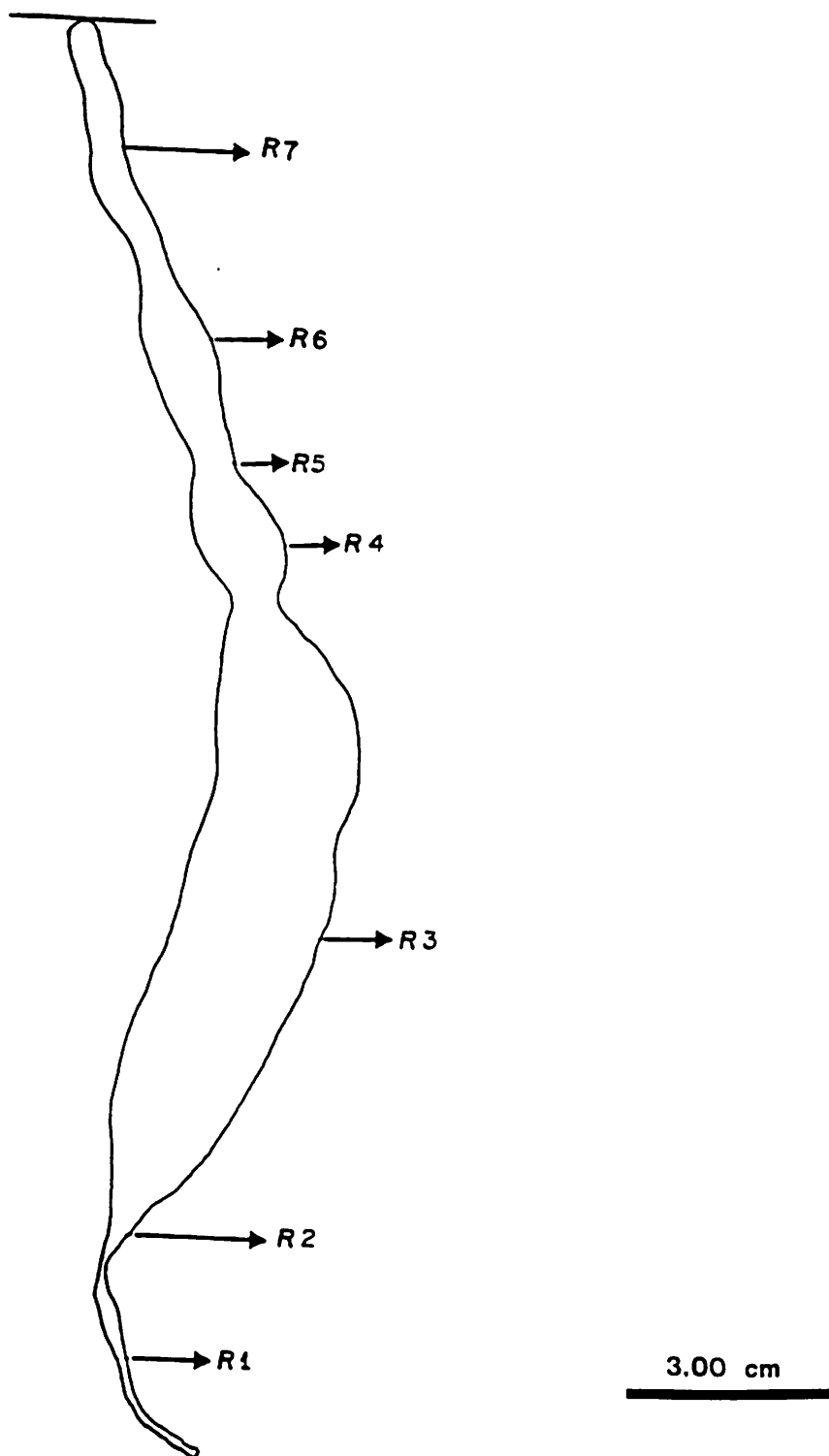


Figura 3 - Diagrama da raiz tuberosa de mandioca, cv. Pioneira, proveniente do campo após 180 dias do plantio, mostrando as sete regiões analisadas.

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Análises anatômicas das amostras das raízes coletadas entre 14 e 40 dias após o plantio das manivas, em raízes tuberizadas ou não, apresentaram protoxilema pentarco e ausência de grãos de amido (Figura 4). Por outro lado as amostras das raízes com 60 dias (dados não apresentados) e as com 180 dias (Figura 5), apresentaram plena atividade cambial e abundante depósito de amido nas células parenquimáticas do xilema secundário.

Nas raízes não tuberizadas (sem espessamento) com 14 dias (Figura 4a) e nas raízes tuberizadas (com espessamento) com 14 (Figura 4b), 25 (Figura 4c) e 40 (Figura 4d) dias, existe uma relação aproximadamente constante quanto ao diâmetro do córtex em relação ao diâmetro do cilindro central. Já nas raízes tuberizadas em estágio mais avançado de desenvolvimento, com 60 (dados não apresentados) e 180 dias (Figura 5) pode-se observar que ocorreu elevada diminuição desta relação (córtex/cilindro central).

A anatomia da raiz tuberosa das plantas com 40 dias após o plantio, apresentou um estágio intermediário do crescimento primário para o secundário. Este estágio foi caracterizado por maior proporção de floema em relação ao xilema secundário, quando ainda era possível se observar o protoxilema pentarco, característico do crescimento primário (Figura 4d). As raízes com 60 (dados não apresentados) e 180 (Figura 5) dias, apresentaram crescimento secundário, e ao contrário do observado na raiz com 40 dias, observou-se maior proporção de xilema secundário em relação ao floema secundário.

Mesmo utilizando manivas que tinham a mesma posição nas plantas de mandioca doadoras, verificou-se uma desuniformidade temporal quanto ao início do processo de tuberização. Raízes tuberizadas, embora sendo coletadas na mesma época (Figura 4b), apresentaram maior espessamento em relação às raízes não tuberizadas, ou seja, 14 dias após o

plantio (Figura 4a). Estas variações quanto ao desenvolvimento das raízes tuberosas entre plantas de mandioca da mesma idade também foram observadas por Lowe, Mahon e Hunt (1982).

Com relação a um não sincronismo no início da tuberização entre as raízes das plantas coletadas com a mesma idade, ou seja, plantas com 14 dias após o plantio das manivas, Hostalácio e Corrêa (1979) sugeriram que a tuberização nestes estágios iniciais pôde ocorrer devido às reservas presentes nas manivas, podendo estas reservas serem responsáveis pelo amido depositado inicialmente nas raízes tuberosas. Estas observações também foram sugeridas por Lowe, Mahon e Hunt (1982), em raízes tuberosas de mandioca em estágios iniciais com ausência da parte aérea. De modo geral, estas observações são fortalecidas em decorrência de vários estudos, nos quais as folhas no início do desenvolvimento, atuam como dreno e só após estas atingirem cerca de 40-70% do seu desenvolvimento, passam por uma transição, assumindo uma função de fonte (Turgeon, 1989). Assim, as folhas presentes nas plantas com raízes tuberizadas com 14 dias (Figura 2b), não teriam capacidade para atuarem como fonte, sendo toda a energia utilizada para a formação das raízes tuberizadas, oriundas das manivas. Ressalte-se que, as raízes tuberizadas com 14 dias, que apresentavam maior espessamento em relação às não tuberizadas da mesma idade, não constatou-se o início do crescimento secundário nem presença de amido.

Com relação às raízes tuberizadas com 40 dias, verificou-se maior proporção de floema à xilema secundário, observações estas também realizadas por Indira e Kurian (1977), em raízes de mandioca no início da tuberização. Estes autores consideraram esta característica como sendo o resultado da atividade anômala do câmbio vascular. Por outro lado, as raízes tuberizadas com 60 dias (dados não apresentados) e 180 dias (Figura 5), apresentaram, ao contrário, maior proporção de xilema em relação ao floema secundários, respectivamente. Esta desproporção do xilema em relação ao floema secundário, também foi descrita por Paliwal e Kavathekar (1971) no desenvolvimento da raiz tuberosa da mandioca. Já Duncan e Macpherson (1974) sugerem esta

FIGURA 4 - Anatomia das raízes tuberosas de mandioca, cv. Pioneira, oriundas do campo. **a)** Raiz com protoxilema pentarco, 14 dias após o plantio, sem tuberização (barra da escala = 30 μm), no destaque aspecto do corte na mesma escala que as Figuras 4b, 4c e 4d (barra da escala = 300 μm); **b)** raiz tuberosa com protoxilema pentarco, 14 dias após o plantio no campo; **c)** raiz tuberosa com protoxilema pentarco, 25 dias após o plantio; **d)** raiz tuberosa 40 dias após o plantio. Destaque para o início do crescimento do secundário, sendo observado ainda os pólos do protoxilema da estrutura primária em forma pentarca (Figuras 4b, 4c e 4d; barra da escala = 300 μm).

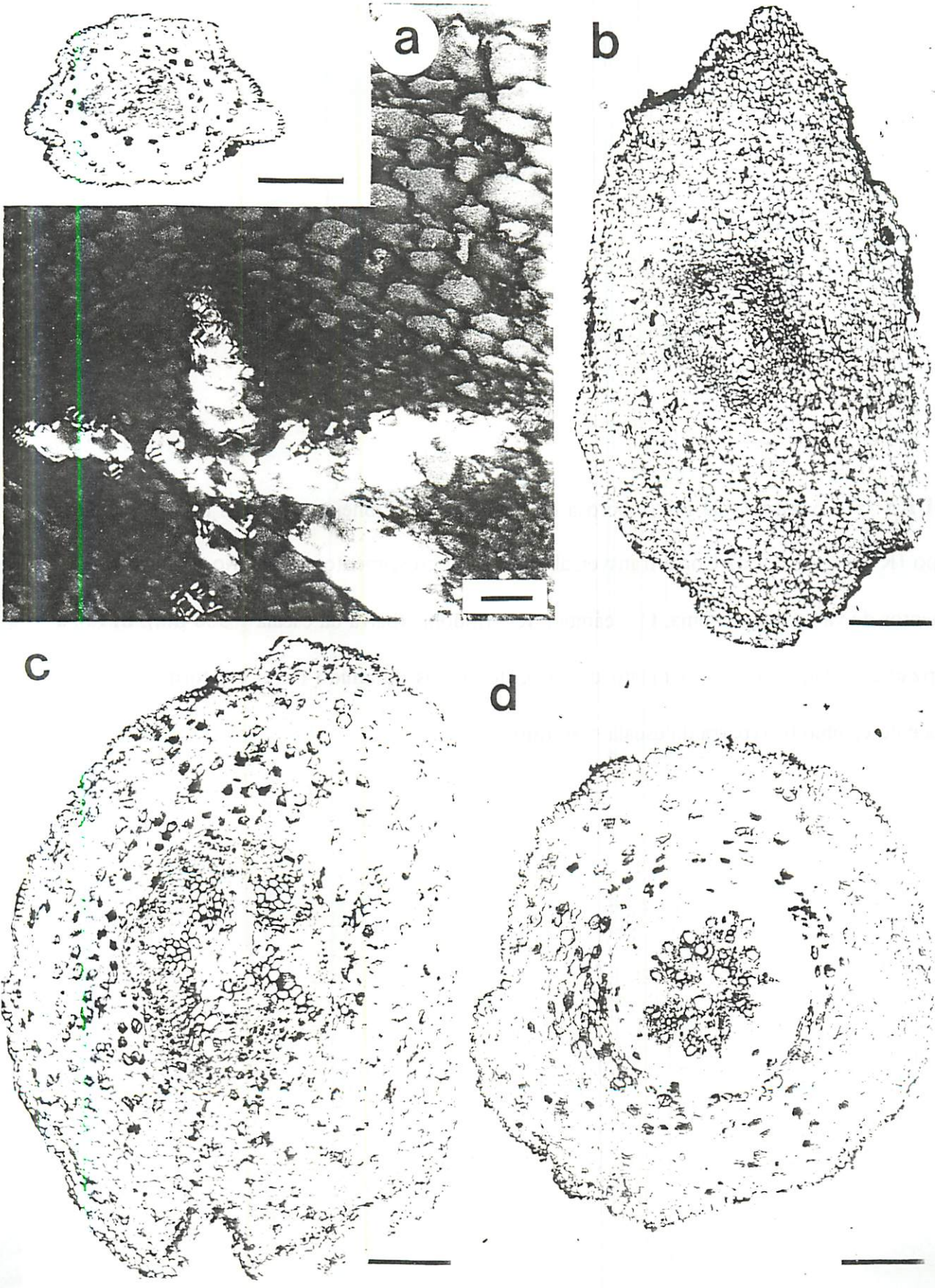
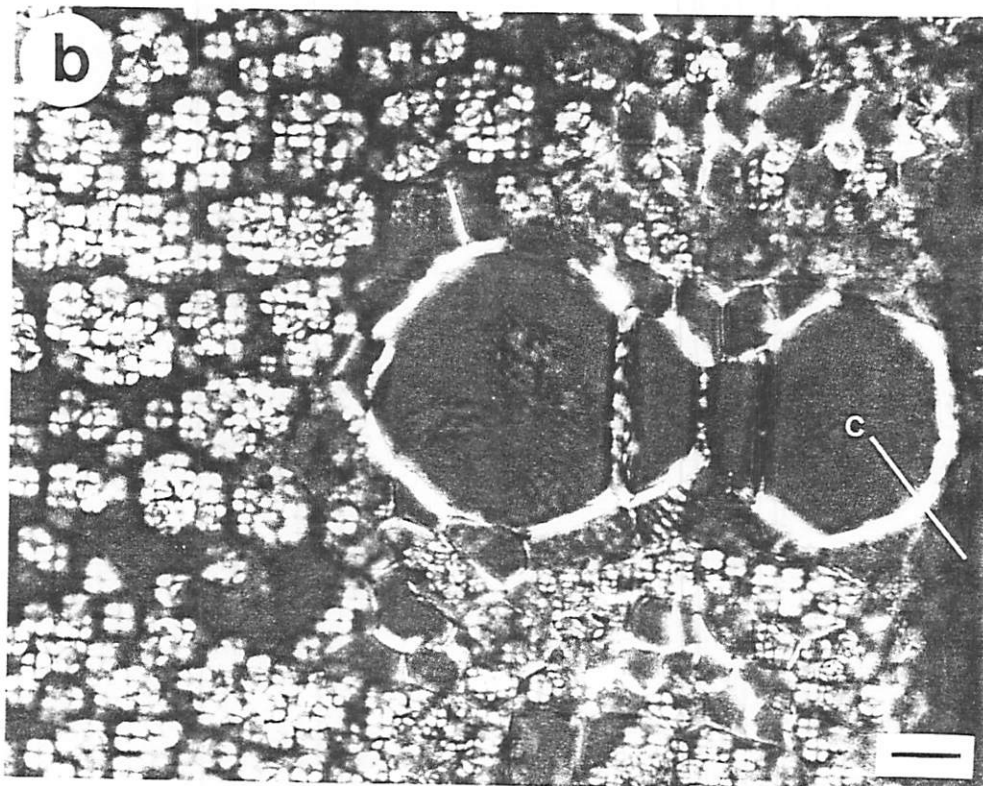
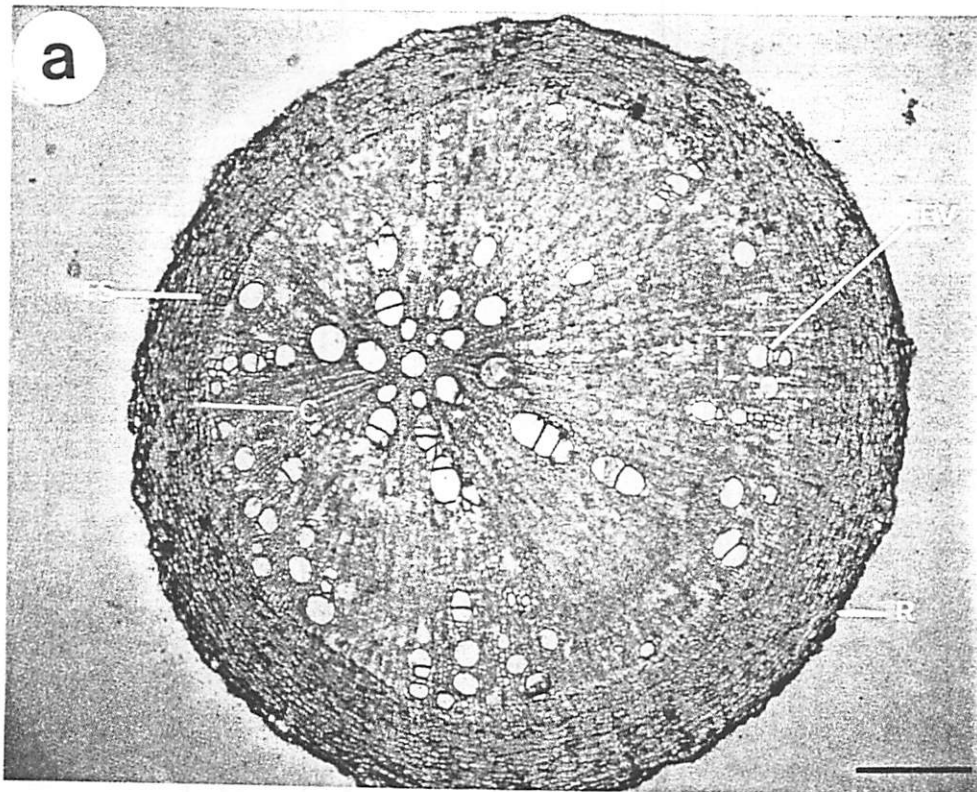


FIGURA 5 - Anatomia da raiz tuberosa de mandioca, cv. Pioneira, 180 dias após o plantio no campo (R1, Figura 3). **a)** Corte transversal mostrando crescimento secundário no campo. EV = elementos de vaso, FS = floema, C = câmbio, R = ritidoma (barra da escala = 300 μm). **b)** Em luz polarizada, destaque para o elemento de vaso, dos grãos de amido (GA) em forma de cruz de malta e do câmbio (C) (barra da escala = 30 μm).



desproporção na raiz tuberosa da mandioca, como sendo o resultado do crescimento secundário anômalo. No entanto, esta desproporção da quantidade de xilema à floema secundário, não passa de uma característica comum, tanto em raízes como em caules com crescimento secundário (Cutter, 1987; Fahn, 1982). Neste processo de aumento do diâmetro da raiz em função da atividade cambial, espera-se que o tecido cortical seja gradualmente reduzido.

Resalte-se que essas observações quanto ao início do crescimento secundário e a ausência de grãos de amido, não significam necessariamente, que este estágio de desenvolvimento ocorra somente no período de 40 dias após o plantio, podendo ser influenciado por vários fatores exógenos e endógenos. A ausência dos grãos de amido nesta fase indica que o crescimento secundário antecede ao depósito dos grãos de amido, conforme descrito previamente por outros autores (Indira e Kurian, 1977; Lopez e Cock, 1976). Devem ser consideradas as informações de Lowe, Mahon e Hunt (1982), que sugerem a possibilidade de algumas raízes tuberosas de mandioca apresentarem espessamento sem posterior tuberização.

Nas raízes das plantas coletadas com 60 dias (dados não apresentados) após o plantio, observou-se menor quantidade dos grãos de amido e tamanho reduzido dos mesmos (dados não apresentados), quando comparados aos observados na região 2 da raiz tuberosa coletada aos 180 dias após o plantio das manivas, observação feita na luz polarizada.

As observações do início do processo de tuberização aos 14 dias após o plantio (Figura 2b, 2c, 2d e 4b), são confirmados por Indira e Kurian (1977), que obtiveram resultados com raízes mais precoces, nas quais o início do crescimento secundário foi observado aos 21 dias após o plantio das manivas, e o início do depósito de amido no 26º dia.

2.4 CONCLUSÕES

O início da formação da raiz tuberosa, aos 14 dias após o plantio, deve-se ao aumento na divisão das células do córtex, acompanhada por diferenciação do cilindro central, não apresentando crescimento secundário, nem depósito de amido.

Raízes tuberosas das plantas com 14, 25 e 40 dias após o plantio não apresentam grãos de amido, o que sugere que a raiz dá início ao crescimento secundário e só depois ocorre o depósito de amido.

O aumento do diâmetro das raízes tuberosas com 60 e 180 dias após o plantio das manivas, decorre da atividade do câmbio vascular.

Tendo em vista o estudo do processo de tuberização como um todo, faz-se necessário prosseguir às análises anatômicas de raízes em fases intermediárias, que antecedam o crescimento secundário e depósito de grãos de amido.

CAPÍTULO 3

ESTRATÉGIA PARA A OBTENÇÃO DE RAÍZES TUBEROSAS DE MANDIOCA *IN VITRO*

3.1 INTRODUÇÃO

O cultivo de plantas *in vitro* é uma técnica valiosa para estudar-se o crescimento e desenvolvimento de plantas. Assim, a possibilidade de reprodução do processo de tuberização sob condições controladas, é uma importante ferramenta para avaliar os fatores envolvidos neste processo, podendo ser de grande utilidade no melhoramento de espécies tuberosas.

Em função das dificuldades inerentes ao melhoramento genético clássico da mandioca (Espinoza, 1991), tem ocorrido uma grande demanda pela tecnologia de estudos *in vitro*, principalmente, pela obtenção de um sistema de transformação genética e de tuberização (Salehuzzaman, Jacobsen e Visser, 1994; Shewry *et al.*, 1993). Entretanto, até o momento, os estudos *in vitro* com a mandioca concentram-se no desenvolvimento de sistemas de conservação, propagação, regeneração (Roca *et al.*, 1992; Pinheiro *et al.*, 1989 e Nair, Kartha e Gamborg, 1979), transformação genética (Cabral *et al.*, 1993; Chavarriaga *et al.*, 1993; Schöpke *et al.*, 1993; Alejandro, 1987-1988), uso de marcadores genéticos moleculares (Angel *et al.*, 1993; Carvalho *et al.*, 1993) e de enzimas envolvidas na síntese do amido (Salehuzzaman, Jacobsen e Visser, 1994). Poucos trabalhos desenvolveram-se visando a obtenção de raízes tuberosas de

de mandioca *in vitro* (Konan, Sangwan e Sangwan-Norreel, 1994 e Cabral *et al.*, 1993; Maria 1987; Kartha *et al.*, 1974). Destes autores, somente Maria (1987) visou estabelecer um sistema de tuberização de mandioca *in vitro*.

Os principais estudos do processo de tuberização realizaram-se, na sua maioria, com a batata (Akita e Takayama, 1994; Garner e Blake, 1989; Mingo Castel, Young e Smith, 1976; Palmer e Smith, 1970). O envolvimento dos reguladores de crescimento na tuberização *in vitro* foi demonstrado pela primeira vez em batata, por Palmer e Smith (1970), quando consideraram a cinetina o melhor composto citocinínico indutor da tuberização. A adição da cinetina reverteu o efeito de temperaturas inibidoras (15°C/20°C); já em temperaturas elevadas (35°C), esse efeito indutor foi anulado totalmente. Mauk e Langille (1978) observaram que as condições de temperatura não indutoras (30°C/28°C) anularam-se pela suplementação com 0,3 e 3,0 ppm zeatina ribosídeo, aumentando em 39-75% a tuberização de batatas em relação ao controle *in vitro*.

Parrot (1973), omitindo ou diluindo alguns macronutrientes do meio de White, observou que alguns minerais inibiam a tuberização da batata, verificando que a presença de ANA iniciou a tuberização nas diferentes diluições de minerais, e que havia um antagonismo entre o crescimento das raízes em relação a tuberização. Cid, Illg e Piedrabuena (1994) observaram o efeito estimulatório do AIB na formação dos bulbos de alho *in vitro*. Na tuberização *in vitro* do cará, Jean e Cappadocia (1992) observaram que o ANA induziu a tuberização e aumentou o peso dos microtubérculos, enquanto que o BAP diminuiu a sobrevivência dos explantes. Alhassan (1993) confirmou a ação inibitória do BAP em cará, porém, observou que na presença de cinetina houve aumento no número de microtubérculos. Já Mantel e Hugo (1989), utilizando diferentes variedades de cará, constataram que a presença de íons amônicos inibiram sua tuberização.

O etileno pode apresentar ação indutora (Garcia-Torres e Gomez-Campo, 1973) ou inibidora na tuberização *in vitro* da batata (Palmer e Barker, 1973). Outros compostos indutores da tuberização, como CO₂ (Mingo-Castel, Smith e Kumamoto, 1976) e cinetina (Palmer e Barker, 1973), não conseguiram reverter a ação inibidora do etileno na tuberização da batata *in vitro*.

As giberilinas são, provavelmente, o único grupo de reguladores de crescimento, no qual há um consenso do seu papel como inibidor da tuberização da batata *in vitro* (Bourque, Miller e Park, 1987; Hannapel, Miller e Park, 1985; Hussey e Stacey, 1984), exceto para o trabalho realizado por Garcia-Torres e Gomez-Campo (1973). Agarwal, Kumar e Alka (1983) observaram que o AG reverteu o início da tuberização, induzida por BAP em batatas *in vitro*.

O ABA pode atuar como indutor na tuberização da batata (Agarwal, Kumar e Alka, 1983) e do lírio (Kim, Davelaar e Klerk, 1994) ou como inibidor, no cará (Alhassan, 1993) e na batata (Wareing e Jennings, 1980).

O ácido jasmônico (AJ) foi sugerido como o responsável pelo processo de tuberização em plantas, devido a presença de vários compostos análogos encontrados em folhas de batata e inhame, durante a tuberização no campo (Koda *et al.*, 1991; Koda e Kikuda, 1991; Koda e Okazawa, 1988). *In vitro*, o AJ induziu a tuberização da batata em concentrações 20 vezes menores que as de cinetina (Pelacho e Mingo-Castel, 1991). Takahashi *et al.* (1994) observaram o engrossamento de discos de batata em meio de cultura na ausência de sacarose e na presença do AJ, observando-se, inicialmente, uma expansão celular em discos de tubérculos e, posteriormente, maior aumento devido às divisões celulares, não ocorrendo o mesmo na presença de BAP e ABA. Por outro lado, as poliaminas que possuem papel na divisão celular, não observou-se ação das mesmas ou de seus inibidores na tuberização da batata (Laberche *et al.*, 1994).

Vreugdenhil *et al.* (1994) observaram a ação do retardante de crescimento “Tetcyclacis” (TET) *in vitro*. Este, quando associado com o BAP, induziu a tuberização da batata. Com o ‘TET’ obtiveram a tuberização em linhagens de batata que, sob condições normais ou somente na presença de BAP, não tuberizaram. Os autores sugeriram que a ação do TET estaria diminuindo o conteúdo endógeno inibidor de giberilinas para essas linhagens.

