




JOÃO MAURÍCIO CAVALCANTE ALVES

CULTIVO IN VITRO DE BATATA DOCE

(*Ipomoea batatas* (L) Lam.)

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura de Lavras, como parte das exigências do Curso de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Fitotecnia, para obtenção do grau de MESTRE.



ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA DE LAVRAS

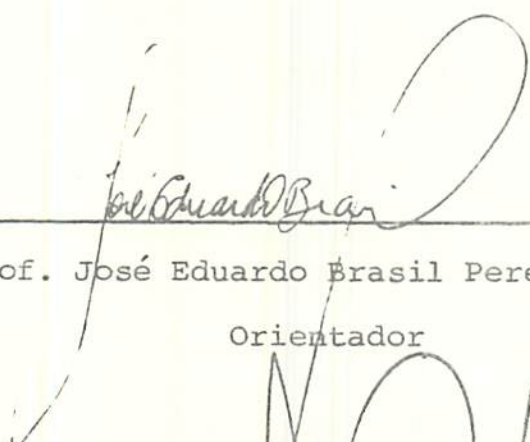
LAVRAS - MINAS GERAIS

1988




CULTIVO IN VITRO DE BATATA DOCE (Ipomoea batatas (L) Lam)

APROVADA:



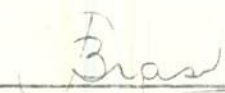
Prof. José Eduardo Brasil Pereira Pinto

Orientador



Prof. Moacir Pasqual

Co-Orientador



Prof. César Augusto Brasil Pereira Pinto

Aos familiares e amigos

OFEREÇO

À minha esposa Schirley
à minha filha Daniela
aos meus pais Murillo e Nilce

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À minha esposa Schirley e aos familiares, pelo carinho e apoio que me dedicaram durante o curso.

À Escola Superior de Agricultura de Lavras, pela oportunidade concedida para a realização do curso de Mestrado.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela ajuda financeira durante o curso de Mestrado.

Ao professor José Eduardo Brasil Pereira Pinto, pelos ensinamentos, eficiente orientação, dedicação, incentivo e amizade durante a condução desta pesquisa.

Ao professor Moacir Pasqual, pela co-orientação e sugestões recebidas.

Aos colegas de curso, especialmente ao Mauro Augusto de Paula, pelo auxílio na fase final desta pesquisa.

Aos professores dos diferentes Departamentos da ESAL, pelos ensinamentos recebidos.

Aos laboratoristas de Biotecnologia e aos funcionários da ESAL, pela ajuda no decorrer dos trabalhos.

A todos que direta ou indiretamente colaboraram para a
realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

JOÃO MAURÍCIO CAVALCANTE ALVES, filho de Murillo Esteves Alves e Nilce Cavalcante Alves, nasceu em Belo Horizonte, Minas Gerais, a 7 de abril de 1956.

Concluiu o curso superior na Escola Superior de Agricultura de Lavras, Minas Gerais, no ano de 1984, recebendo o título de Engenheiro Agrônomo.

Em março de 1985, iniciou o curso de pós-graduação em Agronomia a nível de Mestrado, na Escola Superior de Agricultura de Lavras.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE QUADROS	ix
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE ABREVIATURAS	xvii
INTRODUÇÃO	1
REVISÃO DE LITERATURA	3
CAPÍTULO I - Cultura <u>in vitro</u> de meristema de batata doce	10
Material e Métodos	10
. Cultivares	10
. Operação de remoção dos meristemas ...	12
. Meio de cultura e condições ambientais	14
Resultados e Discussão	17
Conclusões	32
CAPÍTULO II - Efeito da inibição correlativa na repica <u>gem</u> de plântulas de batata doce obtidas <u>in vitro</u>	33

	Página
Material e Métodos	33
Resultados e Discussão	36
Conclusões	50
 CAPÍTULO III - Efeito de fungos MVA na aclimação e crescimento de plântulas de batata doce micropropagadas <u>in vitro</u>	 51
Material e Métodos	51
Resultados e Discussão	54
Conclusões	68
 RESUMO	 69
 SUMMARY	 71
 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	 73

LISTA DE QUADROS

QUADRO		Página
1	Composição do meio de cultura de Murashige & Skoog (MS) modificado, com vitaminas, carboi - drato, ágar e aminoácido	15
2	Estádios de desenvolvimento de meristemas de batata doce, cultivar Coquinho, em diferentes concentrações de ANA e GA ₃ , com BAP na concen - tração de 0,50 mgL ⁻¹ , no decorrer de 9 semanas	20
3	Estádios de desenvolvimento de meristemas de batata doce, cultivar Coquinho, em diferentes concentrações de ANA e GA ₃ , com BAP na concen - tração de 1,00 mgL ⁻¹ , no decorrer de 9 semanas	21
4	Estádios de desenvolvimento de meristemas de batata doce, cultivar Coquinho, em diferentes concentrações de ANA e GA ₃ , com BAP na concen - tração de 2,00 mgL ⁻¹ , no decorrer de 9 semanas	22

QUADRO

Página

- | | | |
|---|--|----|
| 5 | Estádios de desenvolvimento de meristemas de batata doce, cultivar CNPH-003, em diferentes concentrações de ANA e GA ₃ , com BAP na concentração de 0,50 mgL ⁻¹ , no decorrer de 9 semanas | 23 |
| 6 | Estádios de desenvolvimento de meristemas de batata doce, cultivar CNPH-003, em diferentes concentrações de ANA e GA ₃ , com BAP na concentração de 1,00 mgL ⁻¹ , no decorrer de 9 semanas | 24 |
| 7 | Estádios de desenvolvimento de meristemas de batata doce, cultivar CNPH-003, em diferentes concentrações de ANA e GA ₃ , com BAP na concentração de 2,00 mgL ⁻¹ , no decorrer de 9 semanas | 25 |

LISTA DE FIGURAS

FIGURA		Página
1	Vista parcial das plantas de batata doce cultivadas em casa de vegetação, utilizadas como fonte de propágulos	11
2	Brotações de batata doce, contendo gemas apicais e laterais. À esquerda, cultivar Coquinho e à direita cultivar CNPH-003	13
3	Diferentes estádios de desenvolvimento <u>in vitro</u> de meristemas de batata doce	18
4	Calos formado a partir do meristema de batata doce, com aproximadamente 3 semanas de cultivo <u>in vitro</u>	26
5	Brotações a partir de calos de batata doce, após 4 semanas de incubação	27
6	Plântulas de batata doce regeneradas a partir da cultura de meristemas, com 5 semanas de cultivo <u>in vitro</u>	28

FIGURA

Página

- 7 Plântula de batata doce regenerada a partir da cultura de meristemas, com 6 semanas de cultivo in vitro 29
- 8 Ilustração de plântula de batata doce com aproximadamente 40 dias, obtida a partir do cultivo de meristema in vitro, subdividida em regiões basal, mediana e apical 35
- 9 Histograma do desenvolvimento da gema in vitro, comparando as cultivares CNPH-003 e Coquinho durante 5 semanas após a repicagem, em meio MS sem reguladores de crescimento ou com presença de BAP a $0,01 \text{ mgL}^{-1}$ 37
- 10 Histograma do desenvolvimento da gema comparando as cultivares CNPH-003 e Coquinho no decorrer de 5 semanas in vitro após a repicagem, em meio MS + BAP $0,10 \text{ mgL}^{-1}$. A legenda se refere à ocorrência de calogênese 38
- 11 Histograma do desenvolvimento da gema comparando as cultivares CNPH-003 e Coquinho no decorrer de 5 semanas in vitro após a repicagem, em meio MS + BAP $0,50 \text{ mgL}^{-1}$. A legenda se refere à ocorrência de calogênese 39

FIGURA

Página

- 12 Histograma do desenvolvimento da gema in vitro, comparando as cultivares CNPH-003 e Coquinho durante 5 semanas após a repicagem, em meio MS + ANA $0,01 \text{ mgL}^{-1}$ 40
- 13 Histograma do desenvolvimento da gema in vitro, comparando as cultivares CNPH-003 e Coquinho durante 5 semanas após a repicagem, em meio MS + ANA $0,01 \text{ mgL}^{-1}$ + BAP $0,01 \text{ mgL}^{-1}$ 41
- 14 Histograma do desenvolvimento da gema comparando as cultivares CNPH-003 e Coquinho no decorrer de 5 semanas in vitro após a repicagem, em meio MS + ANA $0,01 \text{ mgL}^{-1}$ + BAP $0,10 \text{ mgL}^{-1}$. A legenda se refere à ocorrência de calogênese . 42
- 15 Histograma do desenvolvimento da gema comparando as cultivares CNPH-003 e Coquinho no decorrer de 5 semanas in vitro após a repicagem, em meio MS + ANA $0,01 \text{ mgL}^{-1}$ + BAP $0,50 \text{ mgL}^{-1}$. A legenda se refere à ocorrência de calogênese . 43
- 16 Histograma do desenvolvimento da gema comparando as cultivares CNPH-003 e Coquinho no decorrer de 5 semanas in vitro após a repicagem, em meio MS + ANA $0,10 \text{ mgL}^{-1}$ na ausência de BAP e com BAP $0,01 \text{ mgL}^{-1}$. A legenda se refere à ocorrência de calogênese 44

FIGURA

- 17 Histograma do desenvolvimento da gema comparando as cultivares CNPH-003 e Coquinho no decorrer de 5 semanas in vitro após a repicagem, em meio MS + ANA $0,10 \text{ mgL}^{-1}$ e com BAP a $0,10 \text{ mgL}^{-1}$ e $0,50 \text{ mgL}^{-1}$. A legenda se refere à ocorrência de calogênese 45
- 18 Histograma do desenvolvimento da gema comparando as cultivares CNPH-003 e Coquinho no decorrer de 5 semanas in vitro após a repicagem, em meio MS + ANA $0,50 \text{ mgL}^{-1}$ na ausência de BAP e com BAP a $0,01$; $0,10$ e $0,50 \text{ mgL}^{-1}$. A legenda se refere à ocorrência de calogênese 46
- 19 Histograma do desenvolvimento da gema comparando as cultivares CNPH-003 e Coquinho no decorrer de 5 semanas in vitro após a repicagem, em meio MS + ANA $1,00 \text{ mgL}^{-1}$ na ausência de BAP e com BAP a $0,01$; $0,10$ e $0,50 \text{ mgL}^{-1}$. A legenda se refere à ocorrência de calogênese 47
- 20 Aclimação em casa de vegetação de plântulas de batata doce micropropagadas in vitro e inoculadas com fungos MVA, aos 20 dias pós plantio 53