Com relação aos fatores abióticos, o fotoperíodo não demonstrou ser um fator essencial no processo de tuberização da batata *in vitro*, como é sugerido para plantas em condições de campo (Reifschneider, 1987; Baijal *et al.*, 1983; Gregory, 1956). Dependendo do genótipo, a produção de tubérculos *in vitro* é melhor sob fotoperíodos longos (Slimmon, Machado e Conffin 1989), curtos (Pelacho e Mingo-Castel, 1991) ou na ausência de luz (Charles, Rossignol e Rossignol, 1993).

A sacarose atua na tuberização da batata como fonte de carbono, e não devido à sua ação osmótica (Mei Lo, Irvini e Barker, 1970). Nos estudos de tuberização da batata *in vitro*, a concentração estimulatória do processo de tuberização está entre 6-8%, concentrações nas quais observaram respostas mais uniformes e efetivas (Charles, Rossignol e Rossignol, 1993; Palmer e Smith, 1970). Palmer e Smith (1970) relataram a não formação de tubérculos na ausência de sacarose. Também foi observado em batata que, dependendo da composição do meio de cultura, a sacarose pode suprir a necessidade de citocininas para indução da tuberização (Lanvielle e Sangwan, 1994; Teixeira e Pinto, 1991). Garner e Blake (1989) obtiveram a tuberização de batatas sem a presença de reguladores de crescimento, somente com o aumento de nitrogênio no meio de cultura, porém após 17 semanas e com redução no número de tubérculos. Estes resultados foram confirmados por Charles Rossignol e Rossignol (1993), que obtiveram a tuberização da batata após 11 semanas, em fotoperíodos com ciclos curtos.

Até o momento, não foi detectado qualquer gene específico responsável pelo processo de tuberização (Visser *et al.*, 1994; Jackson, Sonnewald e Willmitzer, 1993). Três genes codificadores de enzimas envolvidas na síntese do amido: BE, GBSS e ADPG-Pi, foram identificados e clonados (Muller -Rober, Sonnewald e Willmitzer, 1992; Salehuzzaman *et al.*, 1993; Visser *et al.*, 1989). Carvalho *et al.* (1993) observaram mudanças quantitativas do conteúdo das enzimas envolvidas na síntese do amido (ADPG-Pi e BE) em raízes de mandioca, em diferentes estágios da tuberização. Por outro lado, observou-se que, em plantas transgênicas de batata contendo o antisense da ADPG-Pi (subunidade B), houve diminuição na concentração de amido e aumento na de sacarose e de glicose nos tubérculos (Müller-Rober, Sonnewald e Willmitzer, 1992). Já na mandioca, Salehuzzaman *et al.* (1993) isolaram três genes envolvidos na síntese do amido das raízes tuberosas (BE, GBSS, ADPG-Pi) e, devido à falta de um protocolo de transformação em mandioca, obtiveram plantas transgênicas de batata com o antisense da GBSS, onde foi observada a inibição parcial deste gene com consequente redução do conteúdo de amido (Salehuzzaman, Jacobsen e Visser, 1994). De posse de um protocolo de transformação, a obtenção de plantas de mandioca com variação no conteúdo de amido, proteína e outras características, será de grande importância (Salehuzzaman, Jacobsen e Visser, 1993; Shewry *et al.*, 1993).

As proteínas mais estudadas no processo de tuberização são a patatina, na batata e a esporamina, na batata-doce, estando estas proteínas presentes em elevadas concentrações, nos seus respectivos órgãos tuberosos (Hattori, Matsuoka e Nakamura, 1988; Maeshima, Sasaki e Asahi, 1985; Park *et al.*, 1983; Racusen e Foote, 1980). Ambas são induzidas pela sacarose, acumulando-se em órgãos onde geralmente não ocorrem ou ocorrem em baixas concentrações (Hattori *et al.*, 1991; Hattori, Nakagawa e Nakamura, 1990; Rocha-Sosa *et al.*, 1989; Wenzler *et al.*, 1989). Não foram detectadas mudanças nos níveis de patatina em estágios iniciais da

formação do tubérculo, quando já haviam variações no conteúdo de açúcares e amido (Ross *et al.*, 1994). Estes resultados sugerem que a patatina pode ser usada como um marcador do processo de desenvolvimento da tuberização da batata (Staswick, 1994; Prat *et al.*, 1990; Rosahl, Schell e Willmitzer, 1987), mas não como um marcador do processo de diferenciação morfológica dos tecidos de reserva da tuberização da batata, como sugerido por Paiva, Lister e Park (1983).

O primeiro trabalho sugerindo a formação de raízes tuberosas de mandioca *in vitro*, foi realizado por Kartha *et al.* (1974), que a partir da adição de 0,5 μM BA + 1,0 μM ANA no meio de cultura de MS levaram à formação dessas estruturas. As mesmas estruturas foram obtidas por Cabral *et al.* (1993) com 1,6 μM ANA e 0,4 μM BAP. Entretanto, os dois trabalhos anteriores descreveram somente a obtenção de estruturas morfológicamente semelhantes à raízes tuberosas de mandioca. Maria (1987) observou em plantas de mandioca tratadas com 0,1 μM BAP + 1,0 μM ANA, o espessamento das raízes com depósito de amido, porém, sem crescimento secundário, ao passo que, nas plantas controle (não induzidas), em meio com 6-9% sacarose, não ocorreu espessamento da raiz, observando-se a ocorrência de grãos de amido na ausência de crescimento secundário. No mesmo trabalho com raízes excisadas, Maria (1987) observou em raízes espessadas, induzidas com 4,8 μM BAP, formação do felogênio, havendo neste corte, depósito de grãos de amido, porém com atividade cambial ausente. Recentemente, Konan, Sangwan e Sangwan-Norreel (1994) descreveram a obtenção das mesmas estruturas obtidas por Cabral *et al.* (1993) e Kartha *et al.* (1974).

Embora o estudo da tuberização *in vitro* da mandioca seja um tema recorrente, a natureza dos órgãos obtidos até o momento não é clara. Em uma análise mais detalhada, observou-se que nos trabalhos anteriores (Konan Sangwan e Sangwan-Norreel, 1994; Cabral *et al.*, 1993; Kartha *et al.*, 1974) a obtenção de raízes tuberiformes de mandioca *in vitro*, foi um

resultado indireto, já que, em todos os trabalhos, os autores procuravam estabelecer metodologia para a regeneração, propagação ou conservação *in vitro*. Exceto para os trabalhos de Maria (1987), que visaram estabelecer um sistema de tuberização da mandioca *in vitro*.

Desta forma, o objetivo deste trabalho consistiu em desenvolver um sistema de tuberização *in vitro* para a mandioca, procurando estudar o efeito do fotoperíodo, da sacarose, da presença do carvão ativado, de alguns reguladores de crescimento e posteriormente, comparar a anatomia das raízes tuberiformes obtidas *in vitro* com raízes tuberosas do campo.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

A metodologia *in vitro* foi desenvolvida em duas etapas. A primeira, no Departamento de Biologia/UFLA, onde foi estudado o efeito do fotoperíodo, associado a diferentes concentrações de sacarose na tuberização. Nesta primeira etapa, utilizou-se plantas de mandioca das cvs. IAC 12829 e Pioneira, as quais foram mantidas em salas de crescimento com temperatura de 31 ± 2 °C, UR 80-90% e radiação fotossinteticamente ativa (RAF) de 100-150 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$. A segunda etapa desenvolveu-se na Área de Biologia Celular (ABC)/CENARGEN, onde foram realizadas as aplicações com soluções de reguladores de crescimento e uso de diferentes concentrações de sacarose, na presença de carvão ativado. Para esta etapa, utilizou-se plantas de mandioca, cv. MColl 22, que foram mantidas em câmara de crescimento a 27 ± 2 °C, com fotoperíodo de 16 horas, UR de 70-80% e radiação fotossinteticamente ativa de 30-40 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$. Os cortes anatômicos e a análise das raízes tuberosas e tuberiformes obtidas *in vitro*, realizaram-se no Laboratório de Anatomia Vegetal (UnB).

p/v phytigel. A autoclavagem dos meios de cultura foi à 120 ° C durante, 20 minutos. Utilizou-se explantes com 2-4 gemas, com aproximadamente 1,0 cm de comprimento. Todos os experimentos realizaram-se em tubos de ensaio contendo 15 mL de meio de cultura, com uma planta/tubo. Em todos os tratamentos avaliou-se a ocorrência da formação de raízes tuberosas.

3.2.1 Ação dos fotoperíodos associados a diferentes concentrações de sacarose

Plantas das cvs. Pioneira e IAC 12829 foram cultivadas em todas as combinações de 4 concentrações de sacarose (0, 3, 6 e 9% p/v) e 5 fotoperíodos (0, 8, 12, 16 e 24 horas de luz).

Os tratamentos foram aplicados em parcelas experimentais, constituídas por 1 planta com 8 repetições. O delineamento foi inteiramente casualizado.

3.2.2 Aplicação de reguladores de crescimento

Utilizou-se plantas de mandioca, cv. MColl 22, cultivadas em meio de cultura de MS, com 3% p/v de sacarose. As aplicações das soluções hormonais realizaram-se entre 10-15 dias após o subcultivo das plantas. No momento da aplicação das soluções hormonais (descritas posteriormente), as plantas apresentavam de 1-6 raízes, 2-4 folhas na parte aérea e altura entre 1-4 cm. As soluções indutoras foram preparadas em meio líquido de MS e aplicadas sobre o meio de cultura, no volume total de 1,0 mL/tubo. Como controle, fez-se a aplicação de 1,0 mL do meio de cultura de MS/tubo. Para evitar uma condição de anoxia, no momento da aplicação da solução hormonal, solidificou-se o meio de cultura em uma inclinação de, aproximadamente, 45°.

Soluções indutoras (μM) utilizadas nos tratamentos:

BAP (0,04; 0,4; 2,2; 4,4; 8,8 e 17,6)

BAP (0,04) + ANA (1,6)

BAP (0,4) + ANA (1,6)

ANA (0,5; 1,6 e 5,3)

Dihidrozeatina (DHZ) (0,04; 0,4; 2,2; 4,5)

DHZ (0,04) + ANA (1,6)

DHZ (0,4) + ANA (1,6)

Zeatina (0,04; 0,4; 2,2 e 4,5)

Zeatina (0,4) + ANA (1,6)

Cinetina (0,04; 0,4; 2,3 e 4,6)

Cinetina (0,4) + ANA (1,6)

Adenina (0,07; 0,7; 3,6 e 7,3)

Adenina (0,7) + ANA (1,6)

Ácido jasmônico (AJ) (0,04; 0,4; 2,3; 4,7 e 9,5)

AJ (0,4) + ANA (1,6)

As avaliações realizaram-se com 2, 5, 15, 30 e 60 dias. Foram observadas as plantas que apresentaram formação de raízes tuberosas com aspecto morfológico semelhante aos naturais (do campo). Cada tratamento foi aplicado em 15 ou 30 plantas.

Analisou-se os melhores tratamentos indutores para a formação de raízes tuberiformes *in vitro*, conforme a metodologia proposta por Grizzle, Starmeer e Koch (1969) para a análise da porcentagem de raízes tuberiformes obtidas, utilizando o SAS (1990). As observações foram transformadas para Logito (P), ($\log P/P-1$), onde P é a proporção de plantas com pelo menos uma raiz tuberiforme normal (não desuniforme) e (1-P) é seu complemento.

3.2.3 Ação do carvão ativado, associado a diferentes concentrações de sacarose

Os tratamentos avaliados neste experimento, constituíram-se das combinações de 3 concentrações de sacarose: 0, 3 e 6 % p/v, na ausência ou presença de carvão ativado (0,2% p/v), aplicados em plantas de mandioca, cv. MColl 22. Visando minimizar o efeito da luz que incide no sistema radicular da planta, colocou-se uma cobertura de papel em torno do tubo de ensaio, na altura do sistema radicular.

Distribuiu-se os tratamentos em parcelas de uma planta/tubo de ensaio, com 30 repetições por tratamento, segundo um delineamento inteiramente casualizado. Introduziu-se um tratamento adicional com sacarose 3% p/v, sem carvão ativado, com uma cobertura de papel envolvendo o tubo na altura do sistema radicular e, sobre o meio de cultura de MS (sem carvão ativado), já solidificado, aplicou-se uma camada de aproximadamente 0,5 cm de meio de cultura de MS solidificado com carvão ativado 0,2% p/v, e o seu controle (sem a cobertura de papel e sem a camada de carvão ativado). Este tratamento não integrou a análise estatística, analisando-se somente a anatomia das raízes crescidas na ausência de luz.

A avaliação realizou-se 100 dias após o subcultivo das plantas, observando-se o esverdeamento das raízes (observação visual) e altura das plantas.

3.2.4 Preparo das lâminas permanentes das raízes tuberiformes

Entre 30-50 dias após a aplicação dos reguladores de crescimento nas plantas com os tratamentos 0,4 μM BAP + 1,6 μM ANA ou 0,4 μM DHZ + 1,6 μM ANA e nas raízes das plantas controle, coletou-se amostras dos 3 tratamentos para o preparo de lâminas permanentes e análise anatômica. Escolheu-se somente raízes de plantas que apresentavam indícios morfológicos do processo natural de desenvolvimento da raiz tuberosa da mandioca. Raízes com espessamento

desuniforme, ou que não sugeriam a morfologia de uma raiz tuberosa de mandioca, não foram analisadas anatomicamente. Raízes de plantas controle (não tratadas com reguladores de crescimento) foram coletadas concomitantemente com as raízes tuberiformes induzidas. Colocou-se todas as amostras no fixador (FAA 70), por um período mínimo de 3 dias.

A metodologia usada para o preparo das lâminas permanentes (Apêndice 1 e 2), foi descrita anteriormente (item 2.2).

As raízes espessadas em meio de cultura de MS, sacarose 3%, sem carvão ativado, com a cobertura de papel em torno do tubo de ensaio na altura da raiz e com uma camada de carvão ativado 0,2% na superfície do meio de cultura, foram analisadas conforme o item 2.2.1.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Usou-se as cvs. Pioneira e IAC 12829 para o estudo da tuberização, devido a sua importância econômica (Cereda *et al.*, 1990; Lorenzi e Dias, 1993). Porém, em função dessas cultivares apresentarem um crescimento desuniforme e tardio *in vitro*, desenvolveu-se um modelo de tuberização com a cv. MColl 22, que é precoce e apresenta um crescimento mais uniforme que as outras duas cultivares.

3.3.1 Efeito dos fotoperíodos associados as diferentes concentrações de sacarose

Nenhum dos fotoperíodos testados (0, 8, 12, 16 e 24 horas) induziu o processo de tuberização *in vitro* da mandioca, tanto na cv. Pioneira quanto IAC 12829, mesmo sob diferentes concentrações de sacarose 0, 3 e 6% (observações a nível morfológico). Plantas cultivadas na

ausência de sacarose, algumas tiveram início de enraizamento e brotação, enquanto a maioria não apresentou qualquer tipo de desenvolvimento. Tanto as plantas estioladas, como os explantes subcultivados na ausência de sacarose, senesceram com aproximadamente 30 dias após o subcultivo.

Os trabalhos com fotoperíodo visando observar sua ação na tuberização da mandioca são, geralmente, realizados em condições de campo (Indira e Ramanujam, 1979; Nair e Sinha, 1968; Molingner, Orioli e Blettler, 1967) ou em sala de crescimento (Keating, Wilson e Evenson, 1985; Lowe, Mahon e Hunt, 1976). As plantas *in vitro*, no entanto, mostram um padrão de crescimento e desenvolvimento bem diferentes. Uma dessas diferenças é quanto à questão da radiação fotossinteticamente ativa, que nas condições de cultivo *in vitro* foi por volta de 30-40 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ (CENARGEN) e 100-200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ (UFLA), enquanto no campo, em um dia normal, esta radiação chega a 1000-1500 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ (UFLA). Baseando-se nestes dados pode-se sugerir que um dos fatores limitantes da tuberização *in vitro* é a radiação fotossinteticamente ativa. Trabalhos conduzidos em campo sugerem que a mandioca só realiza a fotossíntese para o crescimento e desenvolvimento de suas raízes tuberosas, com radiação fotossinteticamente ativa, maior que 5000 lux e que, abaixo disto, só realiza a respiração (Barros, 1976). *In vitro*, a radiação fotossinteticamente ativa está em torno de 1000-3000 lux (ABC/CENARGEN). Por outro lado, Maria (1987) observou que plantas de mandioca *in vitro* não formaram raízes tuberiformes em fotoperíodos longos (24 h), somente em fotoperíodos curtos (12 h), na presença de ABA, ANA com BAP, em diferentes concentrações e combinações. Assim, sugerimos que a não tuberização da mandioca *in vitro* pode decorrer de vários fatores, entre eles, a intensidade da luz.

Na tuberização do cará *in vitro*, observou-se que, mesmo variando a radiação fotossinteticamente ativa entre 12-120 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, não ocorre influência na produção e peso dos

microtubérculos (John, Courtney e Decouteau, 1993). Entretanto, o cultivo *in vitro* da batata, em fotoperíodo contínuo e com radiação fotossinteticamente ativa de $400 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ em relação a $200 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, favoreceu maior produção e maior número de tubérculos (Wheeler e Tibbitts, 1986). No caso da batata, cuja tuberização existe um maior número de estudos, tanto a radiação fotossinteticamente ativa quanto o fotoperíodo, não demonstraram ser um fator essencial do crescimento *in vitro*, contrariando os resultados de campo de Gregory (1956), já que os sistemas de tuberização *in vitro* conduziram-se tanto no escuro, como em fotoperíodos curtos e longos. Observou-se inclusive uma resposta específica para diferentes cultivares (Charles, Rossignol e Rossignol, 1993; Seabrook, Coleman e Levy, 1993; Garner e Blaker, 1989; Slimmon, Machado e Conffin, 1989). Charles, Rossignol e Rossignol (1993) sugerem ser a tuberização da batata melhor no escuro que no claro, devido ao fato de os metabólitos não serem direcionados para o crescimento e manutenção da parte aérea da planta, caso típico de plantas estioladas (Salisbury e Ross, 1992). Não obstante Garner e Blaker (1989) sugerem que o menor peso dos tubérculos *in vitro*, das batatas subcultivadas no escuro em relação às subcultivadas na presença de luz, deve-se a um precoce início da senescência das plantas submetidas ao regime sem luz.

Entre as plantas de mandioca subcultivadas na ausência de sacarose, algumas iniciaram o enraizamento e a brotação, enquanto a maioria não se desenvolveu. Estes resultados demonstram a importância da fonte de carbono no meio de cultura, para suprir a ausência ou os baixos níveis da fotossíntese das plantas *in vitro* (Pierik, 1987), como também, indicam o baixo conteúdo de metabólitos no explante, insuficientes para o desenvolvimento inicial das mesmas.

3.3.2 Resposta das plantas tratadas com reguladores de crescimento

Todo o trabalho enfatizando as induções com compostos citocinínicos, baseou-se nos resultados obtidos com a indução *in vitro* da batata (Palmer e Smith, 1969; Mingo-Castel, Young e Smith, 1976). O uso de DHZ baseou-se nos trabalhos de Melis e Van Standen (1985), que detectaram diferentes concentrações destes compostos no xilema secundário de uma raiz tuberosa de mandioca. O uso do AJ decorreu dos recentes trabalhos em que Koda e Kikuta (1991) e Pelacho e Mingo-Castel (1991a) obtiveram tubérculos de batata *in vitro*, com concentrações bem inferiores que as usadas para outros compostos citocinínicos. Além disso, sugeriu-se o AJ como o hormônio responsável pela tuberização (Koda e Okazawa, 1988). A ênfase no uso de ANA e BAP, nos tratamentos *in vitro*, baseou-se, principalmente, nos trabalhos realizados por Ribeiro *et al.* (1995) e Cabral *et al.* (1993).

As respostas das plantas aos reguladores de crescimento são apresentadas na Tabela 2. Não observou-se efeito indutor na tuberização da mandioca, nos tratamentos utilizando o AJ, a cinetina e a adenina, que também não afetaram o crescimento da parte aérea. Somente os seguintes tratamentos resultaram na formação de raízes tuberiformes de mandioca: 0,04 μM BAP + 1,6 μM ANA; 0,4 μM BAP + 1,6 μM ANA; 0,04 μM DHZ + 1,6 μM ANA; 0,4 μM DHZ + 1,6 μM ANA e 0,4 μM zeatina + 1,6 μM ANA. Observou-se o início da formação das raízes tuberiformes entre 48-72 horas após a aplicação dos tratamentos (Figura 6a). Obteve-se as melhores respostas com os tratamentos: 0,4 μM DHZ + 1,6 μM ANA (Figura 6b) e 0,4 μM BAP + 1,6 μM ANA (Figura 7). Todos os tratamentos que induziram à formação de raízes tuberiformes geraram, em sua maioria, raízes tuberiformes desuniformes (Tabela 2 e Figura 6b), enquanto alguns produziram somente raízes tuberiformes desuniformes (Tabela 2). As raízes tuberiformes desuniformes apresentaram espessamento desorganizado nas pontas ou regiões medianas das raízes (Figura 6b). A formação das raízes tuberiformes normais ocorreu com 15-30 dias após a

aplicação de alguns tratamentos (Figura 6c). Nos tratamentos que produziram raízes tuberiformes, observou-se uma redução da altura das plantas (dados não apresentados).

Diante dessas observações (Tabela 2), selecionou-se os dois melhores tratamentos para a formação de raízes tuberiformes. Os dados foram submetidos à análise estatística junto com seus homólogos, que diferiam-se somente quanto à concentração de citocinina. Os tratamentos foram: i) 0,04 μM BAP + 1,6 μM ANA; ii) 0,4 μM BAP + 1,6 μM ANA; iii) 0,04 μM e DHZ + 1,6 μM ANA; e iv) 0,4 μM ; DHZ + 1,6 μM ANA (Tabela 2). Na análise estatística avaliou-se dois parâmetros: a) efeito da melhor fonte de citocinina, DHZ ou BAP, para a indução das raízes tuberiformes; b) o efeito de duas concentrações dessas fontes de citocinina (0,4 e 0,04 μM).

Inicialmente, ajustou-se um modelo para Logito (P), considerando os efeitos principais de fonte de citocinina e suas concentrações. Os resultados desta análise não detectaram efeito significativo de fonte de citocinina ($p > 0.32$) (Apêndice 4). Em seguida, ajustou-se um modelo, considerando apenas o efeito principal de concentração de citocinina. A variação residual deste modelo reduzido foi não significativo (Apêndice 5). Isto indica que a variação observada neste experimento, quando medida na escala Logito (P), pode ser atribuída somente ao efeito de concentração de citocinina, sem levar em conta qualquer variação entre as diferentes fontes da mesma (Tabela 3 e Figura 8). O efeito da concentração 0,4 μM de citocinina (DHZ ou BAP) foi o de ampliar em até 9,3 vezes a relação de plantas com raízes tuberiformes para as plantas com raízes tuberiformes com 0,04 μM (Tabela 3).

As raízes tuberiformes desuniformes induzidas nos diversos tratamentos (Tabela 3), podem ser resultantes de um contato não homogêneo das raízes das plantas *in vitro* com os reguladores de crescimento aplicados. Em vários tratamentos, observou-se que não houve uma infiltração total das soluções de reguladores de crescimento aplicadas no meio de cultura de MS

solidificado. Outra hipótese, quanto à formação das raízes tuberiformes desuniformes, é que não houve controle da posição do explante, nas plantas doadoras, utilizadas durante os subcultivos, verificando-se que, em vários trabalhos *in vitro* com outras espécies, constatou-se que, tanto a posição de origem do explante, a idade da planta doadora e o estado fisiológico do material de propagação, influenciaram consideravelmente, o desenvolvimento das plantas (George, 1993; Cachita-Cosma, 1991; Teixeira, 1989).

De modo geral, as citocininas foram as responsáveis pelo espessamento das raízes, principalmente, quando utilizadas em associação com as auxinas (Tratamentos: 24, 35, 36 e 41; Tabela 2). Embora as diferentes fontes de citocinina tenham sido aplicadas nas mesmas concentrações (Tratamentos: 11, 24, 28, 35, 36 e 41; Tabela 2), as respostas das plantas foram bem diferenciadas, sugerindo uma ação específica da dihidrozeatina (DHZ) e da 6-benzilamino purina (BAP) que, quando associadas ao ácido naftalênico acético (ANA)(Tratamentos 24 e 36), foram os tratamentos que melhor induziram à formação de raízes tuberiformes *in vitro*.

O espessamento das raízes, pode ter decorrido da presença dos reguladores de crescimento, auxinas e citocininas, gerando um dreno nas raízes, como é sugerido por alguns autores quanto à ação fisiológica das auxinas e citocininas e outros reguladores de crescimento, combinados ou não (Salisbury e Ross, 1992; Archbold, 1988; Gifford e Evans, 1981). Algumas plantas *in vitro* morreram, em decorrência dos tratamentos com os reguladores de crescimento no meio de cultivo. Esta morte pode ter decorrido da competição, oriunda do forte dreno entre a parte aérea e o sistema radicular, pelos metabólitos do órgão de propagação. Em contrapartida, trabalhos desenvolvidos com batata *in vitro*, sugerem que a citocinina atue também, como um forte dreno (Míngo-Castel, Young e Smith, 1976; Palmer e Smith, 1969), embora direcionado na mobilização dos nutrientes presentes no sistema radicular, para a formação dos tubérculos aéreos.

TABELA 2 - Respostas das plantas de mandioca, cv. MColl 22, *in vitro*, para a formação de raízes tuberiformes, mediante aplicação das diferentes soluções de reguladores de crescimento.

	TRATAMENTO μM	RAÍZES TUBERIFORMES	RAÍZES TUBERIFORMES DESUNIFORMES	RAÍZES NORMAIS (sem espessamento)
01	Adenina 0,07	-	-	15
02	Adenina 0,7	-	-	15
03	Adenina 3,6	-	5	10
04	Adenina 7,3	-	12	3
05	Adenina 0,7 + ANA 1,6	-	10	5
06	AJ 0,04	-	-	15
07	AJ 0,4	-	-	15
08	AJ 2,3	-	-	15
09	AJ 4,7	-	-	15
10	AJ 9,5	-	-	15
11	AJ 0,4 + ANA 1,6	-	-	15
12	ANA 0,5	-	-	-
13	ANA 1,6	-	4	11
14	ANA 5,3	-	10	5
15	ANA 0,3 + Álcool 0,1	-	-	15
16	Álcool 0,1	-	-	15
17	BAP 0,04	-	-	15
18	BAP 0,4	-	7	8
19	BAP 2,2	-	8	7
20	BAP 4,4	-	15	-
21	BAP 8,8	-	15	-
22	BAP 17,6	-	15	-
23	BAP 0,04 + ANA 1,6	-	6	-
24	BAP 0,4 + ANA 1,6	11	19	9
25	Cinetina 0,04	-	-	15
26	Cinetina 0,4	-	-	15
27	Cinetina 2,3	1	7	7
28	Cinetina 0,4 + ANA 1,6	-	10	5
29	Cinetina 4,6	-	15	-
30	Controle	-	-	30
31	DHZ 0,04	-	-	15
32	DHZ 0,4	-	-	15
33	DHZ 2,2	-	-	15
34	DHZ 4,5	-	15	-
35	DHZ 0,04 + ANA 1,6	2	13	-
36	DHZ 0,4 + ANA 1,6	13	17	-
37	Zeatina 0,04	-	-	15
38	Zeatina 0,4	-	8	7
39	Zeatina 2,3	-	12	3
40	Zeatina 4,6	-	15	-
41	Zeatina 0,4 + ANA 1,6	2	9	4

FIGURA 6 - Raízes tuberiformes de mandioca, cv. MColl 22, *in vitro* induzidas com 1,6 μM ANA + 0,4 μM BAP (**C-controle e I-induzida**). **a)** Plantas com 5 dias após a indução, **b)** plantas com 30 dias após a indução. Formação de raízes tuberiformes com a morfologia muito semelhante a tubérculos do campo, **c)** plantas com 30 dias após a indução, formação desuniforme de algumas raízes tuberiformes.

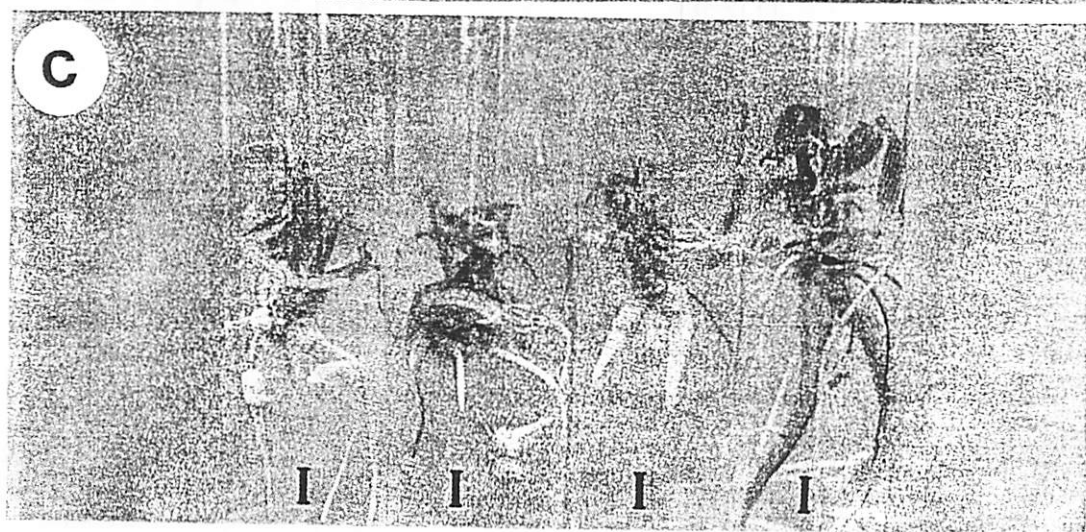
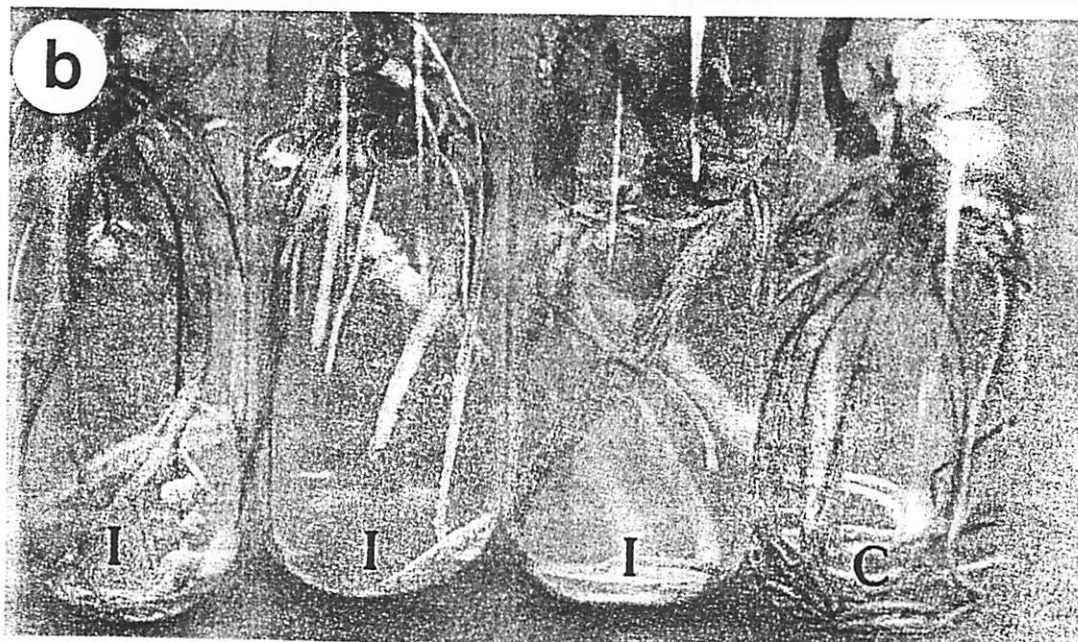
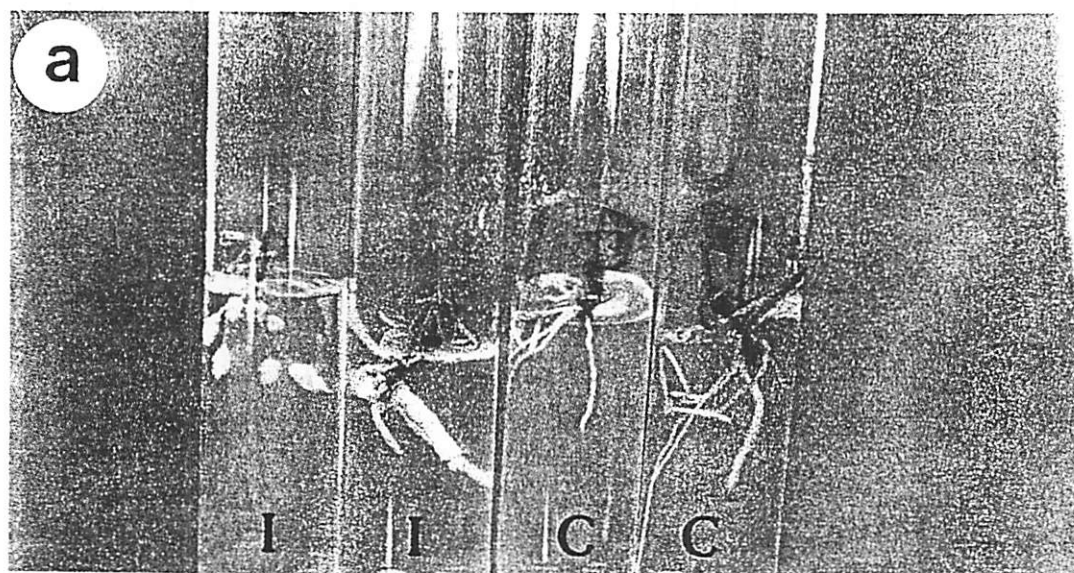


FIGURA 7 - Raízes tuberiformes de mandioca, cv. MColl 22, *in vitro*, induzidas com 0.4 μM DHZ + 1.6 μM ANA (**C-controle e I-induzidas**). **a)** Plantas 30 dias após a indução, **b)** destaque da morfologia das raízes tuberiformes induzidas.

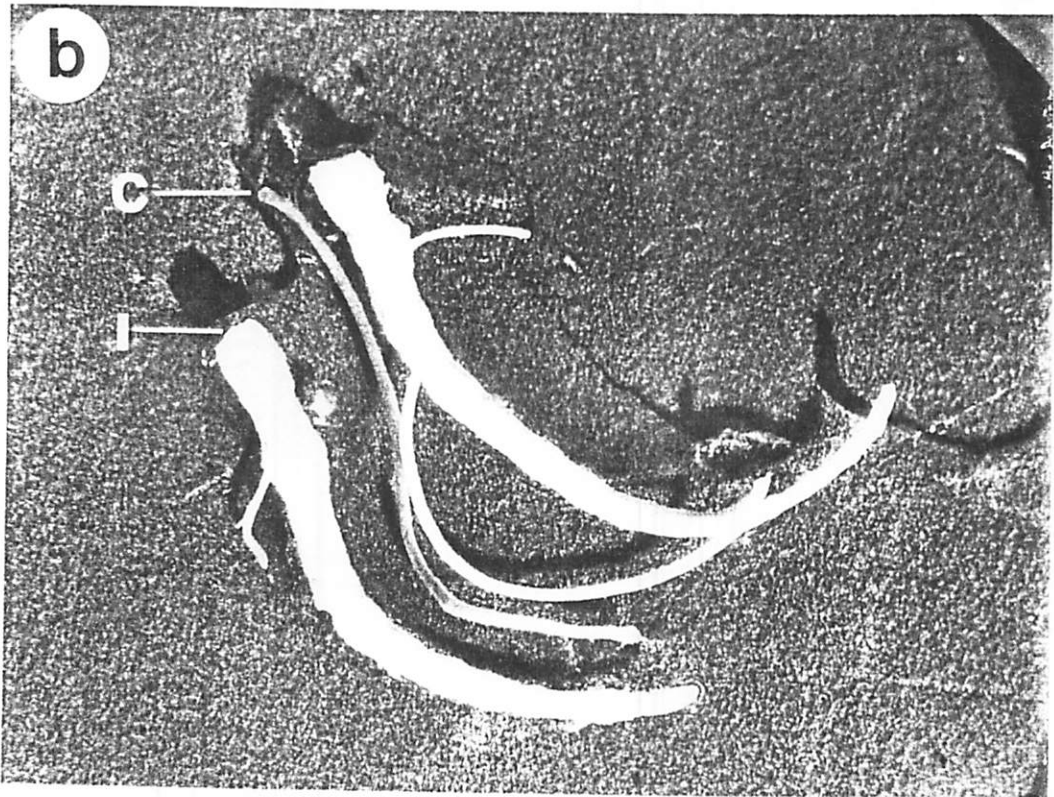
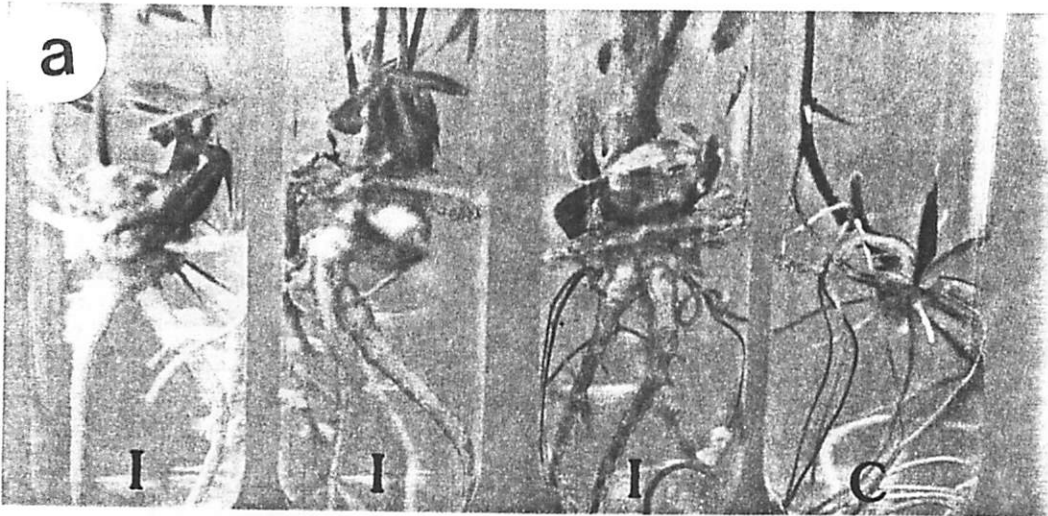
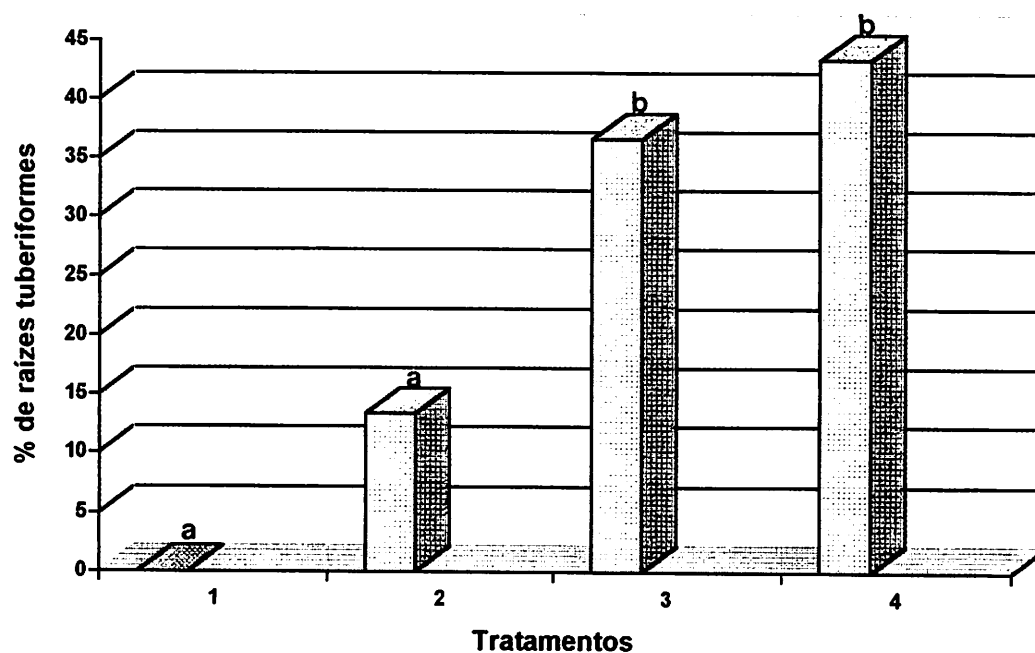


TABELA 3 - Formação de raízes tuberiformes de plantas de mandioca, cv. MColl 22, induzidas *in vitro*.

VALORES	OBSERVADO			ESPERADO		
	Raiz Tuberiforme	Erro Padrão	Logit (P)	Raiz Tuberiforme	Erro Padrão	Logit (P)
TRATAMENTOS (UM)						
BAP 0.04 + ANA 1.6	0.00	-	-	6.6 a	4.5	2.65
BAP 0.4 + ANA 1.6	36.6	8.7	0.54	40.0 b	6.3	0.41
DHZ 0.04 + ANA 1.6	13.3	8.7	1.87	6.6 a	4.5	2.65
DHZ 0.4 + ANA 1.6	43.33	9.0	0.26	40.0 b	6.3	0.41

FIGURA 8 - Porcentagem de raízes tuberiformes de mandioca, cv. Mcoll 22, *in vitro*, obtidas com as duas melhores fontes de citocinina, testadas em diferentes concentrações.



1) 0.04 BAP + 1.6 ANA

2) 0.04 DHZ + 1.6 ANA

3) 0.4 BAP + 1.6 ANA

4) 0.4 DHZ + 1.6 ANA

3.3.3 Efeito da sacarose e do carvão ativado na altura das plantas

Com relação à avaliação da altura das plantas, estas foram classificadas segundo uma escala ordinal: A) 0,0-2,0; B) 2,0-4,0; C) 4,0-6,0 e D) 6,0-8,0 cm, utilizando-se o ponto médio desses intervalos para as análises estatísticas (Tabela 4). A altura das plantas, em função da concentração de sacarose e presença do carvão ativado no meio de cultura de MS, foi analisada de acordo com a metodologia proposta por Grizzle, Starmer e Koch (1969) para análise de dados categóricos (análise por classes), utilizando o SAS (1990).

Houve um efeito significativo das diferentes concentrações de sacarose e da presença ou não do carvão ativado no meio de cultura de MS, no crescimento de plantas de mandioca, cv. MColl 22, conforme indicado pela análise de variância (Apêndice 6). Plantas crescidas em meio de cultura de MS com sacarose 3% apresentaram maior altura que as crescidas em meio de cultura com sacarose 6%. No entanto a presença de carvão ativado inibiu o crescimento das plantas, independentemente da concentração de sacarose (Figura 9 e Tabela 5).

TABELA 4: Avaliação da influência da sacarose e do carvão ativado (CA) no crescimento *in vitro* de plantas de mandioca, cv. Mcoll 22.

Classes para altura (cm)	Intervalos das classes (cm)	Valor médio dos tratamentos	Tratamentos <i>in vitro</i>	Número de plantas por classe			
				A	B	C	D
A	0.0 -2.0	1.0	3% sacarose	0	0	2	28
B	2.0 -4.0	3.0	3% sacarose + CA	2	5	13	10
C	4.0 -6.0	5.0	6% sacarose	2	10	15	5
D	6.0 -8.0	7.0	6% sacarose + CA	7	16	2	0

TABELA 5 - Valores médios observados e esperados para as análises das plantas de mandioca, cv. MColl 22, *in vitro*, cultivadas em meio de cultura de MS, com diferentes concentrações de sacarose, na presença e ausência de carvão ativado (CA).

VALORES TRATAMENTOS	OBSERVADO		ESPERADO	
	Altura (cm)	Erro Padrão	Altura (cm)	Erro Padrão
3% sacarose	6.9	0.1	6.9 a	0.1
3% sacarose + CA	5.1	0.3	4.9 b	0.2
6% sacarose	4.5	0.3	4.2 c	0.2
6% sacarose + CA	2.1	0.2	2.2 d	0.2

O modelo utilizado para calcular a altura média das plantas observadas neste experimento (Tabela 5), considerando os efeitos de sacarose e carvão ativado, teve uma variação residual não significativa pelo teste de qui-quadrado (Apêndice 6). Isto indica que a variação observada na altura das plantas pode ser atribuída aos efeitos principais da concentração de sacarose e da presença de carvão ativado (Figura 9). Não observou-se um efeito interativo ou sinérgico, que demonstrasse que o efeito da concentração de sacarose sobre a altura das plantas tenha sido menor na presença do carvão ativado (Apêndice 6).

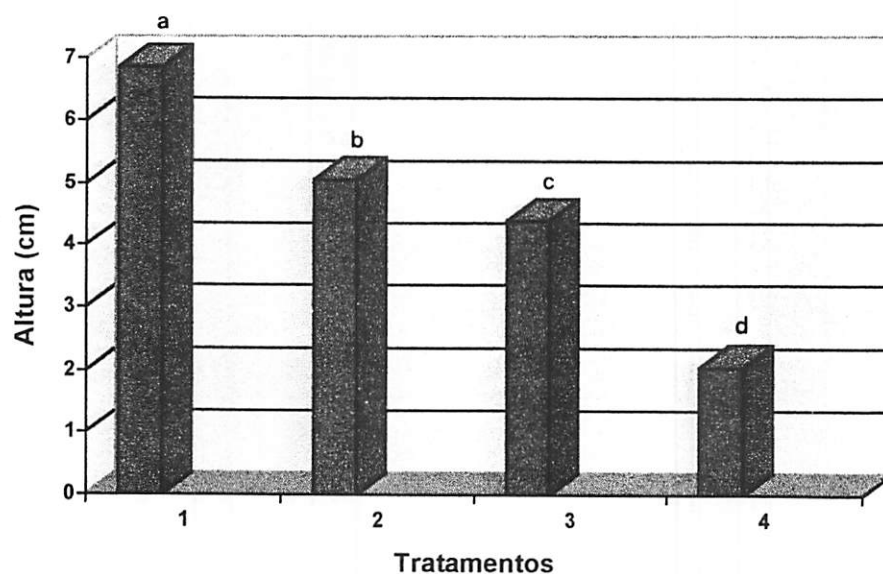
Conforme os valores preditos pelo modelo ajustado, as plantas crescidas em meio de cultura com sacarose 3%, tiveram altura superior de $2,6 \text{ cm} \pm (0,2)$ em relação às plantas crescidas em meio de cultura com sacarose 6% (Tabela 5). Plantas em meio sem sacarose não apresentaram crescimento nem enraizamento, por isso não foram consideradas na análise da Tabela 5.

Roca, Reyes e Beltran (1984) e Eskes *et al.* (1974) observaram que elevadas concentrações de sacarose inibiram o crescimento da parte aérea e o sistema radicular de plantas de mandioca *in vitro*. Estes autores sugerem que este dano ocorreu devido a um estresse osmótico e não necessariamente, a um fator limitante causado pela sacarose. As melhores concentrações de sacarose para o cultivo *in vitro* estão entre 2-3% (Eskes *et al.*, 1974). A ação de elevadas concentrações de sacarose, provocando estresse osmótico ou outra injúria qualquer no crescimento das plantas cultivadas *in vitro*, foi demonstrada por outros autores, para outras

culturas (Cheng, Peterson e Mitchel, 1992; Pierik, 1987). Já para a indução da embriogênese somática, onde geralmente são utilizadas elevadas concentrações de sacarose, é sugerido que um estresse osmótico seria uma condição propícia para o início do desenvolvimento dos embriões (Brespalhok Filho, Hashimoto e Vieira, 1993; Raemakers, Jacobsen e Visser, 1993; Finer, 1987). Outro provável efeito da inibição do crescimento das plantas de mandioca em sacarose 6% seria uma possível acidificação do meio de cultura após a autoclavagem (Owen, Wengerd e Miller, 1991), podendo esta diminuição do pH ser devido à hidrólise da sacarose, acidificando o meio, devido à frutose liberada (Druart e Wulf, 1993).

O efeito da presença de carvão ativado, segundo o modelo ajustado, foi o de reduzir em 2,0 cm ($\pm 0,2$) a altura média das plantas (Tabela 5), além de inibir o crescimento do sistema radicular (dados não apresentados).

Figura 9 - Influência da concentração de sacarose e do carvão ativado (CA) 0,17% na altura de plantas de mandioca, cv. MColl, *in vitro*



1) 3% sacarose

2) 3% sacarose + CA

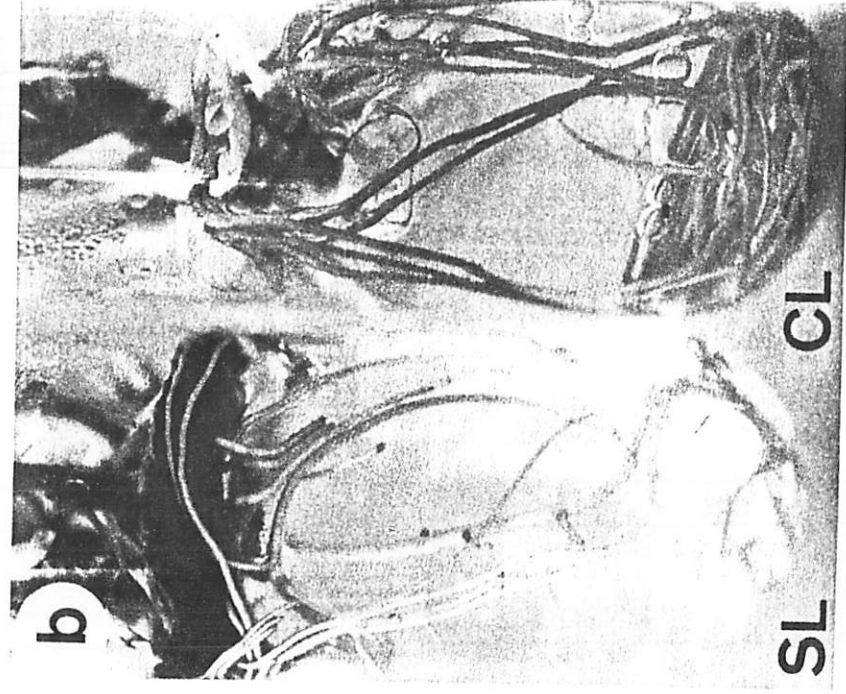
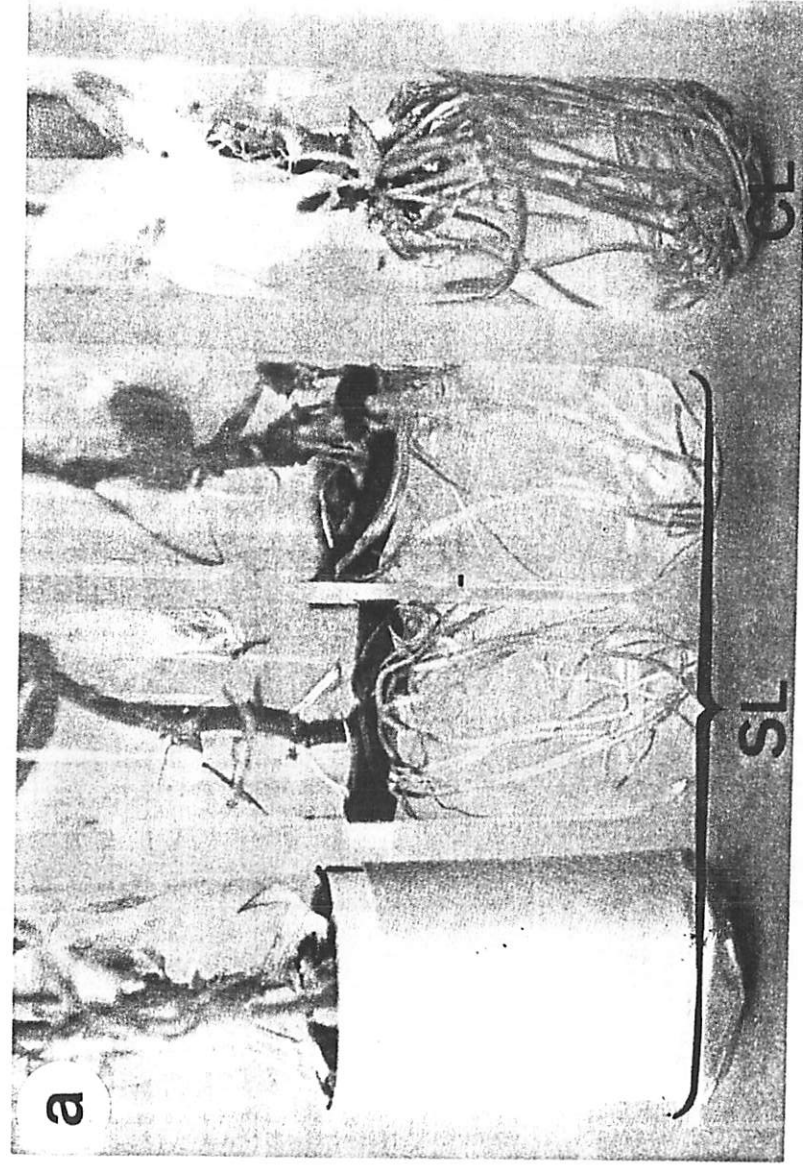
3) 6% sacarose

4) 6% sacarose + CA

Plantas crescidas em meio de cultura de MS, contendo carvão ativado e cobertura de papel em torno do tubo de ensaio, na altura do sistema radicular, não inibiram a síntese de clorofila no sistema radicular, o que sugere a passagem de luz pela parte superior do tubo de ensaio (dados não apresentados). Para testar esta hipótese, utilizou-se uma camada de aproximadamente 0,5 cm de carvão ativado, à 0,2% na parte superior do meio de cultura de MS, sem carvão ativado e com cobertura de papel em torno do tubo de ensaio, na altura do sistema radicular (Figura 10a), impedindo a passagem de luz e, conseqüentemente, a síntese de clorofila. Estas raízes apresentaram coloração branca (Figura 10b), pouco desenvolvimento, e em alguns casos, formação de raízes mais espessas. Estas raízes foram analisadas anatomicamente (3.3.3). Nestas condições, as plantas tiveram crescimento da parte aérea semelhante às plantas que não continham a referida cobertura e tampouco a camada do meio de cultura de MS com carvão ativado 0,2%. Portanto, diante desses dados, pode-se constatar que o carvão ativado, presente em todo meio de cultura, é o responsável pela inibição do crescimento da parte aérea (Figura 9).