FIGURA		Página
21	Crescimento de plântulas de batata doce da cultivar Coquinho, com 60 dias após o transplante, inoculadas com os fungos MVA <u>Scutellospora heterogama</u> (SHTR), <u>Gigaspora margarita</u> (GMRG), <u>Glomus clarum</u> (LCLR) e não inoculadas (NI),....	55
22	Crescimento de plântulas de batata doce da cultivar CNPH-003, com 60 dias após o transplante, inoculadas com os fungos MVA <u>Scutellospora heterogama</u> (SHTR), <u>Gigaspora margarita</u> (GMRG), <u>Glomus clarum</u> (LCLR) e não inoculadas (NI)	56
23	Histograma do peso seco de parte aérea de plantas de batata doce, cultivar Coquinho, aos 60, 90, 120 e 180 dias após a inoculação com diferentes espécies de fungos MVA	57
24	Histograma do peso seco de parte aérea de plantas de batata doce, cultivar CNPH-003, aos 60, 90, 120 e 180 dias após a inoculação com diferentes espécies de fungos MVA	58
25	Histograma do peso seco de raízes de plantas de batata doce, cultivar Coquinho, aos 60, 90, 120 e 180 dias após a inoculação com diferentes espécies de fungos MVA	60

FIGURA

Página

26	Histograma do peso seco de raízes de plantas de batata doce, cultivar CNPH-003, aos 60, 90, 120 e 180 dias após a inoculação com diferentes espécies de fungos MVA	61
27	Taxas de colonização de raízes de batata doce, aos 60, 90, 120 e 180 dias após a inoculação com diferentes espécies de fungos MVA	63
28	Raiz de batata doce, cultivar CNPH-003, colonizada por <u>Scutellospora heterogama</u> (aumento 100x)	64
29	Células auxiliares de <u>Gigaspora margarita</u> em rizosfera de batata doce, cultivar Coquinho (aumento 200x)	65
30	Esporos de <u>Glomus clarum</u> em raízes de batata doce, cultivar CNPH-003 (aumento 100x)	66
31	Crescimento micelial de <u>Scutellospora heterogama</u> em raízes de batata doce, cultivar Coquinho, (aumento 100x)	67

LISTA DE ABREVIATURAS

MS	Murashige & Skoog (43)
ANA	Ácido naftaleno acético
AIA	Ácido indol -3-acético
2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
GA ₃	Ácido giberélico
BA	Benziladenina
BAP	6-Benzilaminopurina
K	Cinetina
2iP	N-Isopentenilaminopurina
Tween 20	Polioxietileno sorbitan monolanato
MVA	Micorriza vesículo arbuscular
GMRG	<u>Gigaspora margarita</u> (Becker & Hall)
SHTR	<u>Scutellospora heterogama</u> (Walker & Sanders)
LCLR	<u>Glomus clarum</u> (Nicolson & Schenk)
NI	Não inoculado
mgL ⁻¹	Miligrama por litro
ppm	Parte por milhão

INTRODUÇÃO

A batata doce (Ipomoea batatas (L) Lam) é uma Convolvulácea originária da América Tropical, sendo o centro de origem mais aceito o Noroeste da América do Sul, já sendo consumida pelos indígenas na era Pré-Colombiana (7, 49, 51).

A batata doce é planta de clima tropical ou subtropical, sendo também cultivada em regiões de clima temperado. A planta é rústica, seu cultivo é fácil, de alta tolerância à seca, tem ampla adaptação e baixo custo de produção. É muito popular, cultivada e apreciada em todo o país, sendo a quarta hortaliça mais consumida pela população brasileira e a principal hortaliça do nordeste. Seu rendimento médio nacional é bastante baixo, em torno de 9 t/ha, e a área cultivada no país tem diminuído nos últimos anos, segundo dados da Fundação IBGE (4, 5).

A batata doce apresenta boa fonte de energia, minerais e vitaminas C e do complexo B. Algumas cultivares são ricas em vitamina A. Pode ser consumida assada, cozida ou frita, e mesmo as ramas podem ser utilizadas na alimentação humana, sendo ricas em proteínas e vitaminas. Na indústria, as raízes são utilizadas no pre-

paro de doces enlatados, na extração de amido de alta qualidade, na produção de álcool carburante, ou na fabricação de farinha rica em vitaminas e proteínas. As raízes e ramas podem ser usadas na alimentação animal, principalmente de bovinos e suínos (7, 39, 51).

Sendo a batata doce uma planta tradicionalmente de propagação vegetativa, através de pedaços de ramas ou hastes, pode ocorrer uma degenerescência, geralmente decorrente do acúmulo de doenças, principalmente viroses, no material de propagação. É possível que a baixa produtividade nacional seja devida a perpetuação de doenças e elevados índices de vírus nas variedades. No Brasil, as principais viroses que atacam a cultura são o vírus do mosaico da batata doce (SPMV), que é amplamente encontrado em diversos locais e cultivares do país, e o vírus do enfezamento (19, 36, 37, 49, 56).

Neste contexto, tornam-se importantes o desenvolvimento de técnicas alternativas como a cultura de tecidos, que permite a erradicação de doenças através da cultura de meristemas, proporciona uma micropropagação dos clones desejáveis e facilita a troca e armazenamento de germoplasma, usando um mínimo espaço (9, 13, 21, 55).

Os objetivos do presente trabalho são:

- determinar uma metodologia para a regeneração de plantas in vitro a partir da cultura de meristemas;
- estudar o efeito da inibição correlativa na repicagem do material obtido in vitro;
- estudar a associação com fungos micorrízicos vesículo - arbusculares na aclimação e desenvolvimento de plântulas provenientes da cultura de tecidos.

REVISÃO DE LITERATURA

Os trabalhos pioneiros do cultivo in vitro de meristema de batata doce foram a obtenção de desenvolvimento de plântulas e a limpeza de viroses obtidas por ELLIOT (11) e MORI (40). A cultura de meristema é utilizada em batata doce principalmente com o objetivo de obtenção de plantas livres de vírus, visto a cultura ter propagação exclusivamente vegetativa. A efetividade da limpeza de viroses é devida à ausência de tecidos vasculares e rápido crescimento do tecido meristemático, o que impede a penetração de partículas virais (27, 29, 35), sendo que quanto menor for o tamanho do explante maior será a probabilidade de limpeza do material, como comprovaram LANGHANS et alii (28) e outros pesquisadores. A eliminação de partículas virais em batata doce pode ser conseguida com o cultivo de meristemas de 0,2 a 0,6 mm de comprimento em meio básico de MURASHIGE & SKOOG (43), suplementado com uma fonte de auxina e citocinina.

A limpeza do material pode ser comprovada com indexação a través de enxertia em planta indicadora susceptível ao vírus (Ipomoea setosa L.), como relata FRISON & NG (14). ALCONERO et alii(1)

descreveram o processo de indexação para viroses de batata doce, fazendo-se uma enxertia de borbulha do material a ser testado abaixo da região cotiledonar em seedlings com três semanas de idade da planta indicadora (Ipomoea setosa L.). Notou-se que, ao retirar as duas folhas basais da planta indicadora, aumentar a temperatura e fotoperíodo houve um adiantamento na expressão dos sintomas em 22 dias, não ocorrendo sintomas na planta indicadora quando o enxerto morreu em dois dias. Pode-se melhorar a eficiência na limpeza de viroses, conjugando-se técnicas de cultura de meristema com a temo terapia (23, 46), adiantando-se o crescimento da planta e não dando boas condições de desenvolvimento ao vírus, como relata CHANDLER & HAQUE (9) que trataram plantas doadoras de propágulos a 35°C por 14 dias com este fim.

Aumentos na produção no campo podem ser resultados da limpeza de viroses, segundo LUO (35), que obteve 50% de plantas livres de vírus utilizando ápices de 0,5 mm de comprimento em meio MS (43) suplementado com BA, AIA, GA₃. No campo estas plantas proporcionaram um aumento médio de cerca de 30% na produção, quando comparadas com as propagadas tradicionalmente.

Além de ocorrer muita variação no tamanho do explante utilizado, pequenas variações ou modificações nos meios de cultura são relatadas como sendo causa do sucesso ou do fracasso da cultura, segundo LOVE & RHODES (34), que sugerem um aumento no teor de sacarose no meio MS (43) de 3% para 5%. Como resultado notaram uma maior sobrevivência e percentagem de regeneração de meristemas. Quanto aos reguladores de crescimento, observaram melhores respostas utilizando-se ANA do que AIA, e pequenas diferenças entre o BA

e 2iP. A melhor relação observada foi de $0,03 \text{ mgL}^{-1}$ de ANA para $0,3 \text{ mgL}^{-1}$ de BA, ocorrendo alguma variação de acordo com o genótipo. Uma forte relação entre o tamanho do explante utilizado e a composição do meio foi também comprovada por NIELSEN (44), que cultivou ápices caulinares de 0,4 a 1,0 mm de comprimento com duas a quatro folhas primordiais, conseguindo obter plântulas com duas a três folhas em três a dez meses. Estas não apresentavam sintomas de viroses em observações sintomatológicas posteriores. NOME & SALVADORES (45) notaram ainda que, quando o explante era acompanhado de primórdios foliares, a percentagem de plântulas diferenciadas foi maior. Usaram meio MS (43) complementado com 1 ppm de ANA e 1 ppm de cinetina, obtendo-se as plântulas a partir de meristemas em 60 a 90 dias, embora em pouca porcentagem (8,5%).

A maioria dos trabalhos com cultura de tecidos em batata doce começa com o estabelecimento de calos, um tecido com células diferenciadas, porém desorganizado. Para a formação dos calos, vários meios de cultura têm sido estudados por muitos pesquisadores (15, 30, 34, 38, 52, 57), tendo-se ligeira preferência para o de MURASHIGE & SKOOG (43) e suas modificações, conforme relata HENDERSON et alii (20).

Como explante inicial tem-se usado secções do pecíolo, de folhas, de caule, de raízes, além de ápices caulinares, gemas axilares e anteras, como demonstraram os trabalhos de vários autores (13, 18, 19, 32, 60, 61). A obtenção de calos foi conseguida facilmente tanto em meio WHITE (62) como MS(43), utilizando-se 2,4 D e água de côco, apresentando rápido crescimento e podendo ser subcultivado com igual facilidade, segundo ANTONI & FOLQUER (3), que po-

rém não obtiveram regenerações de raízes e brotações. JARRET et alii (26) partindo de ápices caulinares em meio MS (43) suplementado com $0,1 \text{ mgL}^{-1}$ de 2,4 D, observaram a iniciação da formação de calos em dez dias. Estes quando transferidos para meio sem hormônios, 30 dias após o início da cultura, formaram embriões somáticos que germinaram em meio contendo metade da concentração de sais de MS, produzindo plantas normais.

A partir de segmentos de folhas colocadas em meio MS suplementado com 2 mgL^{-1} de 2,4 D, LIU & CANTLIFFE (32) notaram que a superfície abaxial formou calos mais embriogênicos comparado com a superfície adaxial, e que explantes foliares formaram mais calos que explantes de gemas apicais e laterais, caule e raiz. LITZ & CONOVER (31) usando gemas laterais como explante inicial, notaram maior regeneração de brotação a partir do calos quando comparado com o uso de meristemas apicais. O meio MS suplementado com IAA em diversas concentrações estimulou a formação de calos, e em meio contendo BA houve a regeneração de brotações, sendo estas respostas variáveis de acordo com a cultivar em questão. Notaram, também, um crescimento inicial muito rápido do calos, que foi inibido com a adição de 10 gL^{-1} de carvão ativado ao meio de cultura.

Estudando o sistema radicular obtido in vitro a partir de vários explantes, SIHACHAKR & OSSE (54) observaram um grande polimorfismo radicular, com três tipos distintos de raízes, sendo o primeiro tipo com geotropismo positivo, o segundo com geotropismo negativo e o terceiro com características de ambos os tipos. Foram encontradas modificações no cilindro vascular, córtex e no periciclo, notando-se nestes dois últimos tecidos a acumulação de reservas.

Partindo de secções de raízes de aproximadamente dois a três milímetros colocadas em meio MS, HWANG et alii (24) obtiveram diferentes respostas quanto ao local da raiz que forneceu o explante inicial. Discos da parte central da raiz desenvolveram abundante calos contendo centros meristemáticos, com notada polaridade na formação de brotos e raízes, embora secções da parte mais externa da raiz tenham sido mais efetivas na formação de estruturas organizadas. A idade das raízes doadoras de explantes também influenciou as respostas obtidas, pois citocininas endógenas são ativas com o armazenamento das raízes e atuam na iniciação de raízes e parte aérea, sendo que os explantes de raízes frescas formaram em culturas estruturas mais organizadas do que as raízes armazenadas. O desenvolvimento de somente uma plântula em cada calos pressupõe que esta inibe o desenvolvimento de outras. Em todos os parâmetros avaliados foram observadas diferentes respostas entre as variedades estudadas.

Características do calos como coloração também variam de acordo com a cultivar, como observaram ANTONI & FOLQUER (3), que ainda ressaltam a possibilidade de ocorrência de mutação espontânea ou individualizada, importantes na obtenção de novas variedades.

CARSWELL & LOCY (8) encontraram o melhor desenvolvimento de calos com uma relação entre auxina (ANA) e citocinina (BA) de 1:10, e o aparecimento de brotações facilitado na relação de 1:0,1 (mgL^{-1}). As brotações foram enraizadas em meio sem reguladores de crescimento desenvolvendo plantas completas. Utilizaram como explante secções do caule, folha e raiz.

O crescimento de calos de batata doce in vitro além de ser influenciado pelo carvão ativado, LITZ & CONOVER (31), pode ser controlado através do pH do meio, que entre 6,0 e 6,25 proporciona maior crescimento comparado com o pH entre 5,1 e 5,3. Altas concentrações de sacarose, por volta de 200 g por litro, causam diminuição do crescimento, segundo TSAI & LIN (60). As condições ambientais da sala de crescimento também são importantes para o sucesso do cultivo in vitro. MURASHIGE (42) e FOSSARD (12) estudando o efeito da luz e temperatura no desenvolvimento das plântulas, encontraram que, temperaturas variando entre 20 e 25°C submetidas a luz fluorescente com intensidade de 2000 a 4000 lux num fotoperíodo de 16 horas, parecem ser as condições ideais para se obter um bom desenvolvimento das plantas em geral.

Comparando os métodos de propagação convencional com a cultura de tecidos, ALKALIFA & CHAMBLISS (2) notaram grande variação nas respostas de acordo com as variedades, sendo que a propagação convencional proporcionou a obtenção de melhores produções e menor percentagem de raízes fora do padrão em duas das três variedades estudadas. Também observaram que plantas propagadas através da cultura de tecido apresentaram maior taxa de anomalias morfológicas e mutações quando comparadas com o método tradicional.

A multiplicação clonal rápida foi conseguida por SIHA - CHAKR (53) que utilizando como explante inicial um simples nó obtve alta taxa de multiplicação através de repicagens sucessivas. Fez também estudos morfogênicos, observando alguma tuberização in vitro a partir de explantes originados de limbo foliar, sendo a tuberização inibitória à formação de brotações.

O intercâmbio de germoplasma é grandemente facilitado pela cultura de tecidos (9, 13, 21, 23). A técnica permite a obtenção de mini tubérculos isentos de viroses, que resistem o transporte a longas distâncias, como reporta o ASIAN VEGETABLE RESEARCH AND DEVELOPMENT CENTER (55), além de proporcionar um aumento do número de amostras distribuídas pelo centro de 130 no ano de 1983 para 13.000 em 1985.

A maioria das pesquisas envolvendo cultura de tecidos com batata doce é pouco detalhada no que se refere à fase de transplante e aclimação (31, 44, 18). NOME & SALVADORES (45) citam nessa fase o uso de copos plásticos contendo areia esterilizada, sendo as mudas regadas com solução de Hoagland diluída na proporção de 1/10 e cobertas com recipientes de vidro, com posterior transplante para solo esterilizado.

A literatura tem mostrado que as associações micorrízicas do tipo vesículo-arbusculares, além de promoverem melhor crescimento, nutrição e produção das plantas inoculadas (LOPES et alii, 33) pode aumentar a resistência dessas a estresse de ambiente no transplante. No caso de batata doce, alguns trabalhos têm mostrado respostas positivas quanto ao crescimento e desenvolvimento de mudas micorrizadas CUSHMAN et alii (10) e PATERSON et alii (47). No entanto, essas mudas foram obtidas de forma tradicional, ou seja in vivo, não havendo relatos da influência da micorrização em plântulas de batata doce obtidas in vitro, especialmente na fase de aclimação.

CAPÍTULO I

"CULTURA DE MERISTEMA DE BATATA DOCE"

O presente trabalho foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos do Departamento de Agricultura da Escola Superior de Agricultura de Lavras, Minas Gerais.

Material e Métodos

Cultivares

- Nos testes desenvolvidos nesta pesquisa foram utilizadas as cultivares CNPH 003 e Coquinho, provenientes do Centro Nacional de Pesquisas de Hortaliças (CNPH) - EMBRAPA, no Distrito Federal.

As ramas foram plantadas em casa de vegetação (Fig. 1) em vasos (5 kg), contendo mistura de terra e composto orgânico, com adubação normal de plantio, conforme MIRANDA et alii (39).

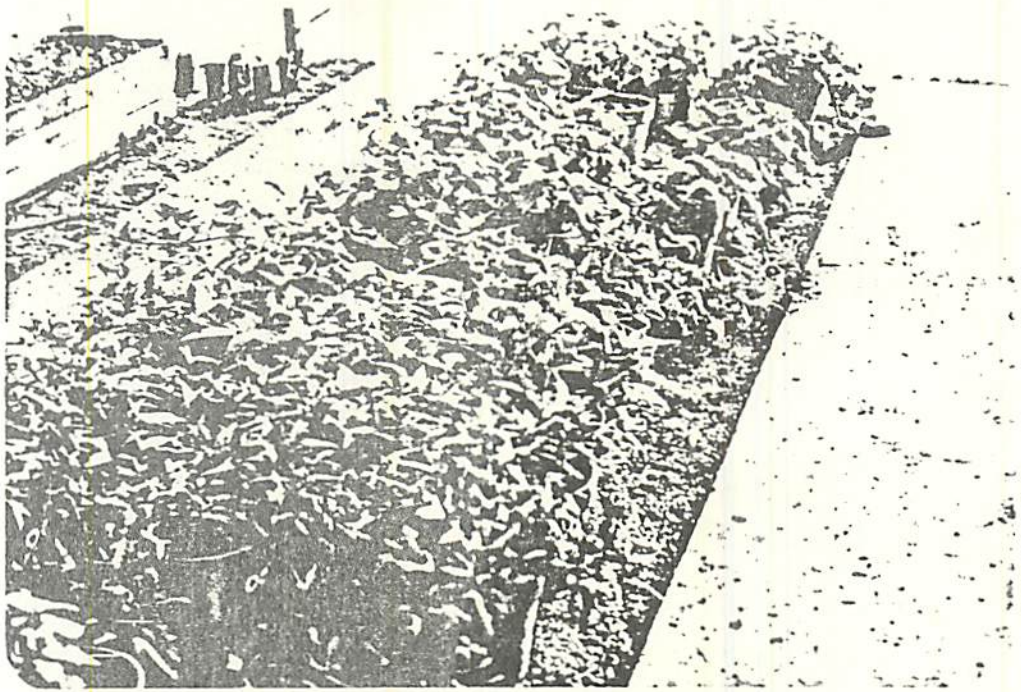


FIGURA 1 - Vista parcial das plantas de batata doce cultivadas em casa de vegetação, utilizadas como fonte de propágulos.

Operação de remoção dos meristemas

- Quando as cultivares apresentavam um bom desenvolvimento vegetativo, foram removidas as partes apicais das ramas em crescimento. Estas brotações com aproximadamente 2 cm de comprimento (Fig. 2) contendo gemas apical e laterais, foram devidamente acondicionadas em placas de Petri umedecidas e levadas para o laboratório, onde sofreram desinfestação. Esta desinfestação consistiu de 3 etapas. Inicialmente os propágulos foram envoltos em gase e lavados em água corrente durante 15 minutos. Em seguida foram imersos em solução de álcool etílico a 70% durante 1 minuto. Logo após foram transferidos para uma solução comercial de hipoclorito de sódio a 1% com 2 gotas de espalhante adesivo Tween 20 por 100 mL de solução, onde permaneceram por um período de 20 minutos. Por fim, foi feita a enxaguagem por 4 vezes em água destilada autoclavada para a remoção do desinfectante, na câmara de fluxo laminar.