De modo geral, o carvão ativado pode apresentar ação inibidora ou indutora, em diferentes processos da cultura *in vitro* (Herman, 1991; Magara, 1982; Drew, 1979). Sua principal função é a absorção de substâncias inibidoras, liberadas pelo meio de cultura ou pelo explante, durante o crescimento, especialmente compostos fenólicos (Fridborg *et al.*, 1978; Weatherhead, Burdon e Henshaw, 1978). Roca, Reyes e Beltran (1984) também observaram uma redução no crescimento de plantas de mandioca *in vitro*, na presença de carvão ativado, sugerindo uma competição do carvão ativado com os sais do meio de cultura, não deixando os sais disponíveis para serem absorvidos pelas raízes das plantas. Outra hipótese quanto ao papel inibidor do carvão ativado seria uma diminuição no pH, após a autoclavagem do meio de cultura (Owen, Wengerd e Miller, 1991).

FIGURA 10 - Efeito da luz no desenvolvimento das raízes de plantas de mandioca, cv.MColl 22, *in vitro*. (CL - com luz; SL - sem luz). **a)** Plantas em meio de cultura de MS com uma camada do mesmo meio contendo carvão ativado à 1,0% e com cobertura de papel em torno do tubo de ensaio na altura do sistema radicular (SL), e plantas com o sistema radicular exposto à luz (CL), **b)** raízes crescidas no escuro (SL) e com luz (CL), destaque para a síntese de clorofila e maior volume das raízes na presença de luz (CL).



Houve maior desenvolvimento das raízes nas condições em que a luz tinha incidência direta nas mesmas (Figura 10b), o que pode ocorrer em função da ausência de luz no desenvolvimento do sistema radicular, ou devido à inibição na emissão das raízes, provocada pelo próprio carvão ativado, que está em contato com o colo da planta (Figura 10b).

3.3.4 Análise anatômica das raízes tuberiformes

As análises das raízes que não apresentaram espessamento, mostraram a presença do protoxilema tetrarco e pentarco, observando-se nas raízes com menor espessura, pouca diferenciação dos elementos de vaso (Figura 11). Em outras raízes com maior espessamento, observou-se os elementos de vaso mais diferenciados, porém, sem grãos de amido nos cortes das raízes com diferentes espessuras (dados não apresentados).

Para as raízes tuberiformes induzidas com 0,4 μM BAP + 1,6 μM ANA (Figura 12) ou 0,4 μM e DHZ + 1,6 μM ANA (Figura 13), ocorreu uma elevada divisão e expansão das células do córtex e pequena diferenciação do tecido vascular em relação ao controle (Figura 11). Em ambos os tratamentos, não foi detectada a ocorrência de grãos de amido. Nas regiões periféricas do córtex de ambos os tratamentos, ocorreram vários rompimentos dessas células.

No tratamento onde as plantas cresceram em meio de cultura de MS, contendo apenas uma camada de aproximadamente 0,5 cm de meio de cultura com carvão ativado à 0,2% na superfície do meio já solidificado, além da cobertura em torno do tubo de ensaio na altura do sistema radicular (Figura 10a), observou-se uma maior diferenciação dos tecidos vasculares (Figura 14), do que nas plantas controle (Figura 11). Esta diferenciação não foi observada em plantas do campo, conforme descrito no capítulo 2 (item 2.3) ou na literatura (Maria, 1987; Lowe, Mahon e Hunt, 1982; Indira e Kurian, 1977; Duncan e Mcpherson, 1974). Registrou-se também a

presença do câmbio vascular, do felogênio e uma grande quantidade de grãos de amido no parênquima floemático, localizado entre o câmbio e o felogênio. Diante dessas evidências, pode-se constatar uma condição de tuberização da mandioca *in vitro*, ou seja, a presença de grãos de amido e o crescimento secundário, caracterizado pela presença do câmbio e do felogênio. Este padrão histológico de tuberização assemelha-se aos estágios iniciais do processo de tuberização, conforme descrito por Indira e Kurian (1977), que observaram maior proporção de floema em relação ao xilema secundário, relatando porém que, o depósito de amido se dava somente no córtex. Em seus trabalhos com mandioca *in vitro*, quanto a formação de raízes tuberiformes, Maria (1987) obteve melhores resultados com 0,1 μM BAP + 1,0 μM ANA, em meio com sacarose 6%. na anatomia dessas raízes havia divisão e expansão das células do córtex, ausência do crescimento secundário e depósito de grãos de amido somente no córtex. A presença de grãos de amido foi observada pelo autor também em raízes sem espessamento e na ausência dos reguladores de crescimento, com a concentração de sacarose 6%, no córtex. Nas plantas de mandioca crescidas em meio de cultura com sacarose 3%, não observou-se a presença de grãos de amido, quando estas foram tratadas com reguladores de crescimento e suas raízes expostas a luz, durante o desenvolvimento. Com relação à divisão e expansão das células do córtex, com rompimentos e desestruturação das células periféricas, também foram observados por Maria (1987) nas raízes tuberiformes induzidas *in vitro*.

Em raízes excisadas de plantas de mandioca *in vitro*, e cultivadas em meio de cultura de MS sacarose 8% e 4,8 μM BAP, Maria (1987) observou a presença de grãos de amido no crescimento de plantas de mandioca. Estas raízes mostraram diferenciação do cilindro central e presença do felogênio, embora apresentassem pouco espessamento. O autor sugere que a presença do felogênio e a diferenciação do cilindro central advem da presença da citocinina e da sacarose no meio de cultura. A presença de grãos de amido, em função da elevada concentração de

FIGURA 11 - Anatomia de raiz controle (não induzidas) de mandioca, cv. MColl 22, *in vitro*.

Protoxilema pentarco no centro da raiz (barra da escala = 30 μm), em destaque aspecto geral do

corte (barra de escala = 300 μm).

FIGURA 12 - Anatomia de raiz tuberiforme de mandioca, cv. MColl 22, *in vitro*, induzida com

0.4 μM BAP + 1.6 μM ANA. Pequena ativação dos vasos condutores no cilindro central, elevada

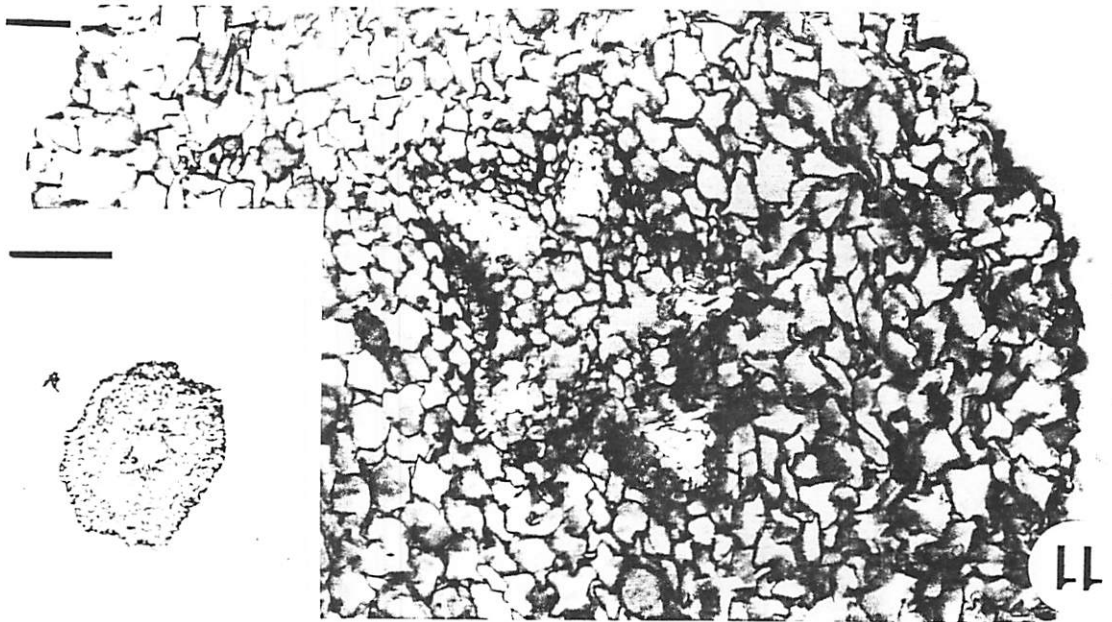
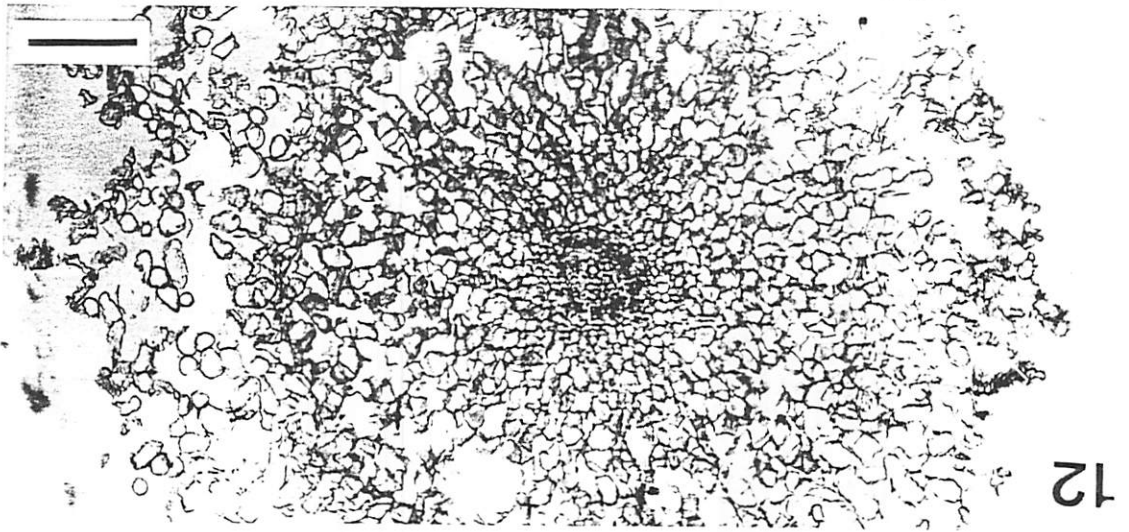
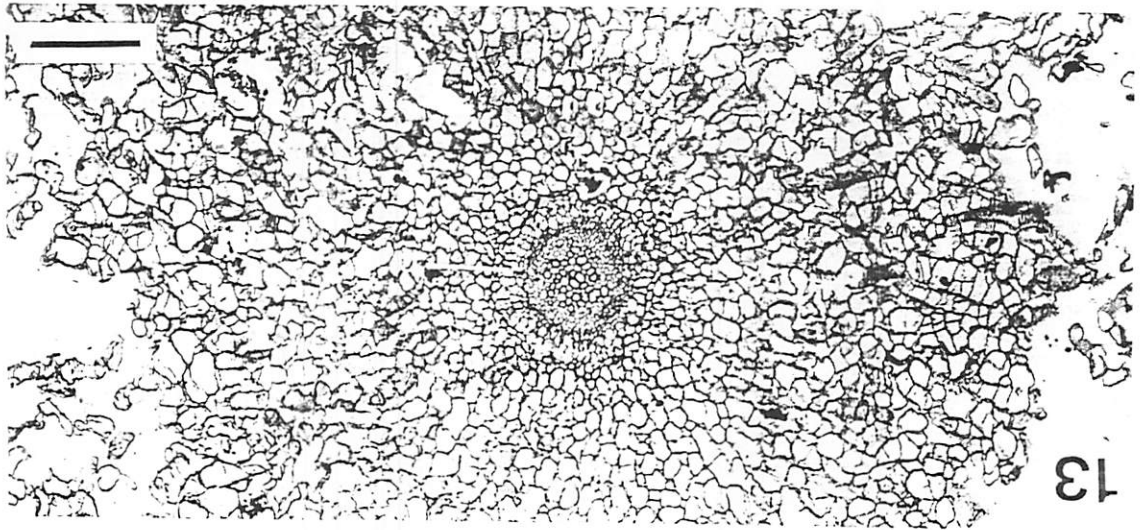
ativação do córtex, com células periféricas do córtex apresentando vários rompimentos (barra da

escala = 300 μm).

FIGURA 13 - Anatomia de raiz tuberiforme de mandioca, cv. MColl 22, *in vitro*, induzida com

0.4 μM DHZ + 1.6 μM ANA. Elevada divisão e expansão celular, desorganização dos tecidos

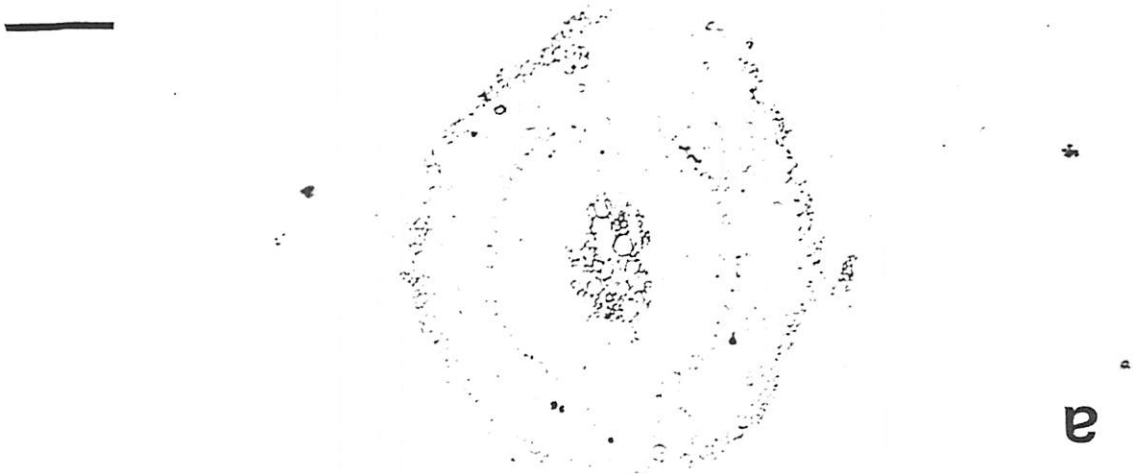
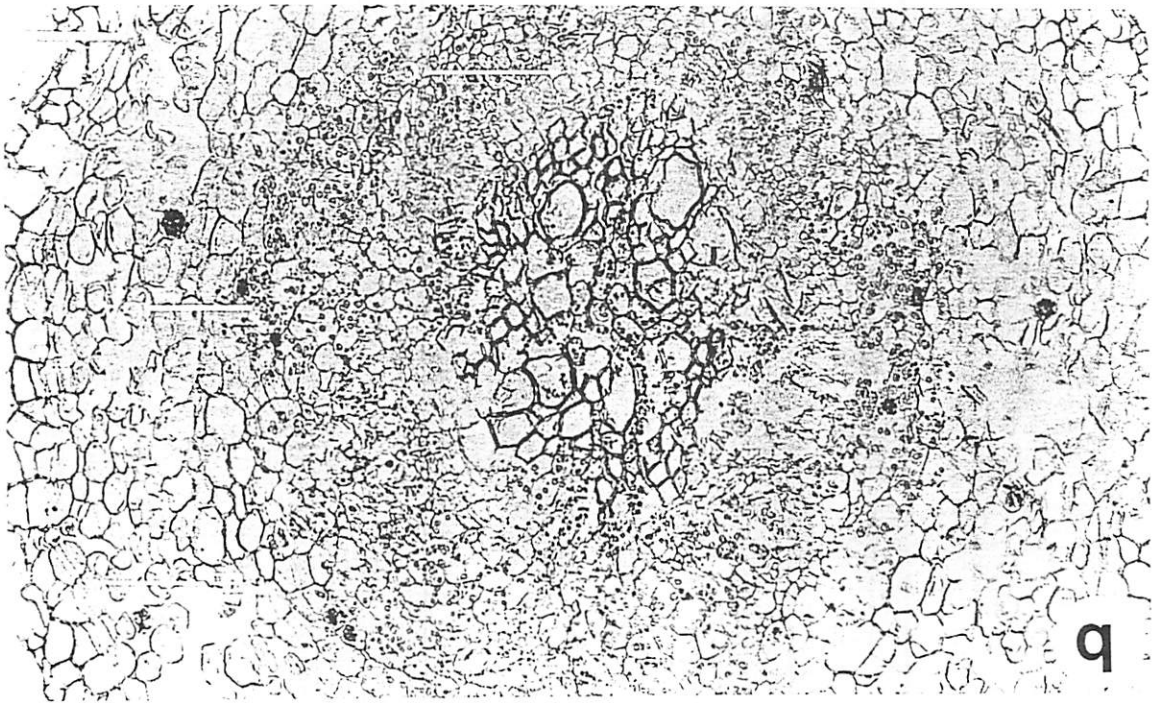
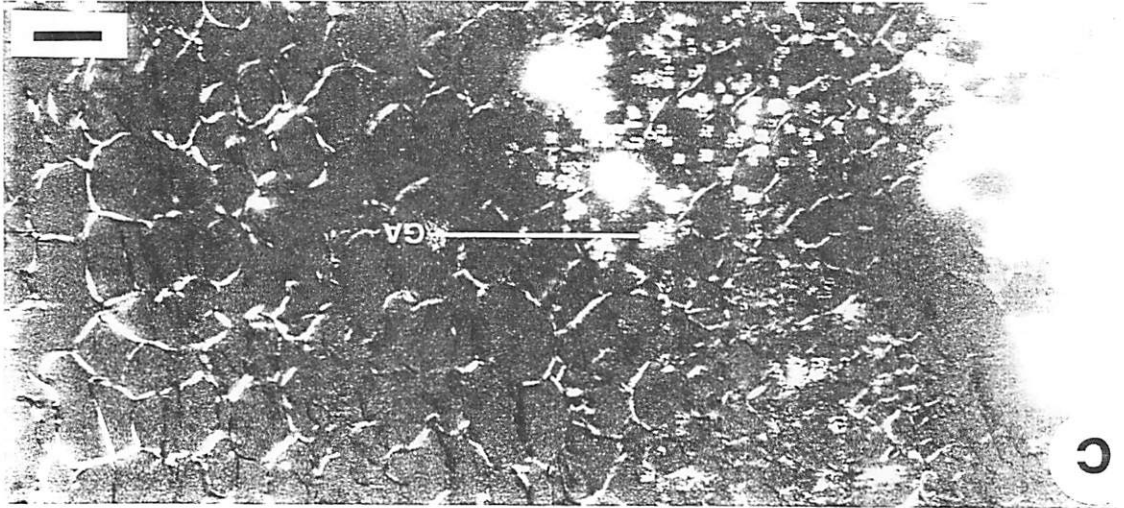
vasculares.



de sacarose no meio de cultura, também foi observada em folhas de rosa, sob elevadas concentrações de sacarose (Capellades, Lemeur e Degergh, 1991). As raízes de plantas crescidas em meio de cultura de MS com sacarose 6%, apresentarem menor altura em relação às crescidas sob concentração de 3% de sacarose (Figura 9), apresentaram ainda menor desenvolvimento e volume radicular. Estas raízes apresentaram-se mais espessas em relação às raízes das plantas crescidas em meio com sacarose 3%, podendo este espessamento ser consequência do depósito dos grãos de amido, conforme observado por Maria (1987), em plantas de mandioca em meio de cultura de MS com sacarose 6%. É importante ressaltar que a presença de grãos de amido não é o suficiente para caracterizar o processo de tuberização, já que sua presença é comum em outras partes das plantas, como reserva (Hawker, Jenner e Niemietz, 1991). Porém, conforme demonstrado na Figura 14b, o amido está depositado de forma padronizada em células que sugerem ser o floema secundário, e também presente nas células do parênquima do xilema secundário. Estes grãos de amido são menores que os das raízes oriundas do campo, com 180 dias (Figura 5b, Capítulo 2) e apresentam-se também na forma de cruz de malta.

Nas raízes tuberiformes induzidas com 0,4 μ M e DHZ + 1,6 μ M ANA, observou-se a formação da faixa cambial circundando o tecido xilemático desorganizado (Figura 13). Este câmbio pode ter se formado em função das auxinas (ANA) e citocininas (DHZ), tendo em vista que a formação e atividade do câmbio já foi descrita em função da ação destes reguladores de crescimento (Aloni, 1987; Torrey e Loomis, 1967; Loomis e Torrey, 1964). Maria (1987) não observou a formação de um câmbio em raízes tuberiformes de mandioca induzidas *in vitro* com auxinas e citocininas, porém, em raízes excisadas sem espessamento, observou atividade do câmbio em meio de cultura com 8% sacarose na presença de auxinas (ANA), com desorganização dos tecidos vasculares.

FIGURA 14 - Anatomia de raízes de mandioca cv. MColl 22, *in vitro*, com crescimento secundário na ausência de luz (Figura 10, tubos SL). **a)** Elementos de vaso com distribuição radial (barra da escala = 300 μm); **b)** grãos de amido (GA) no parênquima xilemático, atividade do felogênio (FE) e câmbio vascular (C) (barra da escala = 80 μm); **c)** Destaque para os grãos de amido (GA) em luz polarizada, em forma de cruz de malta (barra da escala = 30 μm).



Com relação à desorganização dos elementos de vaso, presença do câmbio e do felogênio, das raízes desenvolvidas no escuro (Figura 14b) observou-se que esta condição não ocorreu nas plantas controle (Figura 11), bem como nas plantas, cujo sistema radicular recebeu luz normalmente e nas plantas tratadas com reguladores de crescimento. Entretanto, estas características não foram registradas por Maria (1987) em plantas de mandioca *in vitro*, sob diferentes concentrações de sacarose e diferentes combinações de reguladores de crescimento. Este autor observou em raízes excisadas, a formação do felogênio na ausência do câmbio, sugerindo que este, originou-se devido à presença da sacarose 8% e das citocininas utilizadas em diferentes concentrações, nos tratamentos. Sendo assim, sugere-se que a ausência da luz no crescimento e desenvolvimento das raízes das plantas de mandioca *in vitro*, possui um forte efeito para a obtenção de raízes tuberosas, e que uma das prováveis características seria a ação da luz no desenvolvimento de cloroplastos, inibindo a ontogênese de amiloplastos (Thompson, 1991; Buchanan, 1980).

Este resultado é altamente relevante, tendo em vista que, até o momento, foram observados grãos de amido somente no córtex de raízes de mandioca *in vitro*, que não apresentaram crescimento secundário (Maria, 1987). Recentemente, Salehuzzaman, Jacobsen e Visser (1994), em função da falta de um sistema de tuberização controlada da mandioca *in vitro*, observaram a expressão dos genes codificadores das enzimas BE e GBSS, envolvidas na síntese do amido, em caules espessados de plantas de mandioca *in vitro*. É de se esperar que o modelo de tuberização obtido poderá ser útil para o estudo da expressão destes genes, bem como para estudar várias características metabólicas da rota do amido e outros fatores envolvidos no estudo de tuberização.

Um ponto interessante a ser estudado, referente à raiz tuberosa obtida na ausência dos reguladores de crescimento (Figura 14), é o padrão de depósito de amido que ocorre no floema

secundário. Diante desta situação, sugere-se 2 hipóteses. A primeira, teria por base o fato de que, a sacarose absorvida pelo xilema, seria transportada até a parte aérea e depois retranslocada para as raízes, via floema, com posterior depósito de amido, no parênquima do floema secundário. A segunda hipótese, teria por base o fato de que, em função da saturação ocorrida na parte aérea, devido ao estabelecimento do crescimento da planta, toda esta sacarose estaria sendo responsável pela atividade do câmbio e crescimento secundário (Maria 1987; Torrey e Loomis, 1967; Loomis e Torrey, 1964), induzindo a uma diferenciação dos tecidos vasculares e do depósito de amido no parênquima secundário do floema e, posteriormente, no xilema, conforme a Figura 14b.

As raízes tuberiformes induzidas com reguladores de crescimento, obtidas neste trabalho, possuem as mesmas características das obtidas por Maria (1987), ou seja, grande semelhança morfológica com raízes tuberosas do campo, sendo estas o resultado da ação dos reguladores de crescimento utilizados. Em trabalhos conduzidos paralelamente no CENARGEN, raízes de leucena tiveram um espessamento, quando na presença de 0,5 μM AIB (dados não apresentados). Assim, experimentos com o uso de diferentes combinações de reguladores de crescimento, utilizando diferentes espécies e posterior análise anatômica dessas raízes, poderiam sugerir uma otimização dos resultados *in vitro* obtidos até o momento. Recentemente, Figueiredo (1995) obteve estruturas semelhantes à raízes tuberosas de batata-doce *in vitro*, com semelhança morfológica muito grande com raízes tuberosas do campo, ou seja, forma cilíndrica. O autor utilizou 88 μM BAP + 48 μM ANA, não tendo realizado, no entanto, a análise anatômica dos mesmos. Estes resultados, junto aos obtidos com batata (Pelacho e Mingo-Castel, 1991a; Palmer e Smith, 1969) e com outras espécies tuberosas, fortalecem os resultados obtidos neste trabalho com mandioca e os descritos na literatura (Konan, Sangwan e Sangwan-Norreel, 1994; Cabral *et al.*, 1993; Maria, 1987; Kartha *et al.*, 1974), já que, mediante a aplicação dos reguladores de crescimento, ocorreu formação de estruturas morfológicamente muito semelhantes às raízes

tuberosas. No entanto, visando aprofundar os conhecimentos sobre o processo de tuberização, bem como os fatores que o controlam, são necessários mais estudos anatômicos das estruturas tuberosas obtidas *in vitro*, com diferentes espécies tuberosas.