- A operação de remoção dos meristemas foi realizada em uma câmara de fluxo laminar previamente esterilizada com álcool 70%, em placa de Petri com papel filtro umedecido e autoclavada, com o auxílio de uma lupa estereoscópica com aumento de até 40 vezes, utilizando-se uma pinça de ponta média, estiletes e bisturis cirúrgicos. Todo material utilizado durante a operação foi previamente autoclavado a 121°C e 1,2 atmosferas por 20 minutos. As pequenas folhas que envolvem a porção terminal da rama e gemas laterais foram retiradas cuidadosamente, até se localizar os meristemas envoltos pelos primórdios foliares. Após a remoção dos primórdios foliares, foi realizado o corte do meristema, utilizando-se

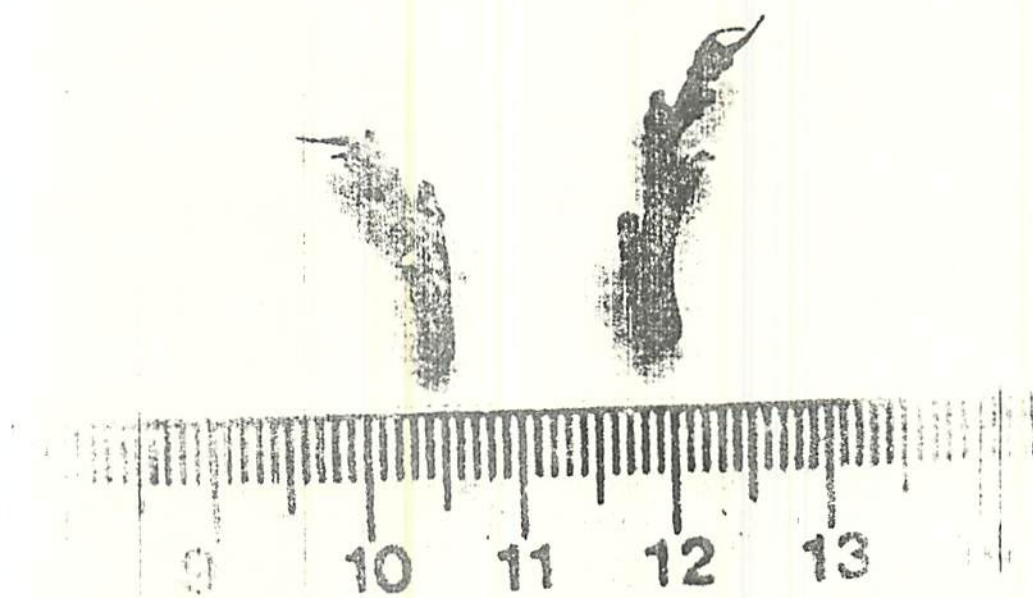


FIGURA 2 - Brotações de batata doce, contendo gemas apicais e laterais. À esquerda, cultivar Coquinho e à direita cultivar CNPH-003.

sempre uma lâmina que não havia tido contato com o propágulo, com a finalidade de evitar a disseminação de patógenos. O tamanho dos meristemas isolados foi de aproximadamente 0,4 a 0,6 mm, e imediatamente após a sua remoção foram transferidos para tubos de ensaio (2,5 x 15 cm) contendo meio de cultura.

Meio de cultura e condições ambientais

- O meio nutritivo básico constituiu-se de macro e micro nutrientes de acordo com MURASHIGE & SKOOG (43), com os respectivos componentes e concentrações apresentadas no Quadro 1. Soluções estoques de todos os componentes do meio de cultura, vitaminas, aminoácidos e reguladores de crescimento, foram preparadas e armazenadas em geladeira a 4°C, exceto a sacarose e o ágar que foram pesados e adicionados no momento da preparação de cada meio. Baseado em observações feitas em ensaios preliminares à execução deste trabalho, notou-se que os meristemas na grande maioria morriam em meio de cultivo sem reguladores de crescimento, optando-se assim, pela não utilização do tratamento controle (testemunha). O meio de cultura básico foi suplementado pelos seguintes reguladores de crescimento, com as respectivas concentrações utilizadas: ANA a 0,05 e 0,10 mgL⁻¹; GA₃ a 1,00 e 5,00 mgL⁻¹; e BAP a 0,50, 1,00 e 2,00 mgL⁻¹. O pH de todos os meios foi ajustado para 5,7 ± 0,1, utilizando-se NaOH e/ou HCl em solução 0,1N. O ágar foi dissolvido separadamente por aquecimento e acrescido ao meio de cultura a 0,7% após o ajuste do pH.

QUADRO 1 - Composição do meio de cultura de Murashige & Skoog(MS) modificado, com vitaminas, carboidrato, ágar e aminoácido.

Solução estoque	Compostos	Concentração final do meio de cultura (mgL ⁻¹)
A	NH ₄ NO ₃	1.650,0
B	KNO ₃	1.900,0
	H ₃ BO ₃	6,2
	KH ₂ PO ₄	170,0
C	KI	0,83
	Na ₂ MoO ₄ .H ₂ O	0,25
	CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025
D	CaCl ₂ .2H ₂ O	440,0
	MgSO ₄ .7H ₂ O	370,0
	MnSO ₄ .4H ₂ O	22,3
E	ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025
F	Na ₂ EDTA	37,25
	FeSO ₄ .7H ₂ O	27,85
Vitaminas	Tiamina	0,5
	Piridoxina	0,5
	Ácido nicotínico	0,5
	Mio-inositol	100,0
Carboidrato	Sacarose	30.000,0
	Ágar	7.000,00
Aminoácido	Glicina	2,0

Posteriormente foram feitos ensaios com a finalidade de verificar o efeito de diferentes teores de sacarose (3%, 5% e 7%) de pH (5,0; 5,5 e 6,0) e presença ou não de carvão ativado a 1% no meio de cultura, utilizando-se o mesmo meio básico descrito anteriormente suplementado com $1,00 \text{ mgL}^{-1}$ de BAP; $0,05 \text{ mgL}^{-1}$ de ANA e $1,00 \text{ mgL}^{-1}$ de GA_3 .

Após o preparo foi feita a distribuição do meio de cultura em tubos de ensaio (10 a 15 mL por tubo), que em seguida foram fechados com tampas plásticas e autoclavados a 121°C e 1,2 atmosferas durante 20 minutos.

Após o isolamento dos meristemas, utilizando-se no mínimo dez meristemas para cada tratamento, os tubos de ensaio foram lacrados com parafilm, colocados em suportes e levados para a sala de crescimento sendo mantidos a uma temperatura de $25^\circ\text{C} \pm 3^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 16 horas luz/dia com intensidade luminosa de aproximadamente 3000 lux, empregando-se uma combinação de lâmpadas fluorescentes Gro - Lux e Branca Fria.

O desenvolvimento dos meristemas de cada cultivar foi avaliado semanalmente através de observações visuais, aplicando-se um sistema de notas onde: 0 = início do crescimento, 1 = formação de calos, 2 = calos em crescimento, 3 = início da diferenciação, 4 = formação de plântula e 5 = plântula completa.

Resultados e Discussão

Um fator que demonstrou ser fundamental para o cultivo in vitro de meristema de batata doce foi o estado de sanidade das plantas doadoras de propágulos ou plantas-mãe. Embora estivessem sendo conduzidas em casa de vegetação, sofreram infestação com insetos - pulgões e principalmente cochonilhas. Nesta ocasião a assepsia nos propágulos não se mostrou eficiente e o índice de contaminação com fungos e bactérias observado no material já preparado em incubação foi elevado, em torno de 90%. Após uma pulverização com óleo mineral 1% + omethoate 0,25% a assepsia mostrou-se eficaz e o índice de contaminação observado nos tubos contendo os meristemas isolados foi reduzido para menos de 10%. Observações semelhantes foram feitas por FRISON & NG (14), que relatam que quando as plantas-mães desenvolveram-se em melhores condições higiênicas, o índice de contaminação observado decresceu significativamente.

O processo de desenvolvimento do meristema in vitro teve estádios distintos, desde o início do estabelecimento de calos até a formação de plântulas completas com raízes e parte aérea (Fig. 3).

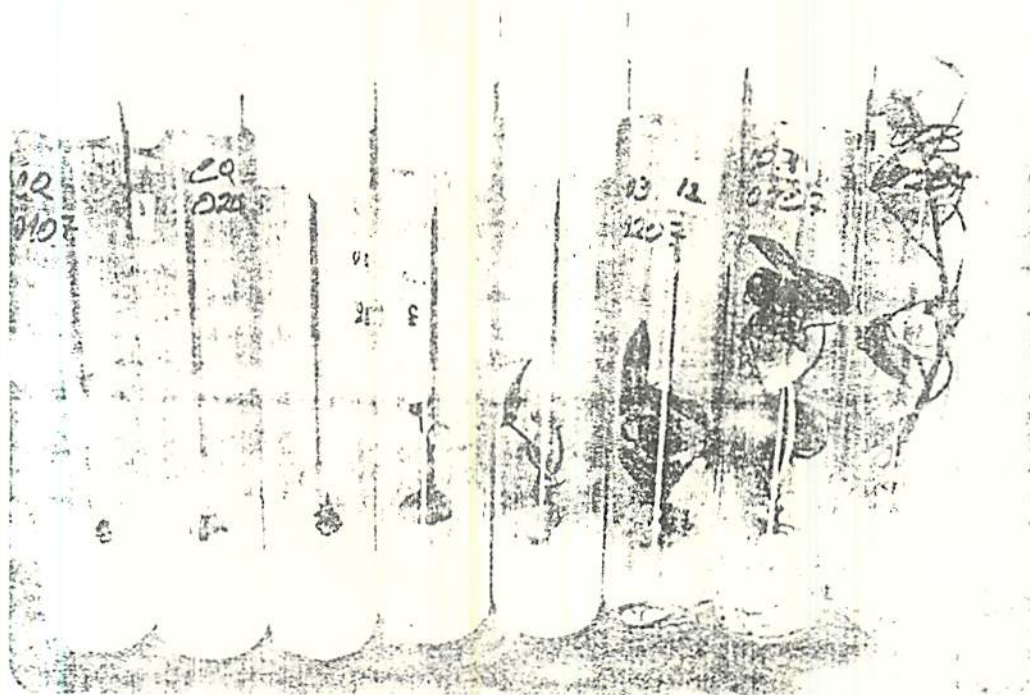


FIGURA 3 - Diferentes estádios de desenvolvimento in vitro de meristemas de batata doce.

O estabelecimento inicial do calos foi observado com uma semana após o isolamento dos meristemas, para as duas cultivares em estudo. Inicialmente foi observado um pequeno crescimento do meristema, juntamente com o começo da formação de calos ao redor deste, nas duas cultivares e para todos os tratamentos (Quadros 2 a 7). Com aproximadamente 3 semanas de incubação, já havia a formação de uma massa de calos verdes, de tonalidade variável (Fig. 4) em toda a volta dos meristemas, com o diâmetro variando entre 2 e 8 mm, dependendo da variedade e da combinação de reguladores de crescimento presentes no meio de cultivo empregado. Decorridos mais uma semana, já se notava o início de diferenciação dos tecidos, com o surgimento de brotações da parte aérea e raízes no calos (Fig. 5), e ao final de aproximadamente 2 meses de cultivo in vitro o meristema apresentava-se regenerado em plântula completa, com parte aérea bem desenvolvida e com o sistema radicular formado (Fig. 6 e 7). Ocorreram diferentes respostas no desenvolvimento in vitro, entre as variedades e entre os meios de cultura, o que concorda com as observações de vários autores (18, 26, 44, 45 e 57).

As respostas mais precoces, ou seja, a obtenção de plântulas completas ao final de aproximadamente 40 dias de cultivo foram observadas para a cultivar Coquinho no meio básico suplementado com $1,00 \text{ mgL}^{-1}$ de BAP; $0,05 \text{ mgL}^{-1}$ de ANA e $1,00 \text{ mgL}^{-1}$ de GA_3 (Quadro 3); enquanto que para a cultivar CNPH 003 as melhores respostas foram obtidas com $1,00 \text{ mgL}^{-1}$ de BAP; $0,10 \text{ mgL}^{-1}$ de ANA e $1,00 \text{ mgL}^{-1}$ de GA_3 no meio de cultivo (Quadro 6).

QUADRO 2 - Estádios de desenvolvimento do meristema de batata doce, cultivar Coquinho, em diferentes concentrações de ANA e GA₃, com BAP na concentração de 0,50 mgL⁻¹, no decorrer de 9 semanas.

ANA (mgL ⁻¹)	GA ₃	Semanas								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
0,05	1,00	0	1	2	2	3	4	4	5	5
	5,00	0	1	2	2	2	2	2	2	2
	1,00	0	1	2	2	2	3	4	4	5
0,10	5,00	0	1	2	3	3	4	4	5	5

Legenda: 0 = início do crescimento

1 = formação de calos

2 = calos em crescimento

3 = início da diferenciação

4 = plântula em crescimento

5 = plântula enraizada (completa)

QUADRO 3 - Estádios de desenvolvimento de meristemas de batata doce, cultivar Coquinho, em diferentes concentrações de ANA e GA₃, com BAP na concentração de 1,00 mgL⁻¹ no decorrer de 9 semanas.

ANA (mgL ⁻¹)	GA ₃		Semanas								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9		
0,05	0	1	2	3	4	5	5	5	5		
	0	1	2	3	3	4	5	5	5		
	0	1	2	3	3	4	4	5	5		
	0	1	2	3	3	4	5	5	5		

Legenda: 0 = início do crescimento
 1 = formação de calos
 2 = calos em crescimento
 3 = início da diferenciação
 4 = plântula em crescimento
 5 = plântula enraizada (completa)

QUADRO 4 - Estádios de desenvolvimento de meristemas de batata doce, cultivar Coquinho, em diferentes concentrações de ANA e GA₃, com BAP na concentração de 2,00 mgL⁻¹ no decorrer de 9 semanas.

ANA (mgL ⁻¹)	GA ₃	Semanas								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
0,05	1,00	0	1	2	3	3	4	4	4	4
	5,00	0	1	2	2	3	3	4	4	4
	1,00	0	1	1	1	2	2	2	2	2
0,10	5,00	0	1	1	1	2	2	2	2	2

Legenda: 0 = início do crescimento
 1 = formação de calos
 2 = calos em crescimento

3 = início da diferenciação
 4 = plântula em crescimento
 5 = plântula enraizada (completa)



QUADRO 5 - Estádios de desenvolvimento de meristemas de batata doce, cultivar CNPH 003, em diferentes concentrações de ANA e GA₃, com BAP na concentração de 0,50 mgL⁻¹ no decorrer de 9 semanas.

ANA (mgL ⁻¹)	GA ₃		Semanas								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9		
0,05	1,00	0	1	2	2	3	3	4	4	4	
	5,00	0	1	2	3	3	4	4	4	5	
	1,00	0	1	2	3	3	4	4	4	4	
0,10	5,00	0	1	2	3	3	4	4	4	5	

Legenda: 0 = início do crescimento

1 = formação de calos

2 = calos em crescimento

3 = início da diferenciação

4 = plântula em crescimento

5 = plântula enraizada (completa)

QUADRO 6 - Estádios de desenvolvimento de meristemas de batata doce, cultivar CNPH 003, em diferentes concentrações de ANA e GA₃, com BAP na concentração de 1,00 mgL⁻¹ no decorrer de 9 semanas.

ANA GA ₃ (mgL ⁻¹)	Semanas								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0,05	0	1	2	3	3	4	4	5	5
	0	1	2	3	3	4	4	5	5
0,10	0	1	2	3	4	5	5	5	5
	0	1	2	3	3	4	4	5	5

Legenda: 0 = início do crescimento

1 = formação de calos

2 = calos em crescimento

3 = início da diferenciação

4 = plântula

5 = plântula completa (enraizada)

QUADRO 7 - Estádios de desenvolvimento de meristemas de batata doce, cultivar CNPH 003, em diferentes concentrações de ANA e GA₃, com BAP na concentração de 2,00 mgL⁻¹ no decorrer de 9 semanas.

ANA (mgL ⁻¹)	GA ₃	Semanas								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
0,05	1,00	0	1	2	3	3	4	4	4	4
	5,00	0	1	2	2	3	4	4	4	4
0,10	1,00	0	1	1	1	2	2	2	2	2
	5,00	0	1	1	2	2	2	2	2	2

Legenda: 0 = início do crescimento

1 = formação de calos

2 = calos em crescimento

3 = início da diferenciação

4 = plântula

5 = plântula completa (enraizada)

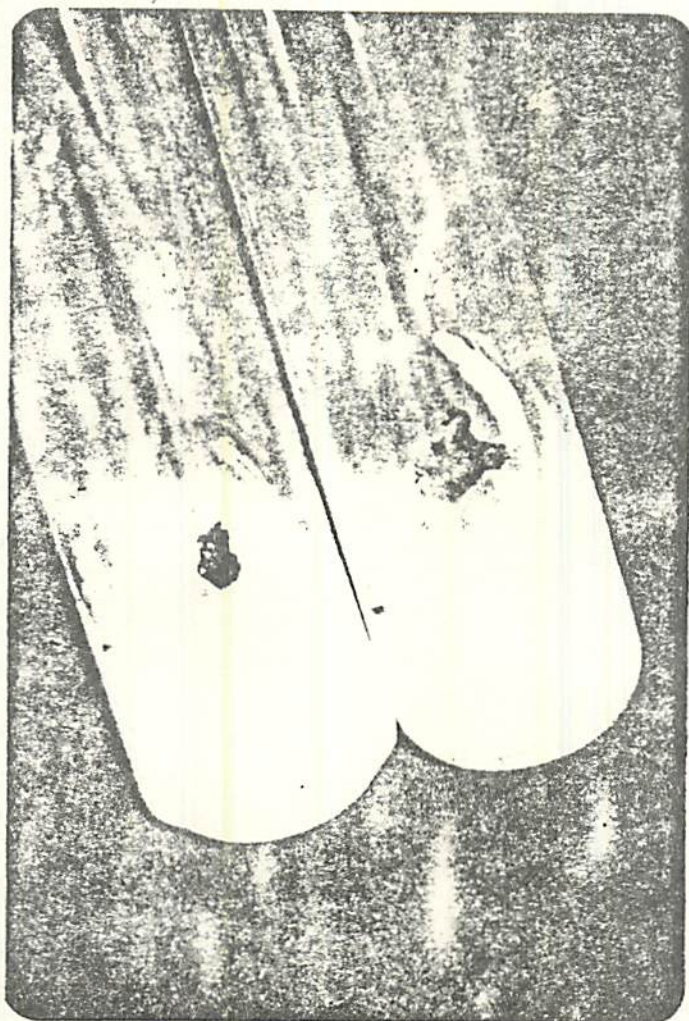


FIGURA 4 - Calos formados a partir do meristema de batata doce ,
com aproximadamente 3 semanas de cultivo in vitro.

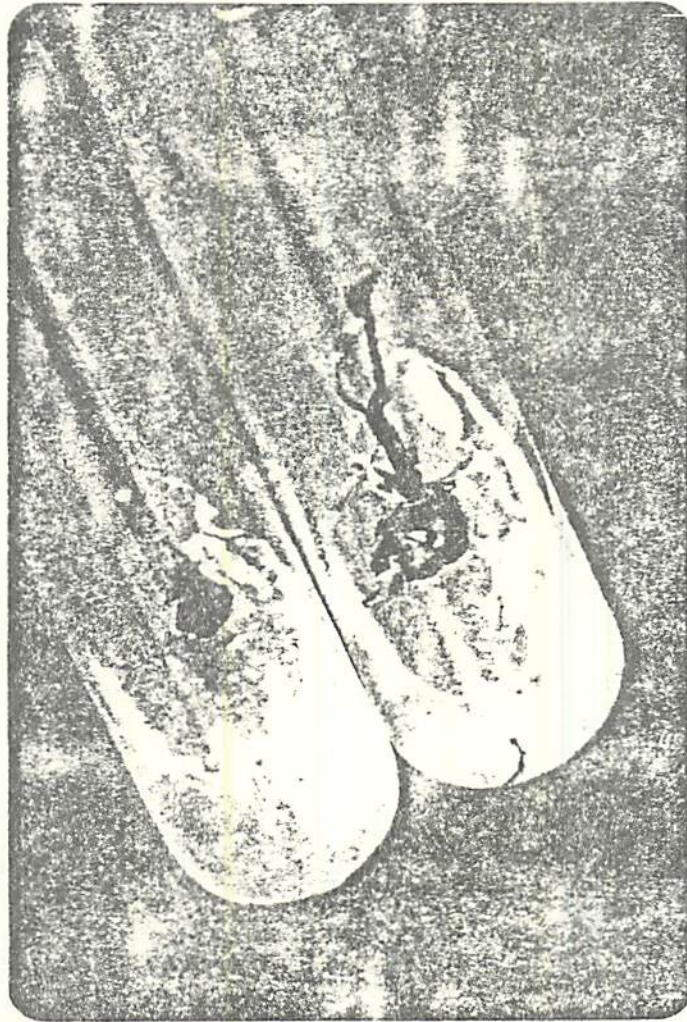


FIGURA 5 - Brotações a partir de calos de batata doce, após 4 semanas de incubação.

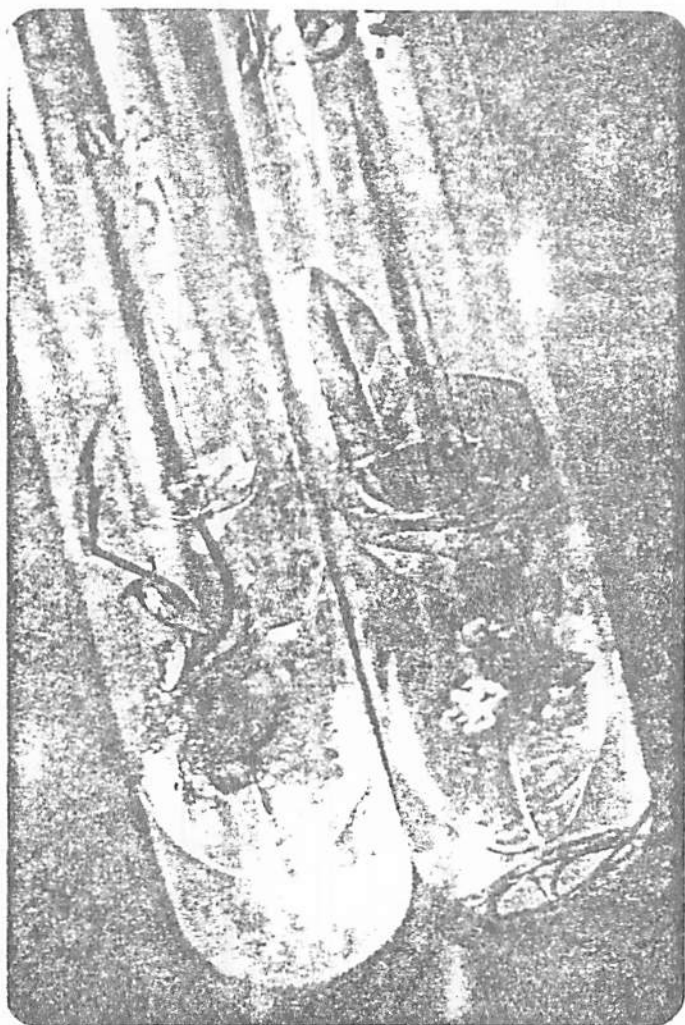


FIGURA 6 - Plântulas de batata doce regeneradas a partir da cultura de meristemas, com 5 semanas de cultivo in vitro.