3.4 CONCLUSÕES

Nenhum dos fotoperíodos testados (0, 8, 12, 16 e 24 h), associados a diferentes doses de sacarose (0, 3, 6 e 9%) induziu o processo de tuberização *in vitro* nas cvs. IAC 12829 e Pioneira.

Houve redução na altura das plantas de mandioca, cv. MColl 22, crescidas em sacarose 6%, quando comparadas às plantas crescidas em sacarose 3%.

Raízes crescidas na ausência de luz apresentaram espessamento, presença do câmbio, presença do felogênio e elevado depósito de grãos de amido no floema. Características que sugerem a obtenção de raízes tuberosas de mandioca *in vitro*. Porém, a estrutura obtida não apresentou semelhança com os cortes de raízes tuberosas do campo e da literatura.

Raízes tuberiformes das plantas de mandioca, cv. MColl 22, foram obtidas *in vitro*, mediante a aplicação de: 0,4 μM e BAP + 1,6 μM ANA e 0,4 μM e DHZ + 1,6 μM ANA. A análise anatômica dessas raízes mostrou elevada divisão e expansão celular das células do córtex, com uma pequena e desorganizada diferenciação dos elementos de vaso. Não observou-se presença de grãos de amido, nos cortes realizados.

Com base nestes resultados, sugere-se a condução de trabalhos visando à produção de raízes tuberosas de mandioca *in vitro*, enfatizando o uso dos reguladores de crescimento utilizados, bem como a otimização dos fatores exógenos e endógenos.

CAPÍTULO 4

ESTRATÉGIAS PARA A OBTENÇÃO DE RAÍZES TUBEROSAS DE MANDIOCA EM HIDROPONIA

4.1 INTRODUÇÃO

Uma das principais dificuldades para o estudo do processo de tuberização no campo é a observação gradual do desenvolvimento dos órgãos tuberosos, o que torna as avaliações geralmente destrutivas. Sendo assim, dentro de uma proposta para o estudo de diferentes parâmetros da tuberização em qualquer espécie, a hidroponia é um sistema de cultivo sob condições controladas, com grande utilidade, pois permite o estudo dos fatores endógenos e exógenos que atuam sobre a indução da tuberização, bem como o estudo de outros eventos do desenvolvimento de plantas.

Em mandioca, até o momento não foi observado o processo de tuberização em hidroponia, sem a presença de agregados, tendo sido observada, apenas a tuberização de plantas de mandioca, a partir de folhas crescidas sob condições hidropônicas na presença de areia (Duncan e McPherson, 1974). Alguns trabalhos sugerem a obtenção de raízes tuberosas de mandioca *in vitro* (Konan, Sangwan e Sangwan-Norreel, 1994; Cabral *et al.*, 1993; Maria, 1987; Kartha *et al.*, 1974), porém, sem nenhuma comprovação da obtenção do órgão tuberoso. Em trabalhos mais recentes (item 3.3.3), plantas *in vitro* de mandioca, cv. Mcoll 22, foram tratadas com reguladores

de crescimento obendo-se raízes tuberiformes morfologicamente semelhantes à raiz tuberosa da mandioca no campo, porém, sem crescimento secundário e sem o depósito de amido, apresentando somente elevada divisão e expansão das células do córtex e pequena diferenciação desorganizada dos tecidos condutores.

O uso do sistema de cultivo de plantas em hidroponia, para estudo do processo de tuberização, tem sido empregado com sucesso, principalmente, na otimização do crescimento e produção de tubérculos de batata e de raízes tuberosas de batata-doce, para as quais tem ocorrido um grande número de trabalhos visando o seu cultivo em estações espaciais (Ewing e Struik, 1992; Loretan *et al.*, 1988; Morris *et al.*, 1988).

Outras aplicações do uso do sistema de cultivo em hidroponia com espécies tuberosas, são: i) induzir a floração para cruzamentos (Ward *et al.*, 1992); ii) estudar a ação dos gases como o O₂ e CO₂ (Kratky e Bowen, 1988); iii) otimizar as condições de cultivo e produção de tubérculos de batata e raízes tuberosas de batata-doce (Grant e Lu, 1993; Mortley *et al.*, 1991; Bonsi *et al.*, 1988; Hill *et al.*, 1988); iv) servir como suporte nos estudos de controle de pragas e patógenos (Peer e Schippers, 1988; Prange, 1986;); v) estudar a relação fonte-dreno (Chu, Coleman e Mooney, 1992); vi) estudar os sintomas da toxidade e deficiência de alguns elementos (Shann e Adriano, 1988; Kuboi e Fujii, 1985; Oliveira, 1979) e vii) estudar a ação de determinados elementos e reguladores de crescimento em eventos biológicos (Chen, Chen e Lee, 1992; Lardizabal e Thompson, 1988).

Com a mandioca, os trabalhos utilizando o cultivo em hidroponia têm sido desenvolvidos principalmente com a finalidade do estudo das desordens nutricionais (Asher, Edwards e Howeler, 1980). Nos trabalhos de Duncan e McPherson (1974) estudou-se a morfologia e anatomia de raízes oriundas de folhas de mandioca em hidroponia com areia, quando observou-se o enraizamento com 45 dias e a tuberização com 90 dias.

Assim, o objetivo deste trabalho visou desenvolver uma metodologia de tuberização da mandioca em hidroponia, observando as respostas das raízes das plantas aos reguladores de crescimento aplicados na parte aérea ou diretamente na solução nutritiva, e posteriormente comparar, através de cortes histológicos, a anatomia das raízes tuberiformes com raízes tuberosas do campo, em estágios iniciais de desenvolvimento.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho desenvolvido em hidroponia foi realizado em duas etapas. A primeira foi desenvolvida no Departamento de Biologia da UFLA, quando foram ajustadas as condições do sistema de hidroponia. A segunda etapa desenvolvida nas instalações do CENARGEN/EMBRAPA, aplicou-se as soluções de reguladores de crescimento e posterior coleta, para as análises anatômicas no Laboratório de Anatomia Vegetal (UnB).

As manivas de mandioca das cvs. IAC 12829 e Pioneira, com 12 meses de idade, utilizadas no plantio dos canteiros de propagação rápida, foram fornecidas pelo CPAC/EMBRAPA.

Utilizou-se as cvs. IAC 12829 e Pioneira devido ao seu potencial econômico (Lorenzi e Dias, 1993; Cereda *et al.*, 1990).

O sistema de crescimento de estacas de mandioca sob condições hidropônicas, baseou-se nos trabalhos realizados por Oliveira (1979).

4.2.1 Canteiro de propagação rápida

Na UFLA foi utilizado um canteiro de areia, tratado anteriormente ao plantio das manivas, com 5 litros de brassicol (200 g/L), coberto com um plástico transparente, para maior

manutenção da temperatura e umidade relativa. No CENARGEN utilizou-se um canteiro, com areia autoclavada, dentro de casa de vegetação, para plantio das manivas.

Manivas das cvs. IAC e Pioneira com 12 meses de idade, 20 cm, 4 a 9 gemas, foram tratadas com 0,02 % de cloro ativo (KBoa, diluída 100x), durante 5 minutos e lavadas em seguida, sob água corrente, por 10 minutos. O plantio ocorreu dois dias após o tratamento dos canteiros.

4.2.2 Enraizamento e brotação das estacas em hidroponia

Os recipientes utilizados na hidroponia para o crescimento das plantas, foram bandejas, baldes e vasos, pintados externamente com tinta cinza, visando impedir a passagem de luz e crescimento de algas. Todo o sistema de hidroponia foi instalado em casa de vegetação, com os recipientes preenchidos com água destilada e aerados com o auxílio de compressores.

As estacas provenientes de plantas crescidas nos canteiros de propagação rápida, foram colhidas aproximadamente aos 80 dias após o plantio das manivas. O corte das plantas foi a aproximadamente a 2,0 cm da superfície do canteiro, em seguida, as mesmas foram colocadas em baldes com água. As plantas doadoras tinham aproximadamente 1,0-1,5 m de altura.

Após a colheita das plantas, procedeu-se a retirada das folhas e o corte do caule em estacas com 10-15 cm com 3-6 gemas. De cada planta obteve-se aproximadamente 3-6 estacas. O corte na parte basal, foi feito próximo à gema, deixando-se no mínimo 2 gemas para o crescimento da parte aérea.

Imergiu-se as bases das estacas em solução de 28,5 μ M AIB durante 24 horas. Após este procedimento, estas foram transferidas para o sistema de hidroponia em água destilada, para o desenvolvimento do sistema radicular e da parte aérea, durante aproximadamente 10-15 dias.

4.2.3 Indução com reguladores de crescimento

Após 10 dias de cultivo das estacas em condições hidropônicas, com suas bases imersas em água, foram observadas pequenas raízes e brotações na parte aérea. Neste momento, substituiu-se a água pela solução nutritiva de Johnson (1947) (citado por Epstein, 1972; Apêndice 7).

O pH da solução nutritiva foi mantido entre 5-6, e a troca da solução nutritiva foi semanal.

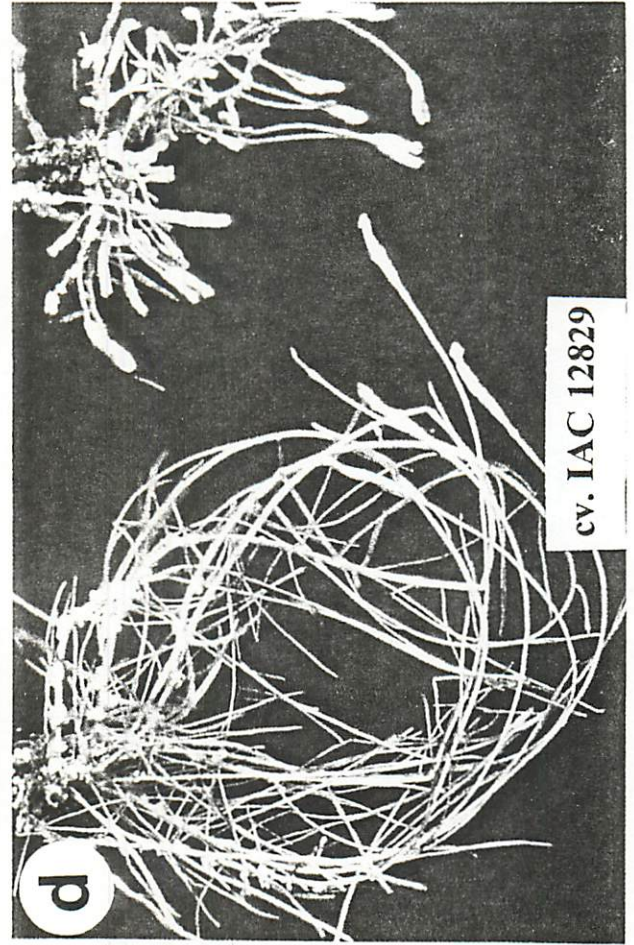
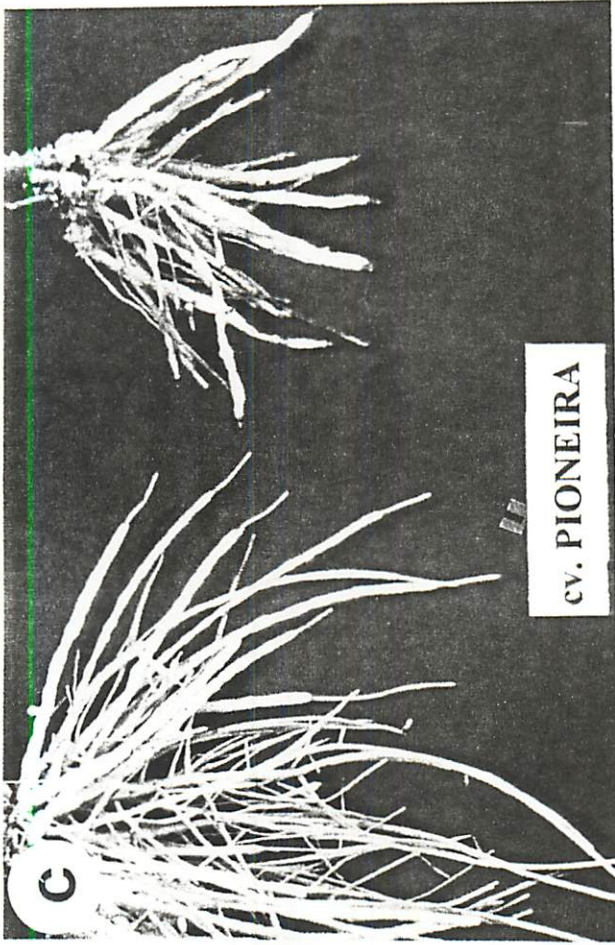
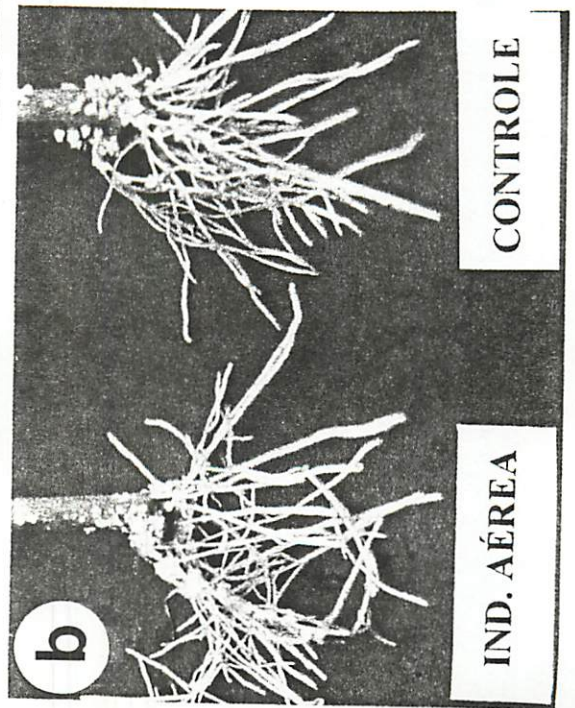
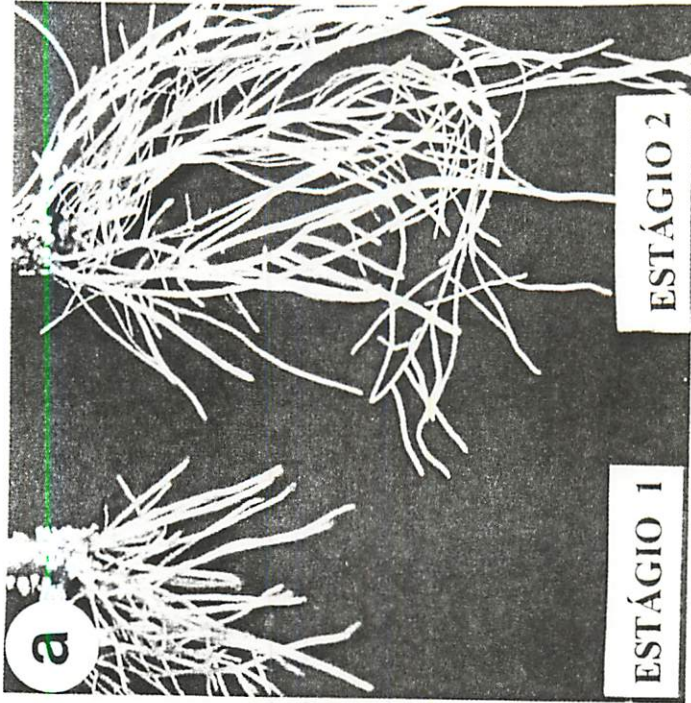
As doses das soluções indutoras com reguladores de crescimento, utilizadas na hidroponia, basearam-se em trabalhos preliminares com mandioca *in vitro* por Ribeiro *et al.* (1994) e Cabral *et al.* (1992). As soluções de reguladores de crescimento utilizadas foram, i) 1,6 μM ANA + 0,4 μM BAP e ii) 0,4 μM BAP. As cvs. utilizadas foram o IAC 12829 e Pioneira.

Este experimento comparou as respostas das raízes com diferentes estágios de desenvolvimento, em 2 cultivares, com 2 soluções. Os tratamentos avaliados neste experimento constituem um fatorial $2^4 + 2$ controles, com os seguintes fatores e níveis: i) cultivar: a) IAC 12829, e b) Pioneira; ii) soluções: a) 1,6 μM ANA + 0,4 μM BAP, e b) 0,4 μM BAP; iii) formas de aplicação: a) aplicação direta na solução nutritiva; b) aplicação na parte aérea com 4 pulverizações ao dia, durante cinco dias; e iv) estágios de crescimento: a) estágio 1 - raízes com 2-6 cm, e b) estágio 2 - raízes com 4-11 cm (Figura 15 a).

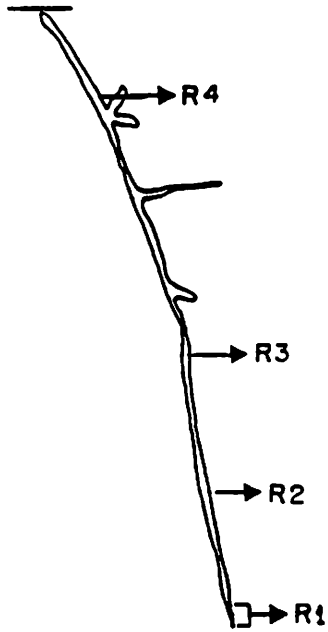
No momento da indução, as plantas apresentavam, em ambos os estágios do desenvolvimento radicular, 4-8 folhas na parte aérea e 7-15 cm de altura.

Aplicou-se as soluções em parcelas experimentais, constituídas por 1 planta/vaso com 4 repetições, para cada um dos 18 tratamentos. A distribuição dos tratamentos foi um delineamento inteiramente casualizado. Este experimento foi conduzido no CENARGEN.

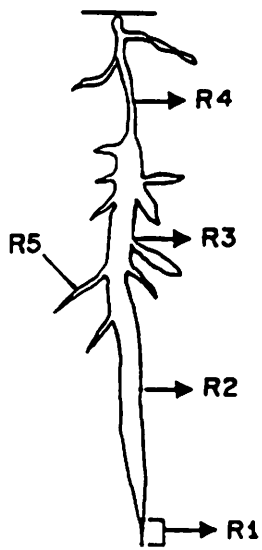
FIGURA 15 - Respostas das raízes das plantas de mandioca, cv. Pioneira, para as induções realizadas em hidroponia. **a)** Estágios de indução: estágio 1 - plantas com sistema radicular pouco desenvolvido, estágio 2 - plantas com sistema radicular mais desenvolvido; **b)** resposta das raízes das plantas à indução realizada somente na parte aérea; **c)** resposta das plantas de mandioca, cv. Pioneira, à indução realizada nos dois estágios de crescimento no sistema radicular, espessamento uniforme ao longo de toda raiz; **d)** resposta das plantas de mandioca, cv. IAC 12829, à indução realizada nos dois estágios de crescimento do sistema radicular, espessamento uniforme somente nas extremidades das raízes.



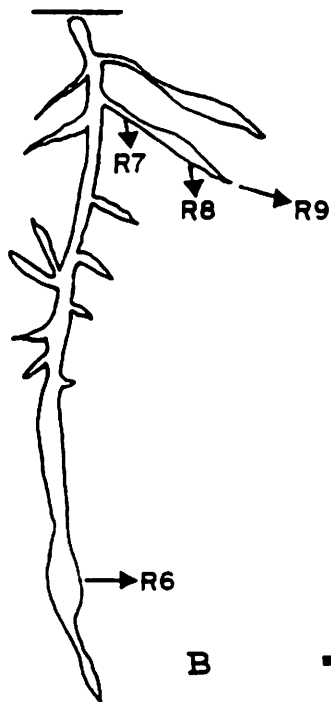
16



17



A



B

3.00 cm



4.2.4 Preparo das lâminas permanentes das raízes tuberiformes

Após 10 dias da aplicação das soluções de reguladores de crescimento, coletou-se amostras das raízes controle das plantas, ou seja, sem espessamento (Figura 16) e das raízes induzidas das plantas, ou seja, com espessamento (Figura 17), para preparação e montagem das lâminas permanentes.

As amostras das raízes foram coletadas e emblocadas conforme distâncias relativas ao ápice radicular. Para a raiz controle da cv. Pioneira coletou-se 4 amostras em diferentes regiões da raiz (Figura 16). Para as raízes das plantas da cv. Pioneira tratadas com 0,4 μM BAP, coletou-se duas raízes, selecionando-se nove regiões para serem emblocadas e analisadas (Figura 17). Já nas raízes tuberiformes induzidas com 0,4 μM BAP + 1,6 μM ANA, foram analisadas anatomicamente, somente as regiões onde havia maior espessamento, visando, principalmente, verificar a presença de crescimento secundário e acúmulo de amido.

A metodologia usada para o preparo e análise das lâminas permanentes (Apêndice 1 e 2) foi descrito anteriormente (item 2.2).

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 Brotação das manivas e crescimento das plantas nos canteiros de areia

Observou-se a brotação em aproximadamente 95% das manivas, 20 dias após o plantio das mesmas nos canteiros de areia (UFLA e CENARGEN). Após 80 dias do plantio, coletou-se estacas para enraizamento e crescimento em hidroponia.

As manivas mantidas nos canteiros rebrotaram aproximadamente após 35 dias, obtendo-se cerca de sete rebrotas por maniva, independente do número de gemas por maniva. Número

semelhante de rebrotas também foi observado em canteiros de propagação rápida no CIAT (Cock *et al.*, 1976).

Em condições hidropônicas, observou-se que estacas basais enraizaram e brotaram em tempo menor e com melhor crescimento e desenvolvimento da parte aérea e radicular do que as estacas medianas e as apicais (dados não apresentados). Estas estacas, provavelmente apresentavam-se fisiologicamente mais maduras, em relação às apicais, que se encontram mais herbáceas. As manivas para o plantio da mandioca no campo, normalmente são selecionadas seguindo este critério. É possível que estas manivas mais maduras apresentem maior concentração de reservas (Conceição, 1979; Corrêa e Rocha, 1979; Normanha, 1976) e condição indutora.

4.3.2 Respostas das plantas tratadas com reguladores de crescimento

Aplicação na parte aérea

Plantas tratadas somente na parte aérea (4 aplicações diárias durante 7 dias) com a solução 1,6 μM ANA + 0,4 μM BAP e 0,4 μM BAP, não apresentaram qualquer espessamento nas suas raízes, o mesmo acontecendo com as plantas controle (Figura 15 b). Vinte dias após a aplicação observou-se que a parte aérea destas plantas apresentava maior altura, com folhas maiores que das plantas controle (dados não apresentados).

Jackson e Willmitzer (1994) também não obtiveram respostas quando aplicaram AJ na parte aérea de plantas de batatas sob condições não indutoras, não havendo o desencadeamento do processo de tuberização. Estes autores sugeriram um papel secundário ou intermediário do AJ na tuberização, contrariando alguns trabalhos *in vitro* (Koda e Kikuta, 1991; Pelacho e Migo-Castel, 1991a; Koda e Okazawa, 1988) que consideram o AJ como o hormônio indutor do processo de tuberização. Os resultados obtidos sugerem que as citocininas, como a combinação

destas ao ANA, apresentam um papel semelhante ao AJ, ou seja, secundário ou intermediário, no processo da tuberização da mandioca, não sendo o sinal responsável pelo início do processo. Estes resultados são também sugeridos por Jameson, Mcwha e Halesmore (1985), com relação ao papel das citocininas no desencadeamento da tuberização da batata.

Aplicação diretamente na solução nutritiva

As plantas tratadas diretamente na solução nutritiva com reguladores de crescimento, com uma única aplicação das soluções 0,4 μM BAP ou 1,6 μM ANA + 0,4 μM BAP, apresentaram todas as suas raízes espessadas após 48-72h, com uma típica morfologia de raízes tuberosas (Figura 17a e 17b). A obtenção dessas raízes tuberiformes ocorreu de maneira uniforme para cada cultivar e o desenvolvimento dessas tuberosidades em hidroponia mostrou-se mais uniforme que o desenvolvido *in vitro* (Capítulo 3).

Plantas induzidas, cujas raízes se encontravam em diferentes estágios de desenvolvimento (Figura 15a), desenvolveram semelhante espessamento das raízes, para as duas cultivares testadas (Figura 15c e 15d). Isto mostra uma ação específica dos reguladores de crescimento no evento observado.

Com relação ao tipo de resposta, observou-se que as cultivares responderam diferentemente. A cv. IAC 12829 apresentou um espessamento somente na ponta das raízes, para ambos os estágios de desenvolvimento das raízes (Figura 15d). Já a cv. Pioneira (IAPAR) apresentou um espessamento em toda a extensão da raiz, em ambos os estágios de (Figura 15c).

O tempo de resposta após as induções realizadas com 0,4 μM BAP + 1,6 μM ANA, isto é, de 48-72 h, foi o mesmo para as plantas que formaram raízes tuberiformes *in vitro*. Este fato, sugere uma resposta semelhante das raízes tuberiformes obtidas nos dois sistemas de cultivo de plantas sob condições controladas, para o mesmo tratamento.

Nas raízes tuberiformes observou-se um aumento do diâmetro de aproximadamente 50 vezes em relação ao controle, sendo que as raízes induzidas com 1,6 μM ANA + 0,4 μM BAP apresentaram uma estrutura esponjosa com rompimentos na epiderme. Já nas raízes induzidas somente com 0,4 μM BAP, o espessamento teve menor consistência esponjosa, com menores rompimentos na epiderme, o que permitiu a preparação de melhores cortes anatômicos. Estes resultados sugerem uma ação das auxinas no alongamento celular (Cleland, 1988, Davies, 1988), com provável rompimento posterior das células.

4.3.3 Sistema de hidroponia

A metodologia de tuberização sob condições hidropônicas sem agregados não obteve sucesso. Após 40 dias do tratamento com reguladores de crescimento diretamente na solução nutritiva, observou-se necroses nas raízes, inicialmente em pontos isolados, generalizando-se e posteriormente, inviabilizando o desenvolvimento das raízes tuberosas. Este fato pode ter ocorrido devido a uma aeração inadequada. Por outro lado, as plantas controle foram acompanhadas por até 90 dias de idade, não verificando-se qualquer espessamento nas raízes das mesmas. Durante este período, houve desenvolvimento acentuado do sistema radicular em hidroponia, crescimento este que não foi acompanhado pela parte aérea. Sendo assim, pode-se inferir que a parte aérea das plantas controle, não tratadas com as soluções de reguladores de crescimento diretamente na solução nutritiva, não tiveram capacidade para suprir as raízes como fonte, impedindo a tuberização. Até o momento, não foi descrita na literatura, a obtenção de raízes tuberosas de mandioca sob condições hidropônicas, na ausência de agregados.