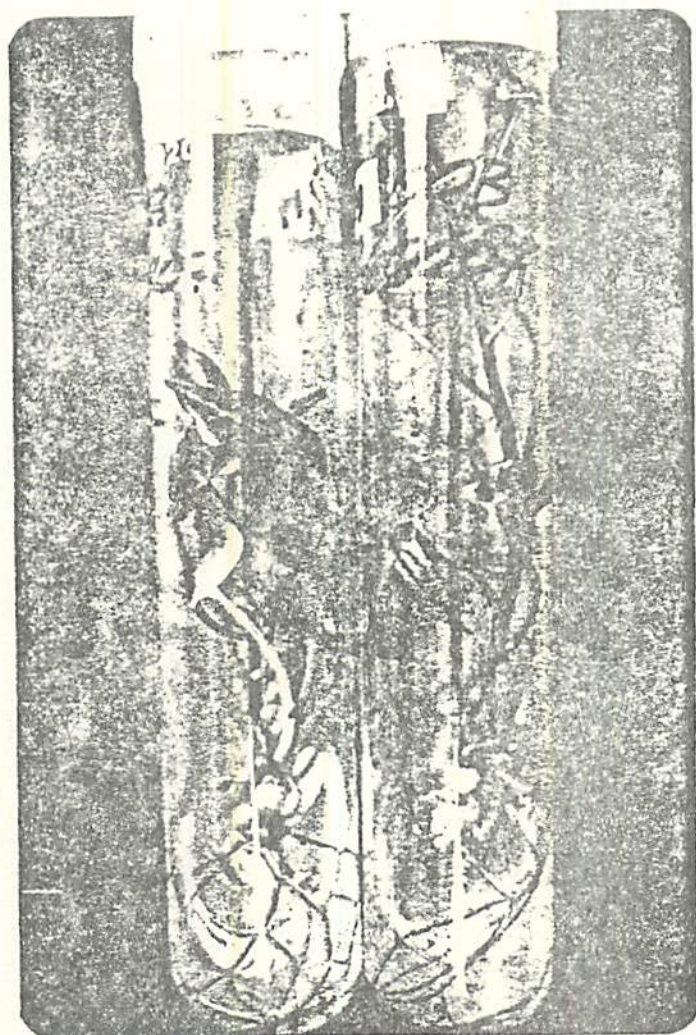


FIGURA 7 - Plântula de batata doce regenerada a partir da cultura de meristemas, com 6 semanas de cultivo in vitro.

Alguns tratamentos produziram plântulas completas uma semana após as melhores respostas, ou seja, ao final de aproximadamente 7 semanas do cultivo in vitro, sendo apenas observadas na cultivar Coquinho no meio básico suplementado com (em mgL^{-1}) BAP 1,00; ANA 0,05; GA_3 5,00 e com BAP 1,00; ANA 0,10 e GA_3 5,00 (Quadro 3). Para a cultivar CNPH-003 os meios suplementados com (em mgL^{-1}) BAP 1,00; ANA 0,05; GA_3 1,00; com BAP 1,00; ANA 0,05; GA_3 5,00 e com BAP 1,00; ANA 0,10; GA_3 5,00 regeneraram plântulas completas ao final de 8 semanas de incubação (Quadro 6), ao mesmo tempo que na cultivar Coquinho pelos tratamentos suplementados com (em mgL^{-1}) BAP 0,50; ANA 0,05; GA_3 1,00 com BAP 0,50; ANA 0,10; GA_3 5,00 (Quadro 2) e com BAP 1,00; ANA 0,10; GA_3 1,00 (Quadro 3).

Os demais tratamentos mostraram-se mais lentos na regeneração de plântulas, sendo que os com as maiores concentrações de reguladores de crescimento utilizadas (BAP 2,00 e ANA 0,10 mgL^{-1}) não evoluíram do estágio de calos (Quadros 4 e 7) para as duas cultivares em estudo.

A regeneração de plântulas foi observada em todos os tratamentos ocorrendo por via indireta, ou seja, passando pelo estágio de calos. Neste caso, existe a possibilidade de mutação espontânea ou individualizada, importantes na obtenção de novas variedades, como relatam ANTONI & FOLQUER (3) e vários autores. Mas não foi notada nenhuma plântula que diferisse morfológicamente das outras. O desenvolvimento de somente uma plântula em cada calos pressupõe que esta inibe o crescimento de outras, o que concorda com as observações de HWANG et alii (24).

A adição de carvão ativado a 1% ao meio de cultura inibe um crescimento inicial muito rápido de calos LITZ & CONOVER (31). De fato não se observou calogênese no meio com carvão ativado, ocorrendo a regeneração de plântulas por via direta a partir de meristema, mas retardando em aproximadamente 2 meses a obtenção de plântulas completas. Não foram observadas diferenças morfológicas entre plântulas obtidas por via direta ou indireta.

Não foram observadas alterações no desenvolvimento de plântulas nos diferentes níveis de pH, embora TSAI & LIN (60) relatem que o crescimento de calos pode ser controlado através do pH do meio.

Apesar de LOVE & RHODES (34) relatarem que um aumento no teor de sacarose de 3% para 5% pode ser a causa do sucesso ou fracasso da cultura, no presente trabalho não foi notada nenhuma diferença na regeneração de plântulas nos teores de sacarose empregados.

Conclusões

- A regeneração de plântulas completas a partir da cultura de meristemas ao final de aproximadamente 40 dias foi conseguida em meio "MS" suplementado com (em mgL^{-1}) BAP 1,00; ANA 0,10; e GA_3 1,00 para a cultivar CNPH 003 e com BAP 1,00; ANA 0,05; e GA_3 1,00 para a cultivar Coquinho.

- Nas concentrações mais elevadas de reguladores de crescimento utilizadas não foi observada a regeneração de plântulas, apenas a formação de calos.

CAPÍTULO II

"EFEITO DA INIBIÇÃO CORRELATIVA NA REPICAGEM DE PLÂNTULAS DE BATA TA DOCE OBTIDAS IN VITRO"

Material e Métodos

Inibição correlativa é um termo ou expressão científica, utilizado nos estudos de fisiologia para designar, resumidamente, no desenvolvimento vegetal, o papel da gema apical de uma planta na inibição do desenvolvimento das gemas axilares, através do balanço na síntese e translocação interna de fitohormônios, HILMAN (22).

Este estudo teve como objetivo verificar a atuação de hormônios endógenos e exógenos na repicagem de plântulas de batata doce obtidas in vitro. Esta atuação foi observada pela adição ao meio de cultura no caso dos reguladores de crescimento exógenos, e no caso dos hormônios endógenos através da posição da gema na plântula repicada.

Foram utilizadas plântulas das mesmas cultivares do capí

tulo anterior, ou sejam a CNPH 003 e a Coquinho. Estas plântulas foram assepticamente repicadas em câmara de fluxo laminar com a - proximadamente 40 dias de idade, em segmentos de 0,5 a 1,0 cm de comprimento, com uma gema cada.

O meio de cultura constituiu-se de macro e micro nutrientes de acordo com MURASHIGE & SKOOG (43), com os respectivos componentes e concentrações já apresentados no Quadro 1. O meio nutritivo básico foi suplementado com todas as combinações possíveis de ANA (0,00; 0,01; 0,10; 0,50 e 1,00 mgL^{-1}) e BAP (0,00 ; 0,01; 0,10 e 0,50 mgL^{-1}).

Logo após a repicagem, os segmentos foram colocados em tubos de ensaio (2,5 x 15,0 cm) contendo de 10 a 15 mL do meio de cultura, conservando-se a polaridade natural das plântulas. Os tubos de ensaio contendo um segmento cada, foram fechados com tampas plásticas, lacrados com parafilm, colocados em suportes e levados para a sala de crescimento, onde foram mantidos a uma temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$, com fotoperíodo de 16 horas luz/dia e intensidade luminosa de aproximadamente 3000 lux, usando-se uma combinação de lâmpadas fluorescentes Gro-Lux e Branca Fria.

Para identificar as posições das gemas nas plântulas repicadas, foram consideradas como posição apical as gemas apicais propriamente ditas e as gemas imediatamente abaixo destas; como posição mediana as duas gemas na porção intermediária das plântulas; e como posição basal as duas últimas gemas, próximas ao colo das plântulas, conforme ilustra a Fig. 8.

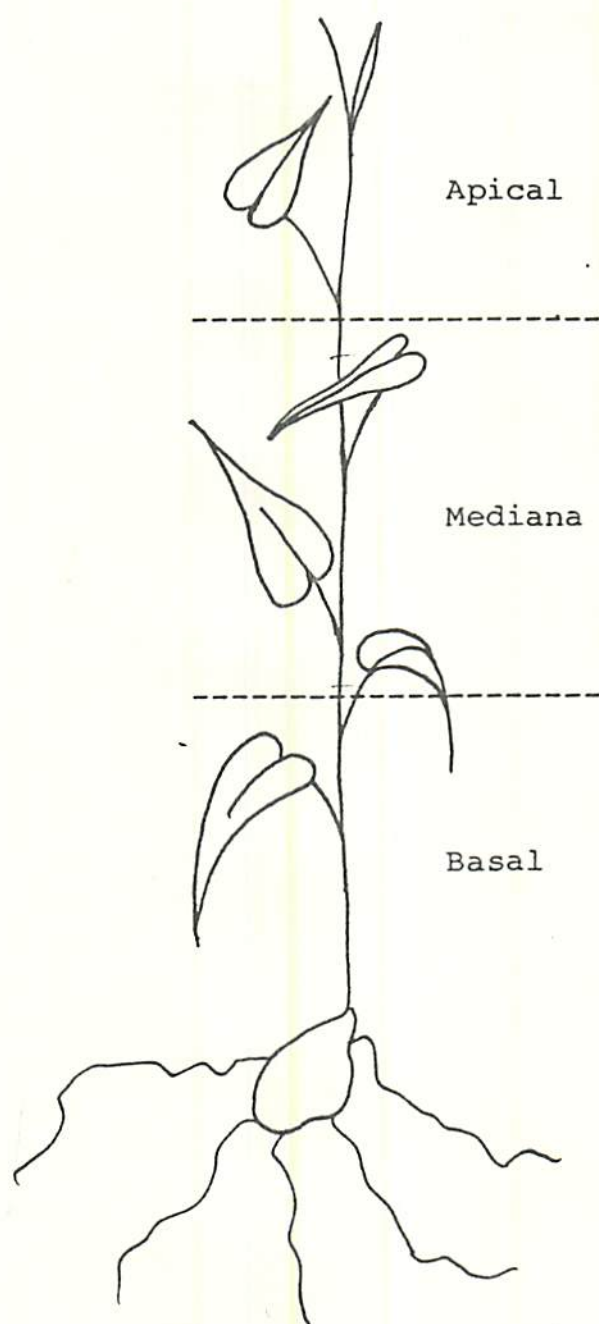


FIGURA 8 - Ilustração da plântula de batata doce com aproximadamente 40 dias, obtida a partir do cultivo de meristema in vitro, subdividida em regiões basal, mediana e apical.

Resultados e Discussão

Inicialmente foi observado um leve entumescimento nas extremidades dos segmentos repicados, e com uma semana de cultivo in vitro o surgimento de pequenas brotações nas gemas dos segmentos para os diversos tratamentos em teste, exceto nos que continham as concentrações mais elevadas de auxina ($\text{ANA } 1,00 \text{ mgL}^{-1}$), conforme ilustram as Figuras 9 a 19. Nestes tratamentos foram observados apenas o início da formação de calos nas duas extremidades dos segmentos, independente da posição que estes ocupavam anteriormente nas plântulas repicadas. Observações semelhantes foram feitas por SIHACHAKR (53) que fazendo sucessivas multiplicações vegetativas utilizando meio suplementado com auxina ($1,00 \text{ mgL}^{-1}$ de AIA), também notou a formação de calos nas extremidades dos segmentos com aproximadamente uma semana após a repicagem. Nos tratamentos com ANA a $0,50 \text{ mgL}^{-1}$ e com BAP a $0,10$ a $0,50 \text{ mgL}^{-1}$, também foi observada calogênese (Fig. 10, 11, 14, 15, 17, 18 e 19).

Após duas semanas de incubação foi notado nos tratamentos que continham $0,10 \text{ mgL}^{-1}$ de ANA e $0,00$ ou $0,01 \text{ mgL}^{-1}$ de BAP a

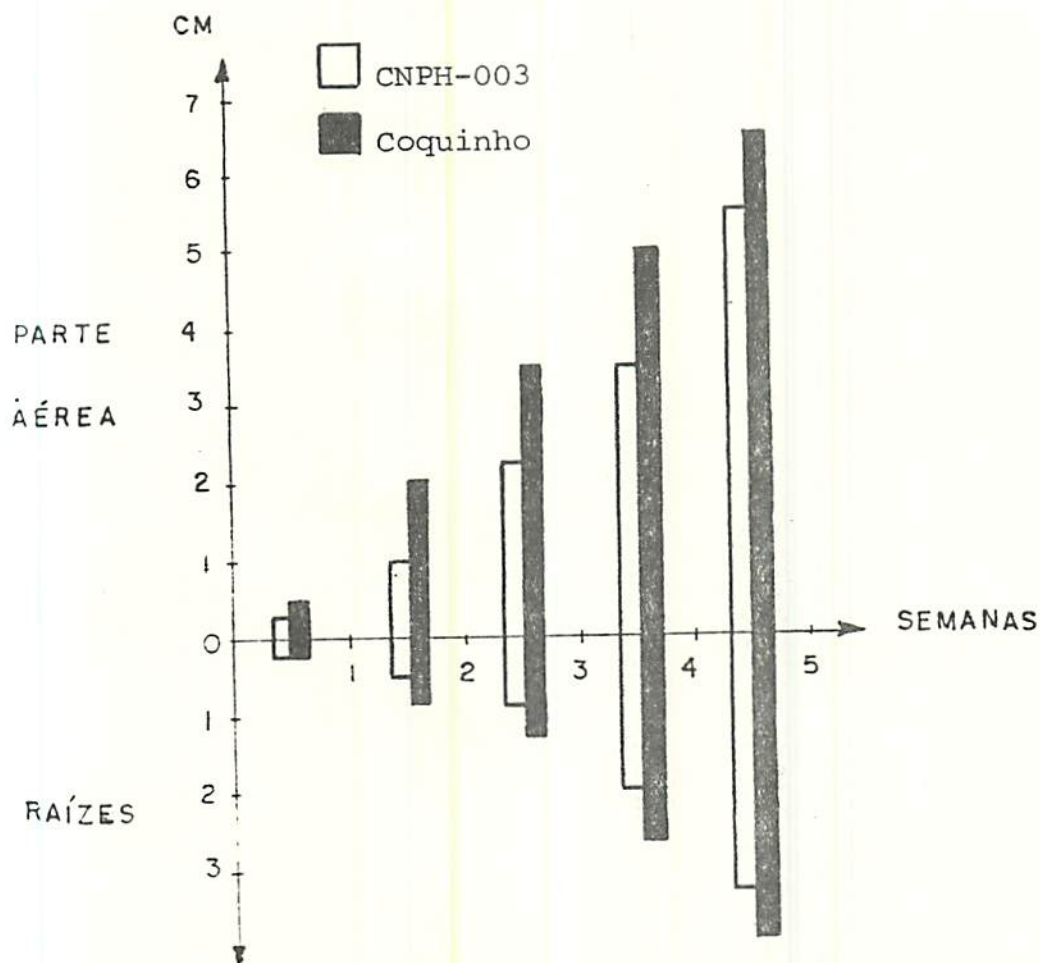


FIGURA 9 - Histograma do desenvolvimento da gema in vitro, comparando as cultivares CNPH-003 e Coquinho durante 5 semanas após a repicagem, em meio MS sem reguladores de crescimento ou com presença de BAP a $0,01 \text{ mgL}^{-1}$.

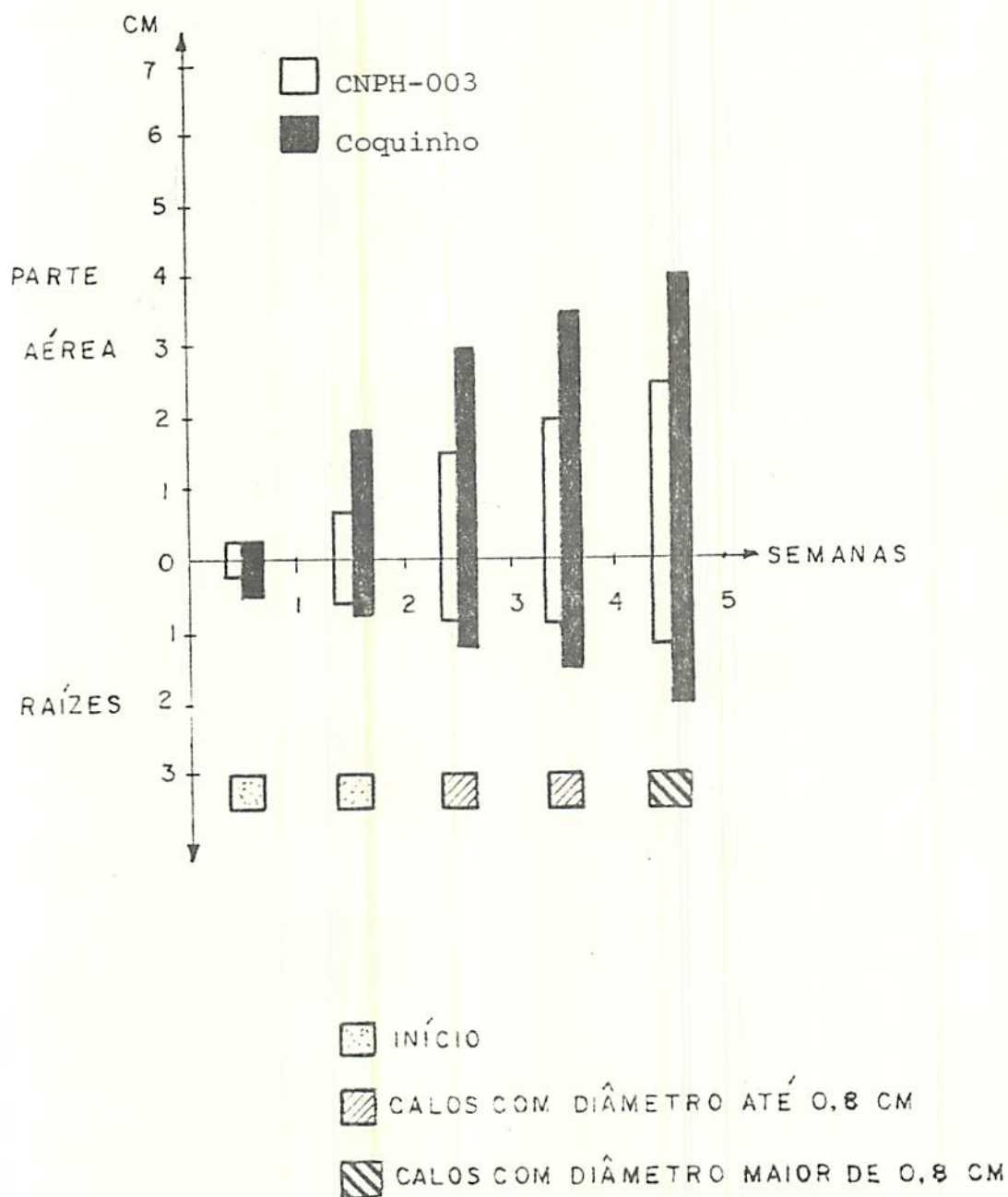


FIGURA 10 - Histograma do desenvolvimento da gema comparando as cultivares CNPH-003 e Coquinho no decorrer de 5 semanas *in vitro* após a repicagem, em meio MS + BAP $0,10 \text{ mgL}^{-1}$. A legenda se refere à ocorrência de calogênese.