As estruturas esponjosas, obtidas nas raízes tuberiformes, originaram da ação das cotocininas, isoladamente e combinadas com as auxinas. Observou-se uma paralização, seguida de senescência e morte da parte aérea (dados não apresentados). Esta morte no crescimento da parte aérea pode ter

decorrido em função de um dreno forçado na direção das raízes. Salisbury e Ross (1992) destacaram que a aplicação de citocininas em uma folha, pode levar a região aplicada a atuar como um dreno, podendo entretanto, ser também uma resposta comum à aplicação de outros reguladores de crescimento, como o ABA, GA e etileno ou mesmo uma combinação ou sinergismo entre estes (Archbold, 1988; Brenner, 1988; Gifford e Evans, 1981). No processo de tuberização *in vitro* da batata, é sugerido que as citocininas atuam como um dreno metabólico, porém este dreno gera uma translocação dos assimilados para a parte aérea estiolada, onde serão formados os tubérculos. Nos experimentos desenvolvidos *in vitro* (item 3.3.2) observou-se que o ANA combinado com determinadas citocininas (DHZ, BAP e Z) gerou, em algumas plantas, a formação de raízes tuberiformes (Figura 6- Capítulo 3) e a redução na altura das plantas (Figura 6c). Fato também observado no processo de tuberização da batata no campo, onde há uma paralização do crescimento da parte aérea (Duncan e Ewing, 1984; Heath e Holdsworth, 1948 citado por Leopold e Kridemann, 1975; Parrot, 1973).

Outra possibilidade para explicar a formação das raízes esponjosas é o fato de não ocorrer o depósito de amido, em função da baixa capacidade fotossintética, devido ao baixo número de folhas (3 a 5 folhas), no momento da indução. Esta hipótese se fundamenta na anatomia das raízes tuberiformes de plantas de mandioca do campo que, com 40 dias após o plantio, apresentavam somente o início do crescimento secundário, sem a presença de grãos de amido (Figura 4d, Capítulo 2). Assim, as folhas estariam atuando como dreno das reservas provenientes da estaca, até atingirem 70% do seu crescimento (Turgeon, 1989), e não como fonte para suprir as raízes que iniciariam o processo de tuberização (Lowe, Mahon e Hunt, 1982; Hostalacio e Corrêa, 1979).

Alternativamente, é possível que exista uma ativação preferencial das células do tecido cortical, e uma pequena diferenciação do cilindro central, tendo em vista a ação das citocininas na

divisão celular e das auxinas no alongamento celular (Binns, 1994; Aloni, 1987; Torrey e Loomis, 1967).

Após 30 dias da aplicação dos reguladores de crescimento, as plantas induzidas em estágios mais avançados (maior número de raízes, folhas e altura) não foram tão afetadas ao ponto de suas folhas entrarem em senescência, como ocorreu com as plantas induzidas em estágios de desenvolvimento inferior (dados não apresentados).

4.3.4 Análise anatômica das raízes tuberiformes

Na raiz da planta controle analisou-se quatro regiões (Figura 16). Na região 1 verificou-se a presença de células meristemáticas, que antecedem a diferenciação do cilindro vascular (Figura 18a). Nas regiões 2 e 3 verificou-se o protoxilema tetrarco da raiz (Figura 18b e 18c). Na região 3 havia uma maior concentração de células com coloração vermelha (Figura 18c). Já na região 4 (Figura 16), observou-se uma estrutura de transição raiz-caule, com protoxilema poliarco típico (Figura 18d), com destaque para o espessamento em 'u' das células da endoderme. Este tipo de formação poliarca é típico de raízes de plantas de monocotiledôneas (Fahn, 1982; Esau, 1976), e mesmo para uma região de transição, é atípica para plantas dicotiledôneas. Esta organização estrutural pode ser o resultado de uma alteração induzida pelo meio de crescimento, o que deve ser melhor investigado em trabalhos posteriores. Não foram observados grãos de amido nas diferentes regiões da raiz controle, nem indícios de início de instalação ou atividade do câmbio vascular.

As raízes tuberiformes induzidas com 0,4 μ M BAP (Figura 17), apresentaram um espessamento em relação às raízes controle de até 50 vezes, com diâmetros de até 50 mm (Figura 16). Cortes anatômicos na região 3 (Figura 17a) mostram que este espessamento ocorreu, principalmente, devido a uma elevada divisão e expansão das células do córtex, sendo que nestes cortes observou-se rompimentos nas células periféricas do córtex (Figura 19a). Já no cilindro

central, na região 3, houve maior diferenciação dos elementos de vaso, protoxilema e metaxilema (Figura 19a), em relação a outras regiões menos desenvolvidas (Figura 17a), sendo possível a observação do início da instalação da faixa cambial (Figura 19b). Entretanto, a presença desta faixa cambial não indica, necessariamente, que o crescimento secundário irá continuar até a formação da raiz tuberosa, já que esta característica pode ser observada em raízes de plantas não tuberizadas (dados não apresentados). Já nas regiões 2, 7 e 8 (dados não apresentados), verificou-se a ausência da faixa cambial reentrante e uma menor diferenciação dos elementos vasculares (dados não apresentados).

Análises anatômicas das raízes tuberiformes induzidas com $0,4 \mu\text{M}$ BAP + $1,6 \mu\text{M}$ BAP (dados não apresentados), permitiram concluir que estas apresentam a mesma estrutura anatômica que as raízes tuberiformes obtidas com a indução de $0,4 \mu\text{M}$ BAP, apresentando maior número de rompimentos na epiderme e menor consistência. Estes rompimentos dificultaram muito a preparação das amostras das raízes tuberiformes. Este maior número de rompimentos pode ocorrer devido a um alongamento das células mediante a presença das auxinas (Cleland, 1988; Davies, 1988) ou de um sinergismo destas com as citocininas.

FIGURA 18 - Anatomia da raiz controle de mandioca, cv. Pioneira, em hidroponia (Figura 15c 16). **a)** Corte na região 1 (Figura 16), parte central em diferenciação, cercada por um anel de células do procâmbio (barra da escala = 30 μm), em destaque, aspecto geral do corte (barra de escala = 300 μm); **b)** corte na região 2, mostrando protoxilema tetraarco em luz polarizada (barra da escala = 300 μm); **c)** corte na região 3, mostrando protoxilema tetraarco com pouco destaque dos elementos de vaso (barra da escala = 80 μm), em destaque aspecto geral do corte (barra de escala = 300 μm); **d)** corte na região 4, zona de transição raiz-caule, em luz polarizada, mostrando protoxilema poliarco. Observa-se o espessamento das células da endoderme (E) (barra da escala = 30 μm), em destaque aspecto geral do corte (barra de escala = 300 μm).

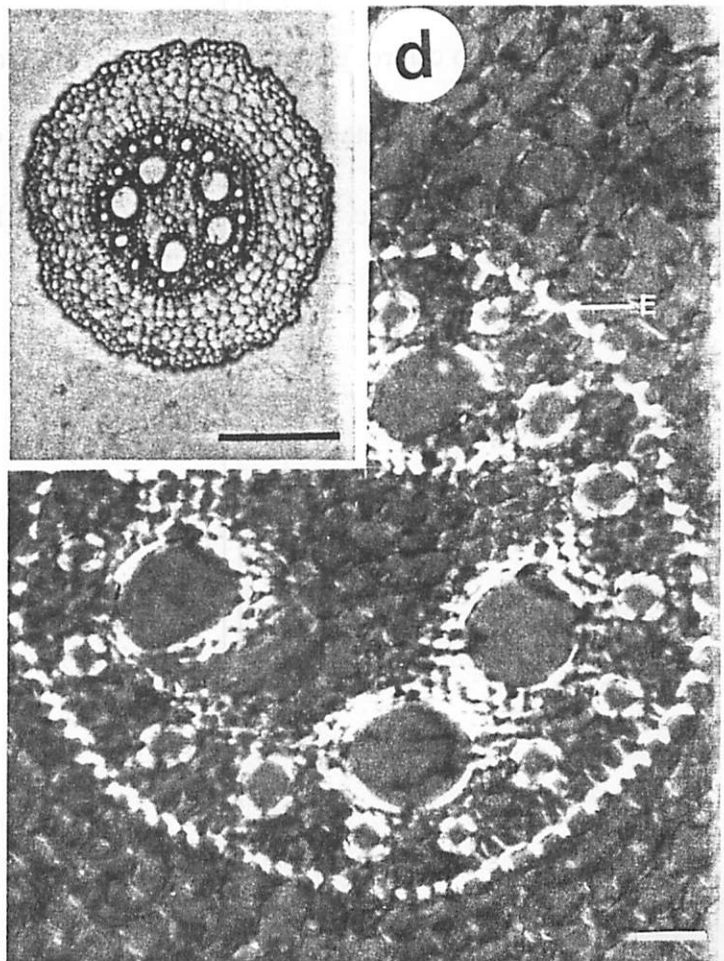
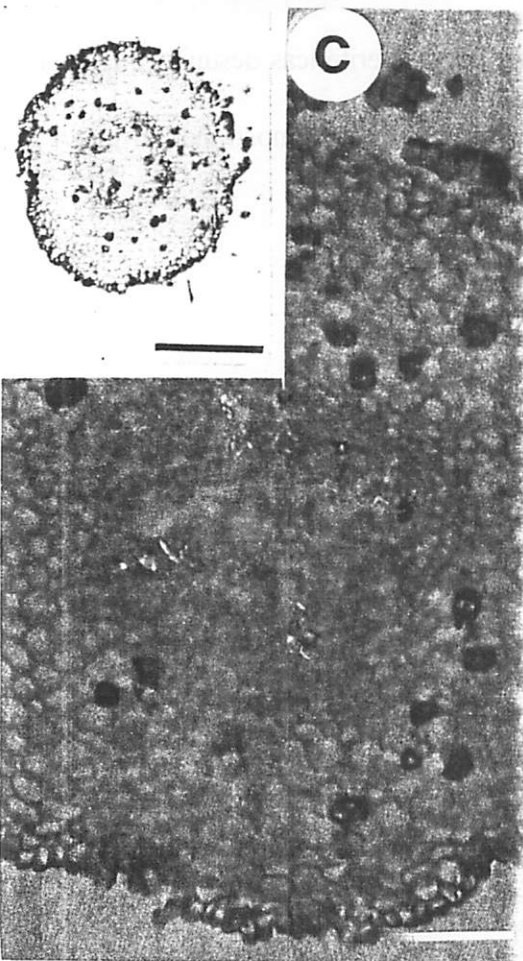
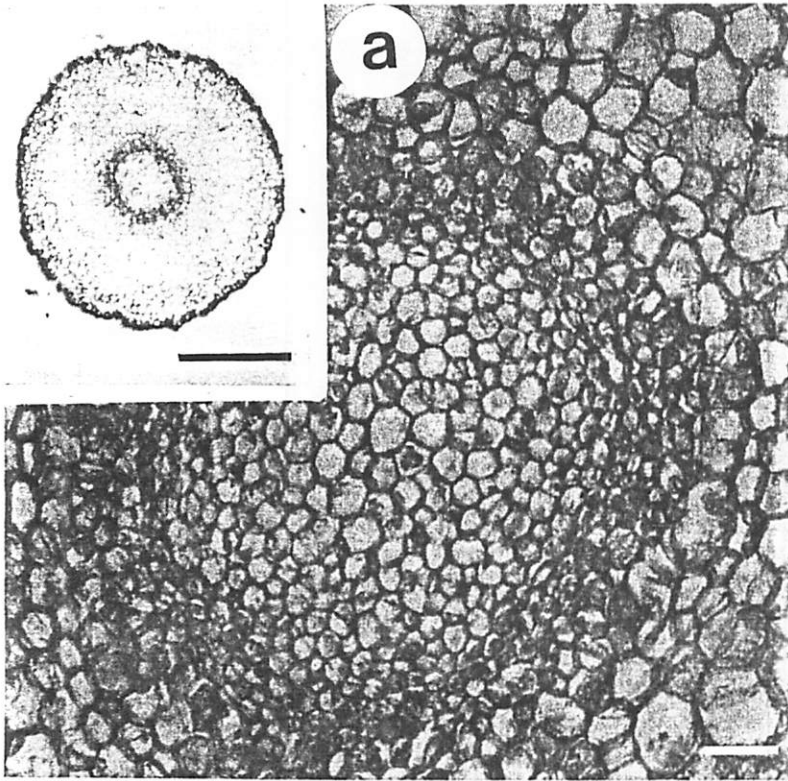
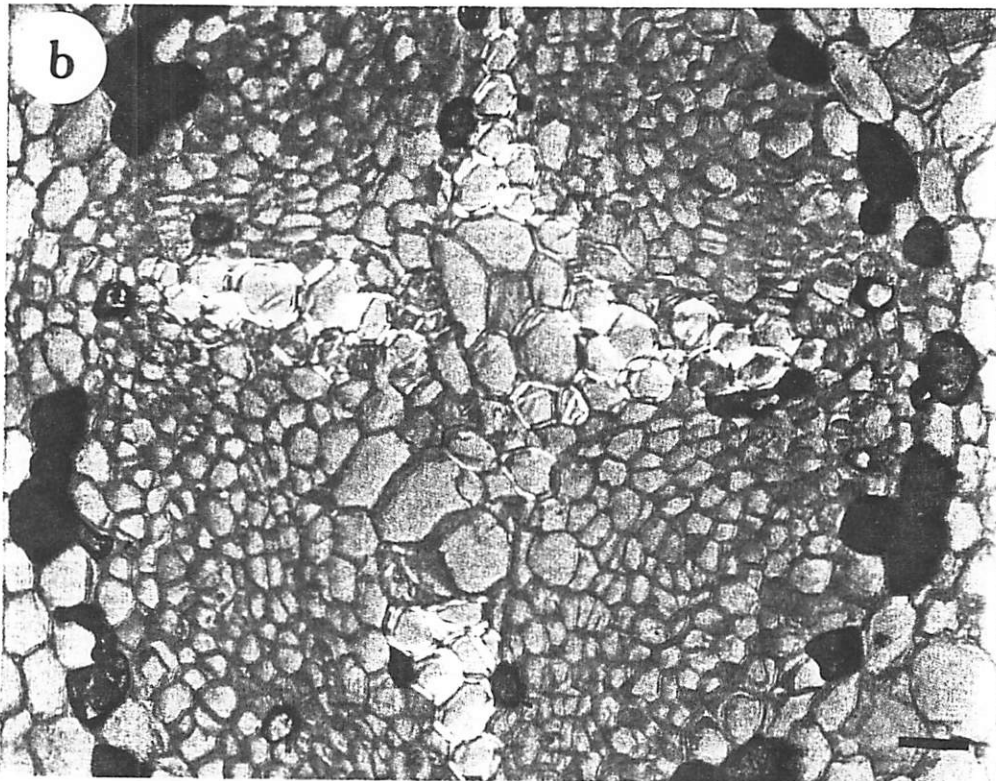
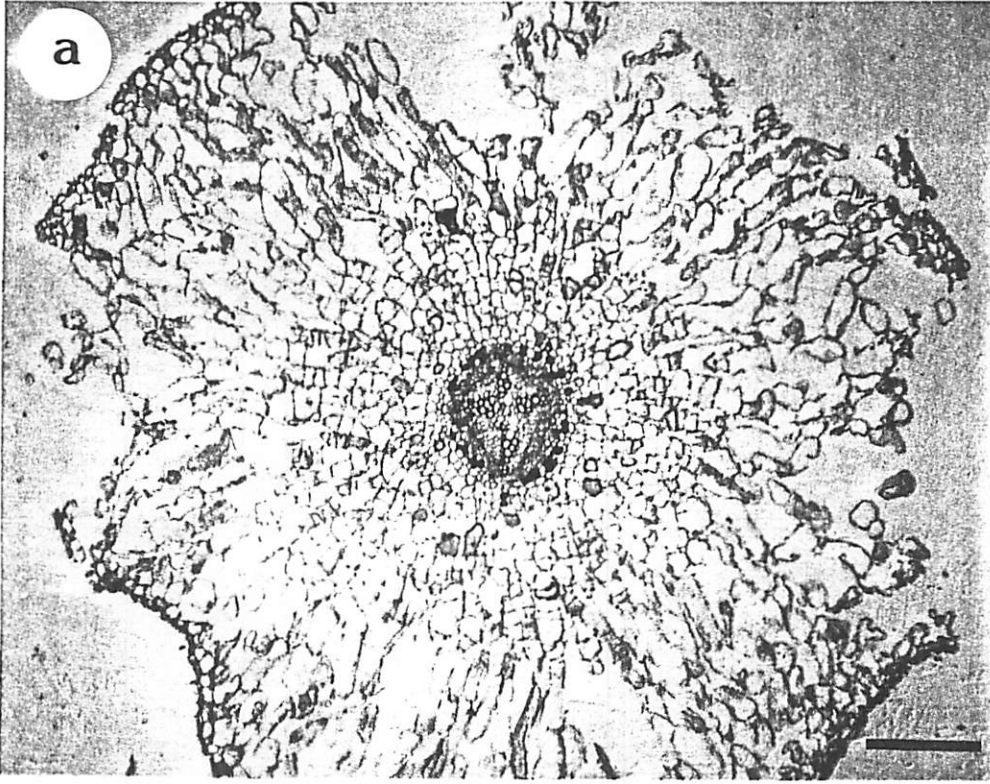


FIGURA 19 - Raiz tuberiforme de mandioca, cv. Pioneira, induzida com 0,4 μM BAP em hidroponia (Figura 16c e 17). **a)** corte na região 3, protoxilemas tetrarco. Elementos de vaso do protoxilema (px) e do metaxilema (mx) no centro, elevada ativação do córtex com células periféricas desuniformes (barra da escala = 300 μm); **b)** detalhe do corte na região 3 em luz polarizada, mostrando o início da instalação do câmbio reentrante, (barra da escala = 30 μm).



4.4 CONCLUSÕES

Plantas nas quais os reguladores de crescimento foram aplicados diretamente na solução nutritiva, formaram raízes tuberiformes. Já as plantas tratadas na parte aérea não apresentaram nenhum espessamento em suas raízes, sugerindo que os reguladores de crescimento utilizados, não foram translocados da parte aérea para as raízes.

Raízes tuberiformes induzidas com $0,4 \mu\text{M}$ BAP foram menos esponjosas e apresentaram menos rompimentos na epiderme, quando comparadas às raízes tratadas diretamente com $1,6 \mu\text{M}$ ANA + $0,4 \mu\text{M}$ BAP.

Análises anatômicas das raízes tuberiformes mostraram que estas não possuem características semelhantes às raízes tuberosas de mandioca no campo. Estes resultados permitem concluir que as raízes tuberiformes obtidas são estruturas resultantes da ação dos reguladores de crescimento aplicados na solução nutritiva, fazendo-se necessário, mais estudos, visando a obtenção de estruturas com características de raízes do campo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABERCROMBIE, M.; HICKMEN, C.J.; JOHSON, M.L. **A dictionary of biology**. Maryland: Pinguin reference books, 1969. 284 p.
- AESCHBACHER, R.A. The genetic and molecular basis of root development. **Annual Review of Plant Physiology Plant Molecular Biology**, California, v.45, p.25-45, 1994.
- AGARWAL, A.K.; KUMAR, P.; ALKA Influence of morphactin and gibberellic acid on plant growth, stolon development, tuberization and yield in potato (*Solanum tuberosum* L.) exposed to varying photoperiods. **Indian Journal of Plant Physiology**, New Delhi, v.26, n.3, p.285-291, Sept. 1983.
- AKITA, M.; TAKAYAMA, S. Induction and development of potato tubers in a jar fermentor. **Plant Cell and Organ Tissue Culture**, Dordrecht, v.36, n.2, p.177-182, Feb. 1994.
- ALEJANDRO, C.U. **Transformation of Manihot esculenta cassava using Agrobacterium tumefaciens and expression of the introduced foreign genes in transformed cell lines**. Vrije: Universiteit Brussel, 1987-1988. 37p. (Tese - Mestrado em Biologia Molecular).
- ALHASSAN, A.Y. Cultural factors affecting clonal propagation and microtuberization of *Dioscorea alata* L. food yam. In: ROCA, W. M.; THRO, A.M. (eds.). **Proceedings of the first international scientific meeting of the cassava biotechnology network**. Cali: CIAT, 1993. p.154-162.
- ALLEM, A.C.; GOEDERT, C.O. Formação da base genética e manejo dos recursos genéticos de mandioca: o caso do Brasil. In: HERSHEY (ed.). **Mejoramiento genético de la yuca en América Latina**. Cali: CIAT, 1991. p.125-161.
- ALONI, R. Differentiation of vascular tissue. **Annual Review of Plant Physiology**, California, v.38, p.179-204, 1987.

- ALVARENGA, A.A.; VÁLIO, I.F.M. Influence of temperature and photoperiod on flowering and tuberous root formation of *Pachyrrhizus tuberosus*. **Annals of Botany**, London, v.64, n.4, p.411-414, Oct. 1989.
- ANGEL, F.; ARIAS, D.I.; TOHME, J.; IGLESIAS, C.; ROCA, W.M. Toward the construction of a molecular map of cassava (*Manihot esculenta* Crantz): comparison of restriction enzymes and probe sources in detecting RFLPs. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v.31, n.1, p.103-113, Oct. 1993.
- ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO BRASIL - 1993. Rio de Janeiro, FIBGE, v.51.
- ARCHBOLD, D.D. Abscisic acid facilitates sucrose import by strawberry fruit explants and cortex disks *in vitro*. **HortScience**, Alexandria, v.23, n.5, p.880-881, May 1988.
- ASHER, C.J.; EDWARDS, D.G.; HOWELER, R.H. **Desórdenes nutricionales de la yuca**. Cali: Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), 1980. 48 p.
- BAIJAL, B.D.; KUMAR, P.; ALKA; SIDDIQUI, M.A. Interaction of growth regulators and photoperiods on growth, flowering, stolon development, tuber initiation and yield in potato (*Solanum tuberosum* L.). **Indian Journal of Plant Physiology**, New Delhi, v. 26, n.1, p. 61-67, Mar. 1983.
- BARROS, R.S. Fisiologia da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz.). In: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Centro Nacional de Pesquisa em Mandioca e Fruticultura. **I curso intensivo nacional de mandioca**. Cruz das Almas: CNPMF, 1976. p.231-260.
- BINNS, A.N. Cytokinin accumulation and action: Biochemical, Genetic, and Molecular approaches. **Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, California, v. 45, p.173-196, 1994.
- BLUNDEN, G.; WILDGOOSE, P.B. The effects of aqueous seaweed extract and kinetin on potato yields. **Sci. Fd. Agric.**, v.28, p.121-125, 1977.
- BOLHUIS, G.G. A survey of some attempts to breed cassava-varieties with a high content of proteins in the roots. **Euphytica**, Dordrecht, v.2, n.3, p.107-112, 1953.
- BONSI, C.K.; LORETAN, P.A.; HILL, W.A.; MORRIS, C.E. Growth of sweet potatoes under continuous light. **HortScience**, Alexandria, v.23, n.5, p.827, May 1988.

- BONSI, C.K.; LORETAN, P.A.; HILL, W.A.; MORTLEY, D.G. Response of sweetpotatoes to continuous light. **HortScience**, Alexandria, v.27, n.5, p.471, May 1992.
- BOURQUE, J.E.; MILLER, J.C.; PARK, W.D. Use of an *in vitro* tuberization system to study tuber protein gene expression. **In Vitro Cellular and Developmental Biology**, Columbia, v.23, n.5, p.381-389, May 1987.
- BREASPALHOK, J.C. FILHO; HASHIMOTO, J.M.; VIEIRA, L.G.E. Induction of somatic embryogenesis from leaf explants of *Stevia rebaudiana*. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, São Carlos, v.5, n.1, p.51-53, jun. 1993.
- BRENNER, M.L. The role of hormones in photosynthate partitioning and seed filling. In: DAVIES, P.J. **Planta hormones and their role in plant growth and development**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1988. p.494-514.
- BUCHANAN, B.B. Role of light in the regulation of chloroplast enzymes. **Annual Review Plant Physiology**, California, v.31, p.341-374, 1980.
- CABRAL, G.B.; ARAGÃO, F.J.L.; MATSUMOTO, K.; MONTE-NESHICH, D.C.; RECH, E.L. Cassava tissue culture: multiple shoot and somatic embryogenesis. In: ROCA, W. M.; THRO, A.M. (eds.). **Proceedings of the first international scientific meeting of the cassava biotechnology network**. Cali: CIAT, 1993. p.180-184.
- CACHITA-COSMA, D. The effect of the nature and origin of explants on micropropagation. In: BAJAJ, Y.P.S. **Biotechnology in agriculture and forestry: High tech and micropropagation I**. Berlin: Springer Verlag, 1991. p. 143-167.
- CAPELLADES, M.; LEMEURE, R.; DEGERGH, P. Effects of sucrose on starch accumulation and rate of photosynthesis in *rosa* cultured *in vitro*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.25, n.1, p.21-26, Apr. 1991.
- CARVALHO, J.L.H. **Mandioca raiz e parte aérea na alimentação animal**. São Paulo: Cati, 1994. 9 p. (Instrução Prática 259).
- CARVALHO, L.J.C.B.; CASCARDO, J.C.M.; FERREIRA, M.E.; LOUREIRO, M.E. Studies on proteins and enzymes related to tuberization and starch biosynthesis in cassava roots. In: ROCA, W. M.; THRO, A.M. (eds.). **Proceedings of the first international scientific meeting of the cassava biotechnology network**. Cali: CIAT, 1993a. p.234-238.

- CARVALHO, L.J.C.B.; CASCARDO, J.C.M.; LIMEIRA, P.S.; RIBEIRO, M.C.M.; FIALHO, J.F. Study of DNA polymorphism in *Manihot esculenta* Crantz and related species. In: ROCA, W. M.; THRO, A.M. (eds.). **Proceedings of the first international scientific meeting of the cassava biotechnology network**. Cali: CIAT, 1993b. p.56-61.
- CARVALHO, P.C.L.; EZETA, F.N. Efeito do fotoperíodo sobre a tuberação da mandioca. **Revista Brasileira de Mandioca**, Cruz das Almas, v.2, n.1, p.51-54, 1983.
- CARVALHO, P.C.L.; EZETA, F.N.; CALDAS, R.C.; RODRIGUES, E.M. Contribuição da endomicorriza para absorção de nutrientes e crescimento da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). **Revista Brasileira de Mandioca**, Cruz das Almas, v.1, n.1, p.55-60, 1982.
- CARVALHO, V.D.; CARVALHO, J.G. Princípios tóxicos da mandioca. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.5, n.59-60, p.82-84, nov./dez. 1979.
- CASSAVA BOTECHNOLOGY NETWORK (CBN). Cali: CIAT, v.2, n.2, Oct. 1994. 19p.
- CATCHOPOLE, A.H.; HILLMAN, J. Effect of ethylene on tuber initiation in *Solanum tuberosum* L. **Nature**, London, v.223, n.5213, p.1387, Sept. 1969.
- CENTRO INTERNACIONAL DE AGRICULTURA TROPICAL (CIAT). **Yuca : Lo ultimo acerca de un cultivo milenario**. Cali: CIAT, 1993. Não paginado (Boletim informativo).
- CEREDA, M.P.; SARMENTO, S.B.S.; WOSIACKI, G.; ABBUD, N.S.; TAKEDA, I.J.M. A mandioca (*Manihot esculenta* C.) cv. Pioneira. 1 - Características das raízes. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, Curitiba, v.33, n.1, p.105-116, mar. 1990.
- CHARLES, G.; ROSSIGNOL, L.; ROSSIGNOL, M. A synchronous model perfecting for fundamental studies on the tuberization process. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v.142, p.474-479, 1993.
- CHAVARRIAGA-AGUIRRE, P.; SCHÖPKE, C.; SANGARE, A.; FAUQUET, C.; BEACHY, R.N. Transformation of cassava (*Manihot esculenta* Crantz.) embryogenic tissues using *Agrobacterium tumefaciens*, In: ROCA, W. M.; THRO, A.M. (eds.). **Proceedings of the first international scientific meeting of the cassava biotechnology network**. Cali: CIAT, 1993. p.222-228.

- CHEN, L.O.; LO, H.; CHEN, T.; LEE, L. Peroxidase zymograms of sweet potato (*Ipomea batatas* (L) Lam) grown under hydroponic culture. **Botanica Bulletin Academia Sinica**, Taiwan, v.33, n.3, p.247-252, Mar. 1992.
- CHENG, B.; PETERSON, C.M.; MITCHELL, R.J. The role of sucrose, auxin and explant source on in vitro rooting of seedling explants of *Eucalyptus sideroxylon*. **Plant Science**, Limerick, v.87, n.2, p.207-214, 1992.
- CHU, C.C.; COLEMAN, J.S.; MOONEY, H.A. Controls of biomass partitioning between roots and shoots: Atmospheric CO₂ enrichment and the acquisition and allocation of carbon and nitrogen in wild radish. **Oecologia**, Berlin, v.89, n.4, p.580-587, Apr. 1992.
- CID, L.P.B.; ILLG, R.D.; PIEDRABUENA, A.E. Regeneration of garlic plants (*Allium sativum* L., cv. 'Chonan') via cell culture in liquid medium. **In Vitro Cell Development Biology**, Columbia, v.30, p.150-155, July 1994.
- CLELAND, R.E. Auxin and cell elongation. In: DAVIES, P.J. **Planta hormones and their role in plant growth and development**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1988. p.132-148.
- COCK, J.H. Cassava: abasic energy source in the tropics. In: COCK, J.H. e REYES, J.A. (eds). **Cassava: Research, production and utilization**. Cali: CIAT, 1985. 67p.
- COCK, J.H.; WHOLEY, D.; LOZANO, J.C.; TORO, J.C. **Sistema rápido de propagación de yuca**. Cali: CIAT, 1976, 13p.
- CONCEIÇÃO, A.J. **A mandioca**. Cruz das Almas: UFBA, EMBRAPA, BNB, BRASCAN / Nordeste, 1979. 382p.
- CONKLING, M.A.; CHENG, C.; YAMAMOTO, Y.T.; GOODMAN, H.M. Isolation of transcriptionally regulated root-specific genes from tobacco. **Plant Physiology**, Maryland, v.93, n.3, p.1203-1211, July 1990.
- CÔRREA, H.; ROCHA, B.V. Manejo da cultura da mandioca. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.5, n.59-60, p.16-30, nov./dez. 1979.

- CÔRREA, N.J.C.; PINTO, C.A.B.P; OLIVEIRA, E. Comportamento de cultivares de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) em presença o fungo micorrízico *Glomus clarum* Nicolson & Schenck e dosagens de fósforo. **Ciência e Prática**, Lavras, v.16, n.4, p.467-474, out/dez. 1992.
- CUTTER, E.G. **Anatomia Vegetal**: - Experimentos e interpretações. v.2. Órgãos. Tradução por Gabriela V.M.C. São Paulo: Roca, 1987. 335p.
- DAVIES, P.J. **The plant hormones: Their nature, occurrence, and functions**. In: DAVIES, P.J. **Planta hormones and their role in plant growth and development**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.1988, p.1-23.
- DREW, R.L.K. Effect of activated charcoal on embryogenesis and regeneration of plantlets from suspension cultures of carrot (*Daucus carota* L.). **Annals of Botany**, London, v.44, n.3, p.387-389, Apr. 1979.
- DRUART, P.H.; DE WULF, O. Activated charcoal catalyses sucrose hydrolysis during autoclaving. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.32, n.1, p.97-99, Jan. 1993.
- DUNCAN, D.A.; EWING, E.E. Initial anatomical changes associated with tuber formation on single-node potato (*Solanum tuberosum* L.) cuttings. **Annals of Botany**, London, v.53, n.4, p.607-610, Apr. 1984.
- DUNCAN, E.J.; McPHERSON, G.I. Changes in the petiole of leaves of *Manihot esculenta* (Crantz), on rooting. **Annals of Botany**, London, v.38, n.154, p.261-267, Jan. 1974.
- ELLIOTT, M.C.; HOSFORD, D.J.; LENTON, J.R.; MILFORD, G.F.J.; POCOCK, T.O.; SMITH, J.I.; LAWRENCE, D.K.; FIRBY, D.J. Hormonal control of storage root growth. In: JACKSON, M.B.; STEAD, A. D. **Growth regulators in root development**. Oxford: Pergamon, 1983. p.25-35.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA/CENTRO NACIONAL DE PESQUISA EM MANDIOCA E FRUTICULTURA(EMBRAPA/CNPMPF). **VIII Curso intensivo nacional de mandioca**. CNPMPF: Cruz das Almas, 1993. (não paginado).
- EPSTEIN, E. **Mineral nutrition of plants: principles and perspective**. New York: John Wiley & Sons, 1972. 412p.

- ESAU, K. **Anatomia das plantas com sementes**. Tradução por Berta Lange de Morretes: São Paulo: Edgard Blücher, 1976. 293p. Título original: *Anatomy of seed plants*.
- ESAU, K. **Anatomía vegetal**. Tradução por José Pons Rosell. Barcelona: Omega, 1959. 729p. Título original: *Plant Anatomy*.
- ESECHIE, H.A. Total nonstructural carbohydrate distribution in cassava during growth in a rainforest zone, Nigéria. **Tropical Agriculture**, Trinidad, v.64, n.4, p.340-342, Oct. 1980.
- ESKES, A.B.; VARGA, A.; STARITSKY, G.; BRUINSNA, J. Callus growth and rooting of cassava (*Manihot esculenta crantz*) stem segments cultured in vitro. **Acta Botanica Neerlandica**, Dorset, v. 23, n.3, p.315-320, June 1974.
- ESPINOZA, J.A. Genética, citogenética y mejoramiento de la yuca. In: HERSHEY, C.H (ed.). **Mejoramiento genético de la yuca en América Latina**. Cali: CIAT, 1991. p.177-196.
- EWING, E.E.; STRUIK, P.C. Tuber formation in potato: Induciton, initiation, and growth. **Horticultural Reviews**, New York, v.14, p.89-198, 1992.
- EZETA, F.N.; CARVALHO, P.C.L. Influência da endomicorriza na absorção de P e K no crescimento da mandioca. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v.6, n.1, p.25-28, jan./abr. 1982.
- FAHN, A. **Plant Anatomy**. 3. ed. Oxford: Pergamon Press, 1982. 544p.
- FAO. **Quarterly bulletin of statistiques**. FAO: Rome, v.8, n.1/2, 1995.
- FAO. **Quarterly bulletin of statistiques**. FAO: Rome, v.5, n.3, 1992.
- FAO. Raices, tuberculos, platanos y bananas en la nutrición humana In: FAO. **Alimentación y nutrición**. FAO: Rome, n.24, 1991. 195p.
- FERRI, M.G.; MENEZES, N.L.; MONTEIRO, W.R. **Glossário ilustrado de botânica**. São Paulo: Nobel, 1981. 197p.

- 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 Fisiologia Vegetal)
- FILGUEIRA, F.A.R. **Manual de olericultura e comercialização de hortaliças**. São Paulo: Ed. Agronômica Ceres, 1972. 451p.
- FINER, J. J. Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of hybrid sunflower (*Helianthus annuus* L.) on a high sucrose-containing medium, **Plant Cell Reports**, Berlin, v.6, n.5, p.372-374, Oct. 1987.
- FONT QUER, P. **Diccionario de Botánica**. Barcelona: Labor, 1975. 1244p.
- FORSLINE, P.L.; LANGILLE, A.R. Endogenous cytokinins in *Solanum tuberosum* as influenced by photoperiod and temperature. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.34, n.1, p.75-77, 1975.
- FRIDBORG, G.; PEDERSEN, M.; LANDSTRÖM, L.; ERIKSSON, T. The effect of activated charcoal on tissue cultures: adsorption of metabolites inhibiting morphogenesis. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 43, p.104-106, 1978.
- FUNDAÇÃO INSTITUTO BRASILEIRA DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Pesquisa de orçamentos familiares - Consumo alimentar domiciliar 'per capita'**. Rio de Janeiro: IBGE, n.2, 1987-1988. 170p.
- GARCIA-TORRES, L., GOMEZ-CAMPO, C. In vitro tuberization of potato sprouts as affected by ethrel and gibberellic acid. **Potato Research**, Wageningen, v.16, n.1, p.73-79, 1973.
- GARNER, N.; BLAKE, J. The induction and development of potato microtubers *in vitro* on media free of growth regulating substances. **Annals of Botany**, London, v.63, n.6, p.663-674, June 1989.
- GEORGE, E.F. **Plant propagation by tissue culture: Parte I Technology**. 2.ed. Edington: Exegetics, 1993. 574p.
- GINFFORD, R.M.; EVANS, L.T. Photosynthesis, carbon partitioning, and yield. **Annual Review of Plant Physiology**, California, v.32, p.483-5009, 1981.

- GOVIL, C.M. Morphological studies in the family convolvulaceae - II Morphology and anatomy of the tuber of *Ipomea batatas* Lamk. **The Journal of the Indian Botanical Society**, Vew Pali, v.50, n.2, p.114-122, 1971.
- GRANT, P.J.; LU, J.Y. Nutrient composition of sweetpotato storage roots altered by frequency of nutrient solution change. **Hort Science**, Alexandria, v.28, n.8, p.802-804, Aug. 1993.
- GREGORY, L.E. Some factors for tuberization in the potato plant. **American Journal of Botany**, Miami, v.43, n.4, p.281-288, Apr. 1956.
- GRIZZLE, J.E.; STARMEER C.F.; KOCH G.G. Analysis of categorical data by linear models. **Biometrics**, Carolina do Norte, v.25, n.3, p.489-505, Sept. 1969.
- HAMMES, P.S.; NEL, P.C. Control mechanisms in the tuberization process. **Potato Research**, Wageningen, v.18, p.262-272, 1975.
- HANNAPEL, D.J.; MILLER, J.C.; PARK, W.D. Regulation of potato tuber protein accumulation by gibberellic acid. **Plant Physiology**, Maryland, v.78, n.3, p.700-703, July 1985.
- HASHIZUME, T.; SUYE, S.; SUGIYAMA, T. Mass spectrometric determination of endogenous cytokinins in potato tubers. **Agricultural and Biology Chemistry**, Tokio, v.49, n.2, p.387-390, Feb. 1985.
- 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.1, p.79-86, Oct. 1991.
- HATTORI, T.; MATSUOKA, K.; NAKAMURA, K. Subcellular localization of the sweet potato tuberous root storage protein. **Agricultural and Biology Chemistry**, Tokyo, v.52, n.4, p.1057-1059, Apr. 1988.
- 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**, Amsterdam, v.14, n.3, p.595-604, Mar. 1990.
- HAWKER, J.S.; JENNER, C.F.; NIEMIETZ, C.M. Sugar metabolism and compartmentation. **Australian Journal of Plant Physiology**, Melbourne, v.18, n.3, p.227-237, 1991.

- HERMAN, E.B. **Recent advances in plant tissue culture - Regeneration, micropropagation and media.** Nova York: Agritech Consultants, 1991. 94p.
- HILL, W.A.; MORRIS, C.E.; LORETAN, P.A.; BONSI, C.K.; PACE, R.D.; LU, J.Y. Sweet potato production using nutrient film. **HortScience**, Alexandria, v.23, n.5, p.827, Oct. 1988.
- HO, L.C. Metabolism and compartmentation of imported sugars in sink organs in relation to sink strength. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, California, v.39, p.355-378, 1988.
- HOLE, C.C.; THOMAS, T.H.; McKEE, J.M.T. Sink development and dry matter distribution in storage root crops. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v.2, n.4, p.347-358, 1984.
- HOSTALÁCIO, S; CORRÊA, H. Aspectos de fisiologia em mandioca. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.5, n.59-60, p.41-45, nov./dez. 1979.
- 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.4, 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.1, p.29-32, 1977.
- INDIRA, P.; MAINI, S.B. Effect of growth regulators on tuberization in cassava. **C.T.C.R.I.**, v.93, p.16-21, 1973.
- INDIRA, P.; RAMANUJAM, T. Effect of photoperiod on tuberization in cassava. **Journal of Root Crops**, Trivandrum, v.5, n. 1-2, p. 39-42, 1979.
- INDIRA, P.; SINHA, S.K. Studies on the initiation and development of tubers in *Manihot esculenta* Crantz. **Indian Journal of Plant Physiology**, New Delhi, v.13, n.1, p.24-39, 1970.
- JACKSON, S.D.; SONNEWALD, U.; WILLMITZER, L. Characterization of a gene that is expressed in leaves at higher levels upon tuberization in potato and upon flowering in tobacco. **Planta**, Berlin, v.189, n.4, 1993.

- JACKSON, S.D.; WILLMITZER, L. Jasmonic acid spraying does not induce tuberisation in short-day-requiring potato species kept in non-inducing conditions. **Planta**, Berlin, v.194, n.2, p.155-159, 1994.
- 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.1, p.53-57, Jan. 1985.
- JEAN, M.; CAPPADOCIA, M. Effects of some growth regulators on in vitro tuberization in *Dioscorea alata* L. 'Brazo fuerte' and *D. abyssinica* Hoch. **Plant Cell Reports**, Berlin, v.11, n.1, p.34-38, Feb. 1992.
- JOHANSEN, D.A. **Plant microtechnique**. New York: McGraw-Hill Book Company, 1940. 523p.
- JOHN, J.L.; COURTNEY, W.H.; DECOTEAU, D.R. The influence of plant growth regulators and light on microtuber induction and formation in *Dioscorea alata* L. cultures. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.34, n.3, p.245-252, Sept. 1993.
- KARTHA, K.K.; GAMBORG, O.L.; CONSTABEL, F; SHYLUK, J.P. Regeneration of cassava plants from apical meristems. **Plant Science Letters**, Limerick, v.2, p.107-113, 1974.
- KASELE, I.N.; HAHN, S.K.; OPUTA, C.O.; VINE, P.N. Effects of shade, nitroge, and potassiun on cassava. **Potash Review**, Basel, n.5, 5p., 1986.
- KEATING, B.A.; WILSON, G.L.; EVENSON, J.P. Effect of photoperiod on growth and development of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Australian Journal of Plant Physiology**, Melbourne, v.12, n.6, p.621-630, 1985.
- KIM, K.; DAVELAAR, E.; KLERK, G. Abscisic acid controls dormancy development and bulb formation in lily plantlets regenerated *in vitro*. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.90, n.1, p.59-64, Jan. 1994.
- KODA, Y.; KIKUTA, Y.; TAZAKI, H.; TSUJINO, Y.; SAKAMURA, S.; YOSHIHARA, T. Potato tuber-inducing activities of jasmonic acid and related compounds. **Phytochemistry**, New York, v.30, n.5, p.1435-1438, Apr. 1991.
- KODA, Y.; KIKUTA, Y. Possible involvement of jasmonic acid in tuberization of yam plants. **Plant and Cell Physiology**, Osaka, v.32, n.5, p. 629-633, July 1991.

- KODA, Y.; OKAZAWA, Y. Detection of potato tuber-inducing activity in potato leaves and old tubers. **Plant and Cell Physiology**, Osaka, v.29, n.6, p.969-974, Sept. 1988.
- KONNAN, N.K.; SANGWAN, R.S.; SANGWAN-NORREEL, B.S. Efficient *in vitro* shoot-regeneration systems in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Plant Breeding**, Berlin, v.113, n.3, p.227-236, 1994.
- KRATKY, B.A.; BOWEN, J.E. Observatons on a noncirculating hydroponic system for tomato production. **HortScience**, Alexandria, v.23, n.5, p.906-907, Oct. 1988.
- KUBOI, T. FUJII, K. Toxicity of cationic polimer flocculants to higher plants. **Soil Science Plant Nutrition**, Tokyo, v.31, n.2, p.163-173, June 1985.
- KUMAR, D.; WAREING, P.F. Factors controlling stolon development in the potato plant. **New Physiologist**, Oxford, v.71, p.639-648, 1972.
- LABERCHE, J.C.; LAVIEVILLE, L.; MARGUERY, P.; SANGWAN, B.S. L'action de polyamines sur la microtubérisation de la pomme de terre, *Solanum tuberosum* L. **Revue Cytologie et de Biologie Végétales de le Botaniste**, Paris, v.17, n.1-2, p.87-96, 1994.
- LARDIZABAL, R.D.; THOMPSON, P.G. Hydroponic culture, grafting, and growth regulator to increase flowering in sweet potato. **HortScience**, Alexandria, v.23, n.6, p 993-995, Dec. 1988.
- LAVIEVILLE, L.; SANGWAN, B.S. Étude de l'évolution de la microtuberisation *in vitro* chez *Solanum tuberosum* L. **Revue Cytologie et de Biologie Végétales de le Botaniste**, Paris, v.17, n.1-2, p.79-86, 1994.
- LENTON, J.R. Are plant growth substances involved in the partitioning of assimilate to developing reproductive sinks?. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v.2, n.4, p.267-276, 1984.
- LEOPOLD, A.C.; KRIEDEMANN, P.E. **Plant growth and development**, 2.ed. New Delhi: Tata Tata McGraw-Hill, 1975. 545p.
- LOOMIS, R.S.; TORREY, J.G. Chemical control of vascular cambium initiation in isolated radish roots. **Proceedings of the National Academic Science**, Washington, v.52, p.3-11, 1964.

- LOPEZ, C.A.M.; COCK, J.H. Iniciacion de enraizamento y tuberización en yuca (*Manihot esculenta* C.) y efecto del almacenamiento de la estaca en el rendimiento. *Acta Agronômica*, Palmira, v.26, n.1-2, p.65, 1976.
- LORENZI, J.O.; DIAS, C.A.C. **Cultura da mandioca**. 2.ed. Campinas: Cati, 1993. 41 p.(Boletim Técnico 211).
- LORETAN, P.A.; HILL, W.A.; BONSI, C.K.; MORRIS, C.E. Effect of aggregate, nutrient solution, and pot size on production of sweet potato roots. *HortScience*, Alexandria, v.23, n.5, p.828, Oct. 1988.
- LOWE, S.B.; MAHON, J.D.; HUNT, L.A. Early development of cassava (*Manihot esculenta*). *Canadian Journal of Botany*, Ottawa, v.60, n.12, p.3040-3048, Dec. 1982.
- LOWE, S.B.; MAHON, J.D.; HUNT, L.A. The effect of daylength on shoot growth and formation of root tubers in young plants of cassava (*Manihot esculenta* Crantz.). *Plant Science Letters*, Limerick, v.6, n.1, p.57-62, Jan. 1976.
- MADEC, P. Sur la présence et les possibilites d'extraction de substances inductrices de la tubérisation chez la pomme de terre. *Annales de Physiologie Végétale*, Paris, v.3, n.3, p.209-213, 1961.
- MAESHIMA, M.; SASAKI, T.; ASAHI, T. Characterization of major proteins in sweet potato tuberous roots. *Phytochemistry*, New York, v.24, n.9, p.1899-1902, Aug. 1985.
- MAKISHIMA, N. **Cultivo de Hortaliças**. 2.ed. Brasília: EMBRAPA/CNPH, 1987. 25 p. (Instruções Técnicas do CNPHortaliças).
- MANTEL, S.H.; 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 *D. bulbifera* L. yams. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Dordrecht, v.16, n.1, p.23-37, Jan. 1989.
- MARGARA, J. **Bases de la multiplication vegetative, les méristèmes et lórganogênese**. Paris: INRA, 1982. 262p.
- MARIA, J. **Root growth and development in cassava (*Manihot esculenta* Crantz.) *in vitro***. Manchester, 1987. 174p. (Tese - Doutorado em Filosofia, Faculdade de Ciências, Departament of Cell and Structural Biology),.

- 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.
- MAUSETH, J.D. **Botany: An introduction to plant biology**. Philadelphia: Saunders College, 1991. 800p.
- MEI LO, F.; IRVINI, B.R.; BARKER, W.G. *In vitro* tuberization of the common potato (*Solanum tuberosum*) is not a response to the osmotic concentration of the medium.. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.50, n.3, p.603-605, Mar. 1972.
- MELIS, M.R.J.; VAN STADEN, J. Tuberization in cassava (*Manihot esculenta* Crantz.): Cytokinin and abscisic acid activity in tuberous roots. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v.118, p.357-366, 1985.
- MELIS, R.J.M.; VAN STADEN, J. The effect of gibberelic acid and gibberillin inhibitors on cassava. In: **CIP. Proceedings of the sixty simposium of the international society for tropical root crops**. Lima: CIP, 1984.p.267-265.
- MENZEL, C.M. Tuberization in potato at high temperatures: Gibberellin content and transport from buds. **Annals of Botany**, London, v.52, n.5, p.697-702, Nov. 1983.
- MENZEL, C.M. Tuberization in potato at high temperatures. Response to gibberellin and growth inhibitors. **Annals of Botany**, London, v.46, n.3, p.259-265, Sept. 1980.
- MINGO-CASTEL, A.M.; SMITH, O.E.; KUMAMOTO, J. Studies on the carbon dioxide promotion and ethylene inhibition of tuberization in potato explants cultured *in vitro*. **Plant Physiology**, Maryland, v.37, n.4, p.480-485, Apr. 1976.
- MINGO-CASTEL, A.M.; YOUNG, R.E.; SMITH, O.E. Kinetin-induced tuberization of potato *in vitro*: on the mode of action of kinetin. **Plant and Cell Physiology**, Osaka, v.17, n.3, p.557-570, June 1976.
- MODESTO, Z.M.M.; SIQUEIRA, N.J.B. **Botânica**. São Paulo: EPU, 1981. Paginação irregular. (Currículo de Estudos de Biologia - CEB, 5).
- MOGILNER, I.; ORIOLI, G.A.; BLETTLER, C.M. Ensayo de topofisis y fotoperiodismo en mandioca. **Bonplandia**, Sargento Cabral, v.2, n.15, p.265-272, Nov. 1967.

- MORRIS, C.E.; LORETAN, P.A.; HILL, W.A.; BONSI, C.K. Experimental hydroponic system for growing sweet potato plants. **HortScience**, Alexandria, v.23, n.5, p.828, Oct. 1988.
- MORTLEY, D.G.; BONSI, C.K.; LORETAN, P.A.; MORRIS, C.E.; HILL, W.A.; OGBUEHI, C.R. Evaluation of sweet potato genotypes for adaptability to hydroponic systems. **Crop Science**, Madison, v.31, n.3, p.845-847, May-June 1991.
- MOTTA, J.S.; FUKUDA, W.M.G.; SOUZA, L.C.B.; COSTA, Z.M.F. **A farinha da folha de mandioca: uma alternativa como complemento alimentar**. Cruz das Almas: EMBRAPA/CNPMPF, 1994. 2p. (EMBRAPA/ CNPMPF. Mandioca em foco, n.4).
- MÜLLER-RÖBER, B.; SONNEWALD, U.; WILMITZER, L. Inhibition of the ADP-glucose pyrophosphorilase in transgenic potatoes leads to sugar-storing tubers and influences tuber formation and expression of tuber storage protein genes. **The European Molecular Biology Organization Journal**, Oxford, v.11, n.4, p.1229-1238, Apr. 1992.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, n.3, p.473-497, Sept., 1962.
- NAIR, N.G.; KARTHA, K.K.; GAMBORG, O.L. Effect of growth regulators on plant regeneration from shoot apical meristems of cassava (*Manihot esculenta* Crantz.) and on the culture of internodes *in vitro*. **Zeitschrift für Pflanzenphysiologie**, Stuttgart, v.95, p.51-56, 1979.
- NAIR, T.V.R.; SINHA, S.K. Photoperiodic effects on tuber development in *Manihot esculenta* Crantz. **Indian Journal of Experimental Biology**, New Delhi, v.6, n.1, p.66, Jan. 1968.
- NASSAR, N.M.A.; COSTA, C.P. Tuber formation and protein content in some wild cassava (Mandioca) species native of central Brazil. **Experientia**, Basel, v.33, p.1304-1305, 1977.
- NORMANHA, E.D. O plantio da mandioca, In: EMBRAPA/CNPMPF. **I Curso intensivo nacional de mandioca**. Cruz das Almas: EMBRAPA/CNPMPF, 1976. p.190-197.
- OLIVEIRA, L.E.M. **Crescimento e comportamento nutricional de plantas de mandioca submetidas a diferentes níveis de alumínio** Viçosa: UFV, 1979, 38 p. (Tese - Mestrado em Fisiologia Vegetal).

- OWEN, H.R.; WENGERD, D.; MILLER, A.R. Culture medium pH is influenced by basal medium, carbohydrate source, gelling agent, activated charcoal, and medium storage method. **Plant Cell Reports**, Berlin, v.10, p.583-586, 1991.
- PAIVA, E.; LISTER, R.M.; PARK, W.D. Induction and accumulation of major tuber proteins of potato in stems and petioles. **Plant Physiology**, Maryland, v.71, n.1, p.161-168, Jan. 1983.
- PALIWAL, G.S.; KAVATHEKAR, A.K. Anatomy of vegetative food storage organs. **Acta Agronomica Academiae Scientiarum Hungaricae**, Budapest, v.20, n.3-4, p.261-270, 1971.
- PALMER, C.E.; BARKER, W.G. Influence of ethylene and kinetin on tuberization and enzyme activity in *Solanum tuberosum* L. stolons cultured *in vitro*. **Annals of Botany**, London, v.37, n.149, p.85-93, Jan. 1973.
- PALMER, C.E.; SMITH, O.E. Cytokinins and tuber initiation in the potato *Solanum tuberosum* L. **Nature**, London, v.221, n.18, p.279-280, Jan. 1969.
- PALMER, C.E.; SMITH, O.E. Effect of kinetin on tuber formation on isolated stolons of *Solanum tuberosum* L. cultured *in vitro*. **Plant and Cell Physiology**, Osaka, v.11, n.2, p.303-314, Mar. 1970.
- PARK, W.D.; BALCKWOOD, C.; MIGNERY, G.A.; HERMODSON, M.A.; LISTER, R.M. Analysis of the heterogeneity of the 40,000 molecular weight tuber glycoprotein of potatoes by immunological methods and by NH₂-terminal sequence analysis. **Plant Physiology**, Maryland, v.71, n.1, p.156-160, Jan. 1983.
- PARROT, F. Interaction de l'acide naphthalène acétique et des sels minéraux sur la croissance et la tubérisation de fragments de tiges de pomme de terre cultivées *in vitro*. **Comptes Rendus Academie des Séances de la Société de Biologie**, Paris, v.277, p.781-784, 1973.
- PELACHO, A.M.; MINGO-CASTEL, A.M. Effects of photoperiod on kinetin-induced tuberization of isolated potato stolons cultured *in vitro*. **America Potato Journal**, Orono, v.68, n.8, p.533-541, Aug. 1991.
- PELACHO, A.M.; MINGO-CASTEL, A.M. Jasmonic acid induces tuberization of potato stolons cultured *in vitro*. **Plant Physiology**, Maryland, v.97, n.3, p.1253-1255, Nov. 1991.

- PEREIRA, C. **Botânica, taxonomia e organografia dos angiospermae, chaves para identificação de famílias.** Rio de Janeiro: Interamericana, 1980. 190 p.
- PEREIRA, M.F.A.; VÁLIO, I.F.M. Gibberellic acid and the inhibition of aerial tuberisation in *Solanum tuberosum* L. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v.2, n.1, p.41-47, 1984.
- PERR, R.V.; SCHIPPERS, B. Plant growth responses to bacterization with selected *Pseudomonas* spp. strains and rhizosphere microbial development in hydorponic cultures. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.35, n.4, p.456-463, Apr. 1988.
- PIERIK, R.L.M. ***In vitro* culture of higher plants.** Dordrecht: Martinus Nushioff, 1987. 394p.
- PINHEIRO, J.C.D.; ARAGÃO, R.G.M.; ALMEIDA, F.C.G.; ALMEIDA, J.L. Efeitos de reguladores de crescimento na regeneração de plântulas de mandioca 'in vitro'. **Revista Brasileira de Mandioca**, Cruz das Almas, v.8, n.1, p.73-78, 1989.
- PRANGE, R.K. Chlorophyll fluorescence *in vivo* as an indicator of water stress in potato leaves. **American Potato Journal**, Orono, v.63, n.6, p.325-333, June 1986.
- PRAT, S.; FROMMER, WB; HÖFGEN, R.; KEIL, M. et al. Gene expression during tuber development in potato plants. **Federation of European Biochemical Societies Letters**, Amsterdam, v.268, n.2, p.334-338, Aug. 1990.
- RACUSEN, D.; FOOTE, M. A major soluble glycoprotein of potato tubers. **Journal of Food Biochemistry**, Colorado, v.4, p.43-52, 1980.
- RAEMAKERS, C.J.J.M.; JACOBSEN, E.; VISSER, R.G.F. Cyclic somatic embriogenesis and plant transformation in cassava. In: ROCA, W. M.; THRO, A.M. (eds.). **Proceedings of the first international scientific meeting cassava biotechnology network.** Cali: CIAT, 1993. p.208-215.
- REEVE, R.M.; HAUTALA, E.; WEAVER, M.L. Anatomy and compositional variation within potatoes. I Developmental histology of the tuber. **American Potato Journal**, Orono, v.46, n.10, p.361-373, Oct. 1969.
- REIFSCHNEIDER, F.J. **Produção de batata.** Brasília: Linha Gráfica, 1987. 239p.

- REYNOLDS, M.P.; EWING, E.E. Effects of high air and soil temperature stress on growth and tuberization in *Solanum tuberosum*. *Annals of Botany*, London, v.64, n.3, p.241-247, Sept. 1989.
- RIBEIRO, M.C.M; FIGUEIREDO, L.F.A.; LOUREIRO, M.E.; CABRAL, G.B.; CARVALHO, L.J.C.B. Study on the induction of root tuber formation in cassava grown under *in vitro* culture and nutrient solution. In: The cassava biotechnology network proceedings of the second scientific meeting, 2, 1994, Indonésia. *Proceedings*. Cali: CIAT, 1995, v.2, p.795-803.
- ROCA, W.M.; HENRY, G.; ANGEL, F.; SARRIA, R. Biotechnology research applied to cassava improvement at the International Center of Tropical Agriculture (CIAT). *AgBiotechnology News and Information*, London, v.4, n.10, p.303-308, 1992.
- ROCA, W.M.; REYES, R.; BELTRÁN, J. Effect of various factors on minimal growth in tissue culture storage of cassava germoplasm. In: Symposium of the international society for tropical root crops, 6, 1983, Lima. *Proceedings*. Lima: CIP, 1984. p.441-447.
- ROCHA-SOSA, M.; SONNEWALD, U.; FROMMER, W.; STRATMANN, M.; SCELL, J.; WILLMITZER, L. Both developmental and metabolic signals activate the promoter of a class I patatin gene. *The European Molecular Biology Organization Journal*, Oxford, v. 8, n.1, p.23-29, Jan. 1989.
- ROSAHL, S.; SCHELL, J.; WILLMITZER, L. Expression of a tuber-specific storage protein in transgenic tobacco plants: demonstration of an esterase activity. *The European Molecular Biology Organization Journal*, Oxford, v.6, n.5, p.1155-1159, May 1987.
- ROSS, H.A.; DAVIES, H.V.; BURCH, L.R.; VIOLA, R.; McRAE, D. Development changes in carbohydrate content and sucrose degrading enzymes in tuberising stolons of potato (*Solanum tuberosum*). *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v.90, n.4, p.748-756, Apr. 1994.
- SALEHUZZAMAN, S.; BLEKER, T.; JACOBSEN, E.; VISSER, R.G.F. Cloning and characterization of starch biosynthetic genes of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). In: ROCA, W. M.; THRO, A.M. (eds.). *Proceedings of the first international scientific meeting cassava biotechnology network*. Cali: CIAT, 1993. p.229-233.
- SALEHUZZAMAN, S.; JACOBSEN, E.; VISSER, R.G.F. Expression patterns of two starch biosynthetic genes in *in vitro* cultured cassava plants and their induction by sugars. *Plant Science*, Limerick, v. 98, n.1, p.53-62, 1994.

- SALEHUZZAMAN, S.; JACOBSEN, E.; VISSER, R.G.F. Isolation and characterization of a cDNA encoding granule-bound starch synthase in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) and its antisense expression in potato. **Plant Molecular Biology**, Amsterdam, v.23, n.5, p.947-962, Dec. 1993.
- SALISBURY, F.B.; ROSS, C.W. **Plant Physiology**. 4.ed. Belmont: Publishy Company, 1992. 682p.
- SYSTEM ANALYSIS OF STATISTIC (SAS). User's guide. 40.ed. Cory: SAS Institute, v.2, 1990. 1685p.
- SASS, J.E. **Microtécnicas de vegetais**. São Paulo: USP. Tradução por Wilson Hoehne. 1943, 164 p.
- SCHÖPKE, C.; CHAVARRIAGA, P.; FAUQUET, C.; BEACHY, R.N. Cassava tissue culture and transformation: improvement of culture media and the effect of different antibiotics on cassava. In: ROCA, W. M.; THRO, A.M. (eds.). **Proceedings of the first international scientific meeting cassava biotechnology network**. Cali: CIAT, 1993. p.140-145.
- SCHULTZ, A.R. **Dicionário de Botânica**. Porto Alegre: Globo, 1973. 239p.
- 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.1, p.43-51, July. 1993.
- SHANMUGAM, A.; SHANMUGHAVELU, K.G. Influence of ethrel on growth and yield of tapioca. **Indian Journal of Plant Physiology**, v. 17, n. 1/2, p. 44-46, 1974.
- SHANN, J.R.; ADRIANO, D.C. The chronic exposure of selected crop species to boron aerosols. **Environmental and Experimental of Botany**, New York, v.28, n.4, p.289-299, Oct. 1988.
- SHEWRY, P.R.; CLOWES, A.; TATHAM, A.S.; BEECHING, J. Opportunities for manipulating the amount and composition of proteins in cassava tuberous roots. In: ROCA, W. M.; THRO, A.M. (eds.). **Proceedings of the first international scientific meeting cassava biotechnology network**. Cali: CIAT, 1993. p.251-254.
- SINHA, S.K. Further studies on the mechanism of tuberization in *Manihot esculenta*. **Indian Journal of Plant Physiology**, New Delhi, v.16, n.1/2, p.84-88, 1973.

- SLIMMON, T.; MACHADO, S.V.; CONFFIN, R. The effect of light on *in vitro* microtuberization of potato cultivars. **America Potato Journal**, Orono, v.66, n.12, p.843-848, Dec. 1989.
- SOARES, J.L. **Dicionário etimológico e circunstanciado de biologia**. São Paulo: Scipione, 1993, 534p.
- SONNEWALD, U.; VON SHAEWEN, A.; WILLMITZER, L. Subcellular manipulation of sucrose metabolism in transgenic plants. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.44, p.293-296, Jan. 1993.
- STASWICK, P.E. Storage proteins of vegetative plant tissues. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, California, v.45, p.303-322, 1994.
- STRASBURGER, E.; NOLL, F.; SCHENCK, H.; SCHIMPER, F.W. **Tratado de botânica**. 6.ed. Tradução por Oriol de Bolós, Barcelona: Marin, 1960. 638p. Título original: Lehrbuch der botanik für hochschulen.
- SUGIYAMA, T.; HASHIZUME, T. Cytokinins in developing tuberous roots of Sweet Potato. **Agricultural Biology and Chemistry**, Tokyo, v.53, n.1, p.49-52, Jan. 1989.
- TAKAHASHI, K.; FUJINO, K.; KIKUTA, Y.; KODA, Y. Expansion of potato cells in response to jasmonic acid. **Plant Science**, Limerick, v. 100, n.1, p.3-8, 1994.
- TEIXEIRA, D.M.C. **Influência do N, sacarose, BAP e idade da plântula sobre a minituberização de batata (*Solanum tuberosum* L. cv. Bintje) *in vitro***. Lavras: Esal, 1989. 55p. (Tese - Mestrado em Fitotecnia).
- TEIXEIRA, D.M.C.; PINTO, J.E.B.P. Minituberização da batata em diferentes níveis de N, sacarose e BAP. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, São Carlos, v.3, n.2, p.77-81, dez. 1991.
- TELES, F.F.F.; SALES FILHO, J.B.; SILVEIRA, A.J.; GOUVEIA, J.A.; REZENDE, J.L.M. Valor proteico de mandioca cultivada em Minas Gerais. **Revista Brasileira de Mandioca**, Cruz das Almas, v.2, n.1, p.65-68, 1983.
- THOMPSON, W.F. Physiological and molecular studies of light-regulated nuclear genes in higher plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, California, v. 42, p.423-466, 1991.

- TORREY, J.G.; LOOMIS, R.S. Auxin-cytokinin control of secondary vascular tissue formation in isolated roots of raphanus. **American Journal of Botany**, Columbus, v.54, n.9, p. 1098-1106, Oct. 1967.
- TORTORA, G.J.; CÍCERO, D.R.; PAMH, H.I. **Plant form and function - An introduction to plant science**. Toronto: The Macmillan, 1970. 562p.
- TURGEON, R. The sink-source transition in leaves. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, California, v.40, p.119-138, 1989.
- USHER, G. **A dictionary of botany**. London: Constable, 1966, 404p.
- VAN STADEN, J.; DIMALLA, G.G. Influence of ethylene on cytokinin pools in tuberizing potatoes. **Plant Science Letters**, Limerick, v.10, n.1, p. 19-23, 1977.
- VIÉGAS, A.P. **Estudo sobre a mandioca**. São Paulo: Instituto Agrônômico, 1976, 214 p.
- VINCE-PRUE, D. **Photoperiodism in plants**. London: McGraw-Hill, 1975. 444p.
- VISSER, R.G.F.; HERGERSBERG, F.R.; LEIJ, F.R.V.D; JACOBSEN, E.; WITHOLT, B.; FEENSTRA, W.J. Molecular cloning and partial characterization of the gene for granule-bound starch synthase from a wildtype and amylose-free potato (*Solanum tuberosum* L.). **Plant Science**, Limerick, v.64, n.2, p.185-192, 1989.
- VISSER, R.G.F.; VREUGDENHIL, D.; HENDRIKS, T.; JACOBSEN, E. Gene expression and carbohydrate content during stolon to tuber transition in potatoes (*Solanum tuberosum*). **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.90, n.2, p. 285-292, Feb. 1994.
- VREUGDENHIL, D.; BINDELS, P.; REINHOUD, P.; KLOCEK, J.; HENDRIKS, T. Use of the growth retardant tetcyclasis for potato tuber formation *in vitro*. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v.14, n.3, p.257-265, May 1994.
- VREUGDENHIL, D.; HARRO, J.; BOUWMEESTER, J. Effects of ethylene on tuberization in radish (*Raphanus sativus*). **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v.8, n.1, p.21-28, Mar. 1989.

- VREUGDENHIL, D.; STRUIK, P.C. An integrated view of the hormonal regulation of tuber formation in potato (*Solanum tuberosum* L.). **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.75, n.4, p.525-531, Apr. 1989.
- VREUGDENHIL, D.; VAN DIJK, W. Effects of ethylene on the tuberization of potato (*Solanum tuberosum*) cuttings. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v.8, n.1, p.31-39, Mar. 1989.
- WALKER, P.M.B. **Cambridge dictionary of biology**. Cambridge: Cambridge University Press, 1989. 324p.
- WARD, A.C.W.; DAVEY, M.R.; POWER, J.B.; COOPER-BLAND, S.; POWELL, W. An improved method involving hydroponic culture for the production of sexual hybrids between dihaploid *Solanum tuberosum* and diploid *S. microdontum*. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.43, n.255, p.1333-1338, Oct. 1992.
- WAREING, P.F.; JENNINGS, A.M.V. The hormonal control of tuberization in potato. In: SKOOG, F (ed.). **Plant Growth and Developmental**. Spring-Verlag: Berlin, 1980. p.293-300.
- WEATHERHEAD, M.A.; BURDON, J.; HENSHAW, G.G. Some effects of activated charcoal as an additive to plant tissue culture media. **Z. pflanzenphysiol.**, Stuttgart, v. 89, p.141-147, 1978.
- WENZLER, H.C.; MIGNERY, G.A.; FISHER, L.M.; PARK, W.D. Analysis of a chimeric class-I patatin-GUS gene in transgenic potato plants: High-level expression in tubers and sucrose-inducible expression in cultured leaf and stem explants. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v.12, n.1, p.41-50, Jan. 1989.
- WHEELER, R.M.; TIBBITTS, T.W. Growth and tuberization of potato (*Solanum tuberosum* L.) under continuous light. **Plant Physiology**, Maryland, v.80, n.3, p.801-804, Mar. 1986.
- WOOLFE, J.A. **Sweet potato an untapped food resource**. Cambridge: Cambridge University Press, 1992. 643p.
- YOSHIHARA, T.; MATSUURA, H.; ICHIHARA, A.; KIKUDA, Y.; KODA, Y. Tuber forming substances of jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.). In: KARSSSEN, C.M.; VAN LOON, L.C.; VREUGDENHIL, D. (eds.). **Progress in Plant Growth Regulation**. New York: Marcel Dekker, 1992. p.286-290.

LISTA DE APÊNDICES

Apêndice	Página
1 Metodologia para desidratação e inclusão com parafina.....	101
2 Metodologia para a coloração e montagem das lâminas permanentes.....	102
3 Meio de cultura de Murashige e Skoog (1962).....	103
4 Quadro de análise de variância para $y^* = \log (P/P-1)$, segundo o modelo dos efeitos principais da fonte de citocinina (BAP e DHZ) e concentração (0,4 e 0,04 μM), para a formação de tubérculos de plantas de mandioca, cv. MColl 22, <i>in vitro</i>	104
5 Quadro de análise de variância da proporção de plantas de mandioca, cv. MColl 22, <i>in vitro</i> , com raízes tuberiformes, P, segundo o modelo de efeito principal da concentração de citocinina utilizada	104
6 Quadro de análise de variância para altura das plantas segundo o modelo de efeitos principais das concentrações de sacarose e presença do carvão ativado para plantas de mandioca, cv. MColl 22, <i>in vitro</i>	104
7 Meio de Johnson <i>et al.</i> (1947, citado por Epstein, 1972).....	105

APÊNDICE 1 - Metodologia para desidratação e inclusão com parafina.

F A S E	E T A P A	DURAÇÕES
FIXAÇÃO	(tempo mínimo)	48-72 h
DESIDRATAÇÃO ETÍLICA	ÁLCOOL 50	2 h
	ÁLCOOL 60	2 h
	ÁLCOOL 70	2 h
	ÁLCOOL 80	2 h
	ÁLCOOL 90	2 h
	ÁLCOOL 100	2 h
	ÁLCOOL 100	2 h
	ÁLCOOL 100	2 h
	3 ÁLCOOL : 1	2 h
	1 ÁLCOOL : 1	2 h
	1 ÁLCOOL : 1	2 h
	XIOL PURO I	2 h
	XIOL PURO II	2 h
RASPAS DE PARAFINA	A FRIO ATÉ SATURAR	12 h
BANHOS EM PARAFINA	BANHO I	3 h
	BANHO II	3 h
	BANHO III	3 h
EMBLOCAMENTO		-
PREPARO DOS BLOCOS		-
CORTES		-

APÊNDICE 2 - Metodologia para coloração e montagem das lâminas permanentes.

F A S E	E T A P A	D U R A Ç Ã O
RETIRADA DA PARAFINA		
	Xilol Puro I	15 minutos
	Xilol Puro II	15 minutos
	Xilol Puro III	15 minutos
REHIDRATAÇÃO PARA COLORAÇÃO EM SAFRANINA		
	1 Xilol : 1 Álcool	1 minuto
	Álcool 100	1 minuto
	Álcool 90	1 minuto
	Álcool 80	1 minuto
	Álcool 70	1 minuto
	Álcool 60	1 minuto
	Álcool 50	1 minuto
SAFRANINA	1% de safranina em álcool 50	
		15 minutos
DESIDRATAÇÃO PARA COLORAÇÃO EM FAST - GREEN		
	Álcool 50	1 minuto
	Álcool 60	1 minuto
	Álcool 70	1 minuto
	Álcool 80	1 minuto
	Álcool 90	1 minuto
	Álcool 100	1 minuto
FAST - GREEN	0.5% em óleo de cravo, depois diluir álcool/xilol 1:1	
		1 minuto
	Álcool 100	1 minuto
	1 Xilol : 1 Álcool	1 minuto
	Xilol puro I	1 minuto
	Xilol puro II	1 minuto
	Xilol puro + óleo de cravo	15 minutos
Xilol puro + fenol	15 minutos	
	Xilol puro	
MONTAGEM EM ENTELAN		

APÊNDICE 3 - Meio de cultura de Murashige e Skoog (1962).

SOLUÇÃO ESTOQUE	MACRONUTRIENTES	CONCENTRAÇÃO	
		mM	mg/L
A	NH ₄ NO ₃	20,6	1650
A	KNO ₃	18,8	1900
A	MgSO ₄ .7H ₂ O	1,5	370
A	KH ₂ PO ₄	1,25	170
B	CaCl ₂ .2H ₂ O	3,0	440
	MICRONUTRIENTES	µM	mg/L
C	KI	5	0,83
C	H ₃ BO ₃	100	6,3
C	MnSO ₄ .4H ₂ O	100	22,3
C	ZnSO ₄ .7H ₂ O	30	8,6
C	NaMoO ₄ .2H ₂ O	1.0	0,25
C	CuSO ₄ .5H ₂ O	0.1	0,025
C	CoSO ₄ .6H ₂ O	0.1	0,025
D	Na ₂ EDTA	100	37,3
D	FeSO ₄ .7H ₂ O	100	27,8
	VITAMINAS		
E	Ácido nicotínico	1,0	0,008
E	Piridoxina	1,0	0,0049
E	Tiamina	10,0	0,030

APÊNDICE 4 - Quadro de análise de variância para $y^* = \log (P/P-1)$, segundo o modelo dos efeitos principais da fonte de citocinina (BAP e DHZ) e concentração (0,4 e 0,04 μM), para a formação de tubérculos de plantas de mandioca, cv. MColl 22, *in vitro*.

Fontes de variação	GL	Qui-quadrado	Probabilidade
Fontes de citocinina	1	0.98	0.3230
Concentração	1	8.33	0.0039
Resíduo	1	2.21	0.1374

y^* - log da relação (plantas tubérculo / plantas sem tubérculos)

APÊNDICE 5 - Quadro de análise de variância da proporção de plantas de mandioca, MColl 22, *in vitro*, com raízes tuberiformes, P, segundo o modelo de efeito principal da concentração de citocinina utilizada.

Fontes de variação	GL	Qui-quadrado	Probabilidade
Média	1	15.32	0.0001
Concentração	1	8.25	0.0041
Resíduo	2	3.19	0.2025

Y^* - log da relação (plantas com tubérculo / plantas sem tubérculos).

APÊNDICE 6 - Quadro de análise de variância da altura de plantas segundo o modelo de efeitos principais das concentrações de sacarose e presença do carvão ativado para plantas de mandioca, cv. MColl 22, *in vitro*.

Fontes de variação	GL	Qui-quadrado	Probabilidade
Média	1	1811.61	0.0000
Concentração Sacarose	1	119.44	0.0000
Carvão ativado	1	66.79	0.0000
Resíduo	1	1.13	0.2876

APÊNDICE 7 - Solução nutritiva segundo JOHNSON *et al.* 1947 (citado por Epstein, 1972).

Composto	Peso molecular	Concentração da solução estoque M	Concentração da solução estoque g/litro	Volume da solução estoque por litro da solução final ml	Elemento	Concentração final do elemento M	Concentração final do elemento ppm
MACRONUTRIENTES							
KNO ₃	101.10	1.00	101.10	6.0	N	16000	224
Ca(NO ₃) ₂ 4H ₂ O	236.16	1.00	236.16	4.0	K	6000	235
NH ₄ H ₂ PO ₄	115.08	1.00	115.08	2.0	Ca	4000	160
MgSO ₄ 7H ₂ O	246.49	1.00	246.49	1.0	P	2000	62
					S	1000	32
					Mg	1000	24
MICRONUTRIENTES*							
KCl	74.55	50	3.728		Cl	50	1.770
H ₃ BO ₃	61.84	25	1.546		B	25	0.270
MnSO ₄ H ₂ O	169.01	2.0	0.338	1.0	Mn	2.0	0.110
ZnSO ₄ 7H ₂ O	287.55	2.0	0.575		Zn	2.0	0.131
CuSO ₄ 5H ₂ O	249.71	0.5	0.125		Cu	0.5	0.032
H ₂ MoO ₄ (85%MoO ₃)	161.97	0.5	0.081		Mo	0.5	0.050
Fe-EDTA**	346.08	20	6.922	1.0	Fe	20	1.120

*Uma solução contém todos os micronutrientes exceto ferro, a concentração é em mM.

**Sal ferroso do ácido etilenodiamino tetracético diidrogenado.



УВАЖАЮЩИЙ РАБОТУ НАСТАВНИКА

Класс	Урок	Тема	Цели	Задачи	Методы	Средства	Формы	Оценки
10	1	Вводный урок	Знакомство с предметом	Определение целей и задач	Словесные, наглядные	Учебник, тетрадь	Лекция, беседа	5
10	2	История математики	Изучение истории	Определение значимости	Словесные, наглядные	Учебник, тетрадь	Лекция, беседа	5
10	3	Математика в жизни	Изучение роли	Определение значимости	Словесные, наглядные	Учебник, тетрадь	Лекция, беседа	5

МАТЕМАТИКА

Класс	Урок	Тема	Цели	Задачи	Методы	Средства	Формы	Оценки
10	4	Арифметика	Изучение арифметики	Определение значимости	Словесные, наглядные	Учебник, тетрадь	Лекция, беседа	5
10	5	Алгебра	Изучение алгебры	Определение значимости	Словесные, наглядные	Учебник, тетрадь	Лекция, беседа	5
10	6	Геометрия	Изучение геометрии	Определение значимости	Словесные, наглядные	Учебник, тетрадь	Лекция, беседа	5
10	7	Тригонометрия	Изучение тригонометрии	Определение значимости	Словесные, наглядные	Учебник, тетрадь	Лекция, беседа	5
10	8	Векторы	Изучение векторов	Определение значимости	Словесные, наглядные	Учебник, тетрадь	Лекция, беседа	5
10	9	Матрицы	Изучение матриц	Определение значимости	Словесные, наглядные	Учебник, тетрадь	Лекция, беседа	5
10	10	Комплексные числа	Изучение комплексных чисел	Определение значимости	Словесные, наглядные	Учебник, тетрадь	Лекция, беседа	5

ФИЗИКА

Класс	Урок	Тема	Цели	Задачи	Методы	Средства	Формы	Оценки
10	1	Вводный урок	Знакомство с предметом	Определение целей и задач	Словесные, наглядные	Учебник, тетрадь	Лекция, беседа	5
10	2	Механика	Изучение механики	Определение значимости	Словесные, наглядные	Учебник, тетрадь	Лекция, беседа	5
10	3	Термодинамика	Изучение термодинамики	Определение значимости	Словесные, наглядные	Учебник, тетрадь	Лекция, беседа	5
10	4	Электричество	Изучение электричества	Определение значимости	Словесные, наглядные	Учебник, тетрадь	Лекция, беседа	5
10	5	Магнетизм	Изучение магнетизма	Определение значимости	Словесные, наглядные	Учебник, тетрадь	Лекция, беседа	5
10	6	Оптика	Изучение оптики	Определение значимости	Словесные, наглядные	Учебник, тетрадь	Лекция, беседа	5
10	7	Акустика	Изучение акустики	Определение значимости	Словесные, наглядные	Учебник, тетрадь	Лекция, беседа	5
10	8	Световая волновая оптика	Изучение световой волновой оптики	Определение значимости	Словесные, наглядные	Учебник, тетрадь	Лекция, беседа	5
10	9	Световая квантовая оптика	Изучение световой квантовой оптики	Определение значимости	Словесные, наглядные	Учебник, тетрадь	Лекция, беседа	5
10	10	Современные проблемы физики	Изучение современных проблем	Определение значимости	Словесные, наглядные	Учебник, тетрадь	Лекция, беседа	5

Учитель: [Имя Фамилия]