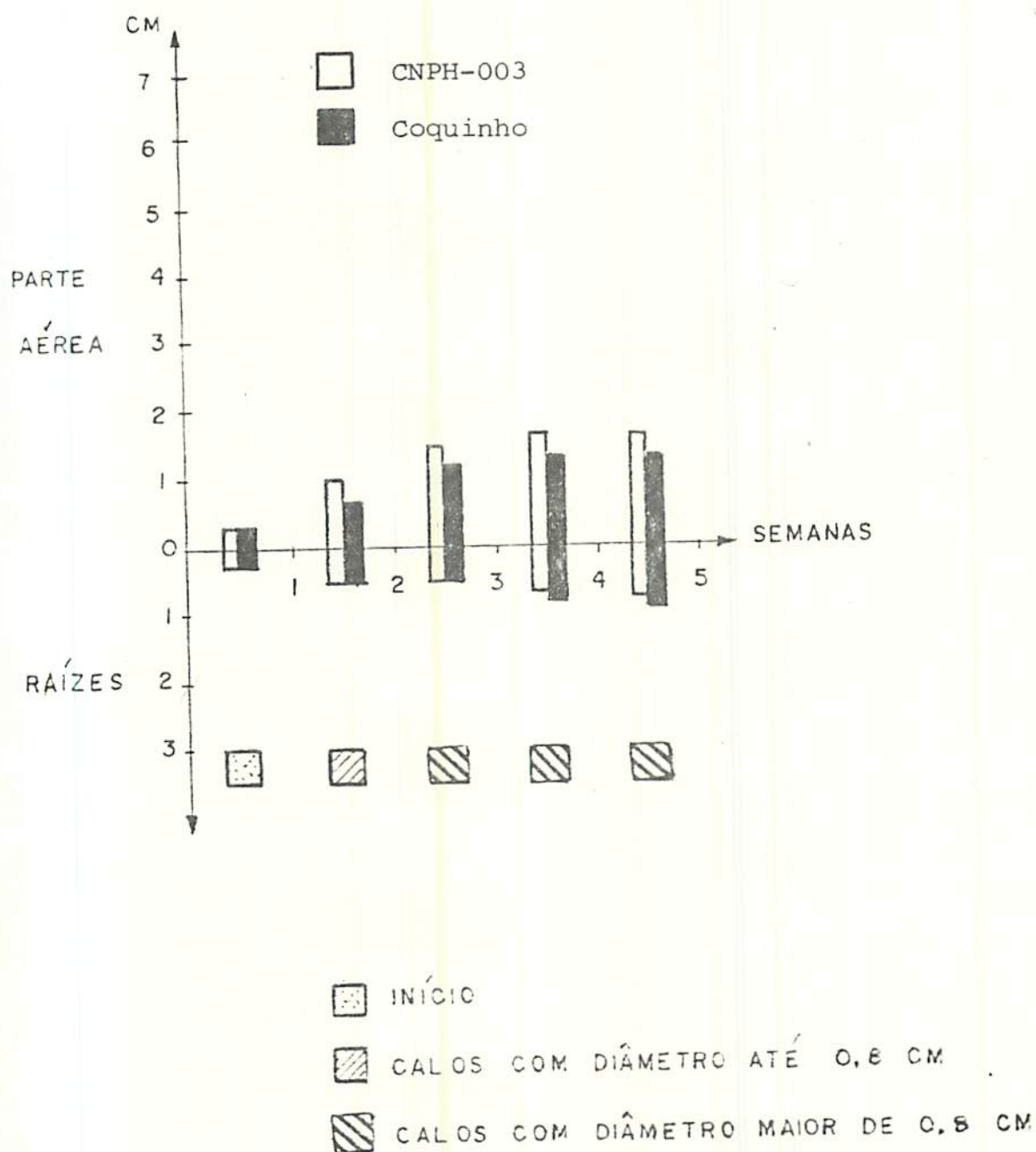


FIGURA 11 - Histograma do desenvolvimento da gema comparando as cultivares CNPH-003 e Coquinho no decorrer de 5 semanas in vitro após a repicagem, em meio MS + BAP $0,50 \text{ mgL}^{-1}$. A legenda se refere à ocorrência de calogênese.

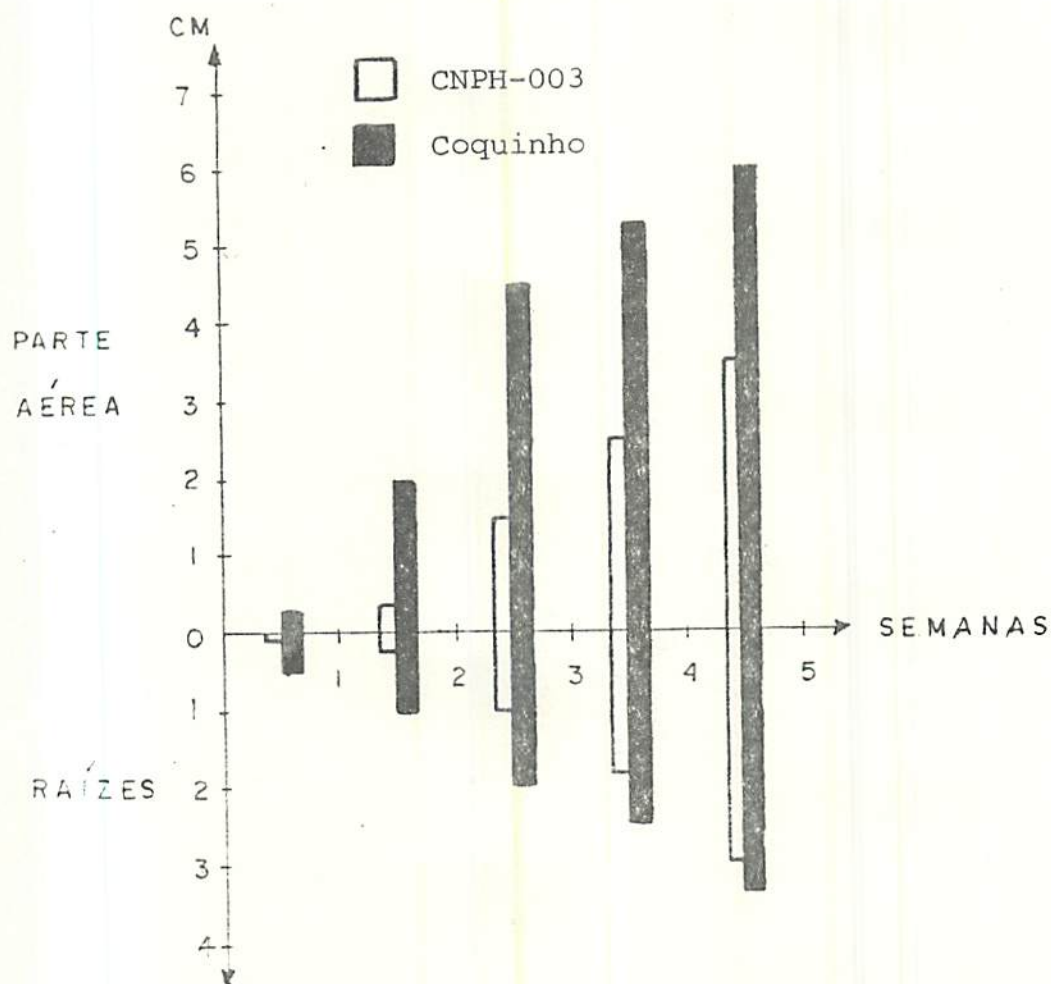


FIGURA 12 - Histograma do desenvolvimento da gema in vitro, comparando as cultivares CNPH-003 e Coquinho durante 5 semanas após a repicagem, em meio MS + ANA $0,01 \text{ mgL}^{-1}$.

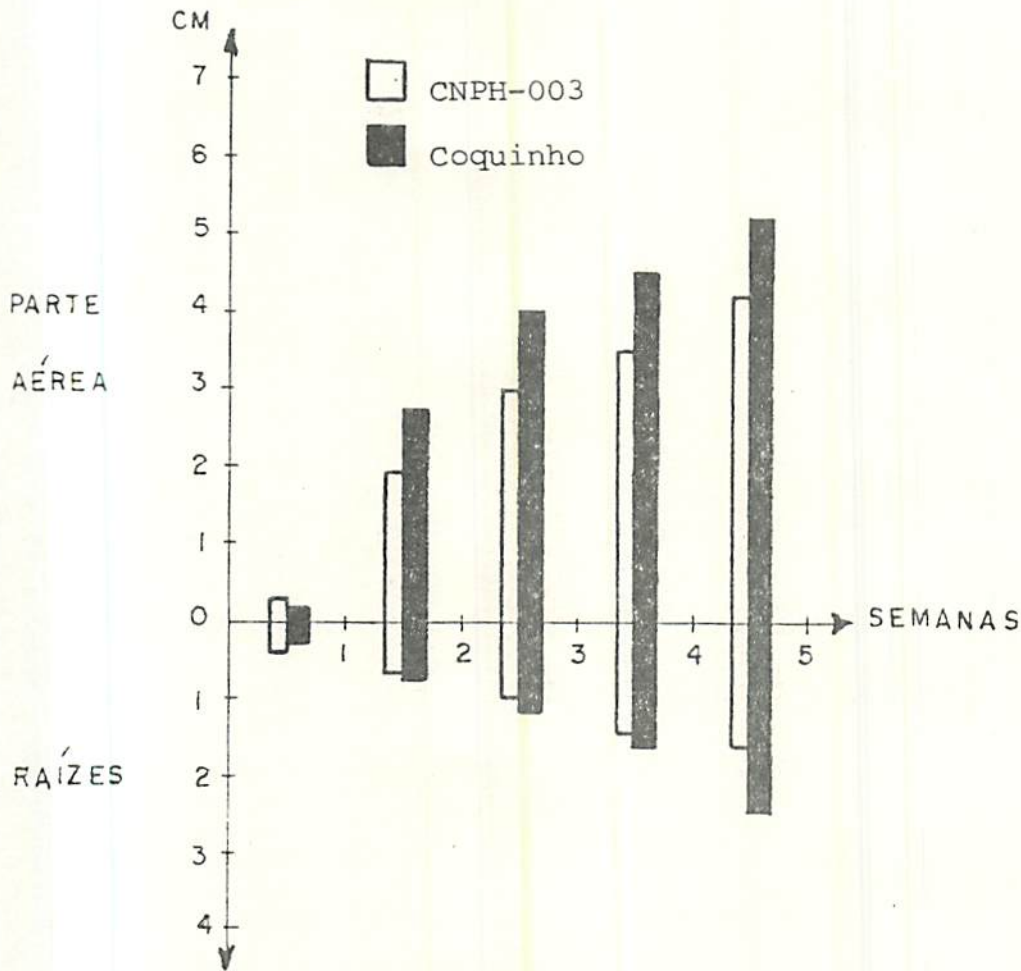


FIGURA 13 - Histograma do desenvolvimento da gema in vitro, comparando as cultivares CNPH-003 e Coquinho durante 5 semanas após a repicagem, em meio MS + ANA $0,01 \text{ mgL}^{-1}$ + BAP $0,01 \text{ mgL}^{-1}$.

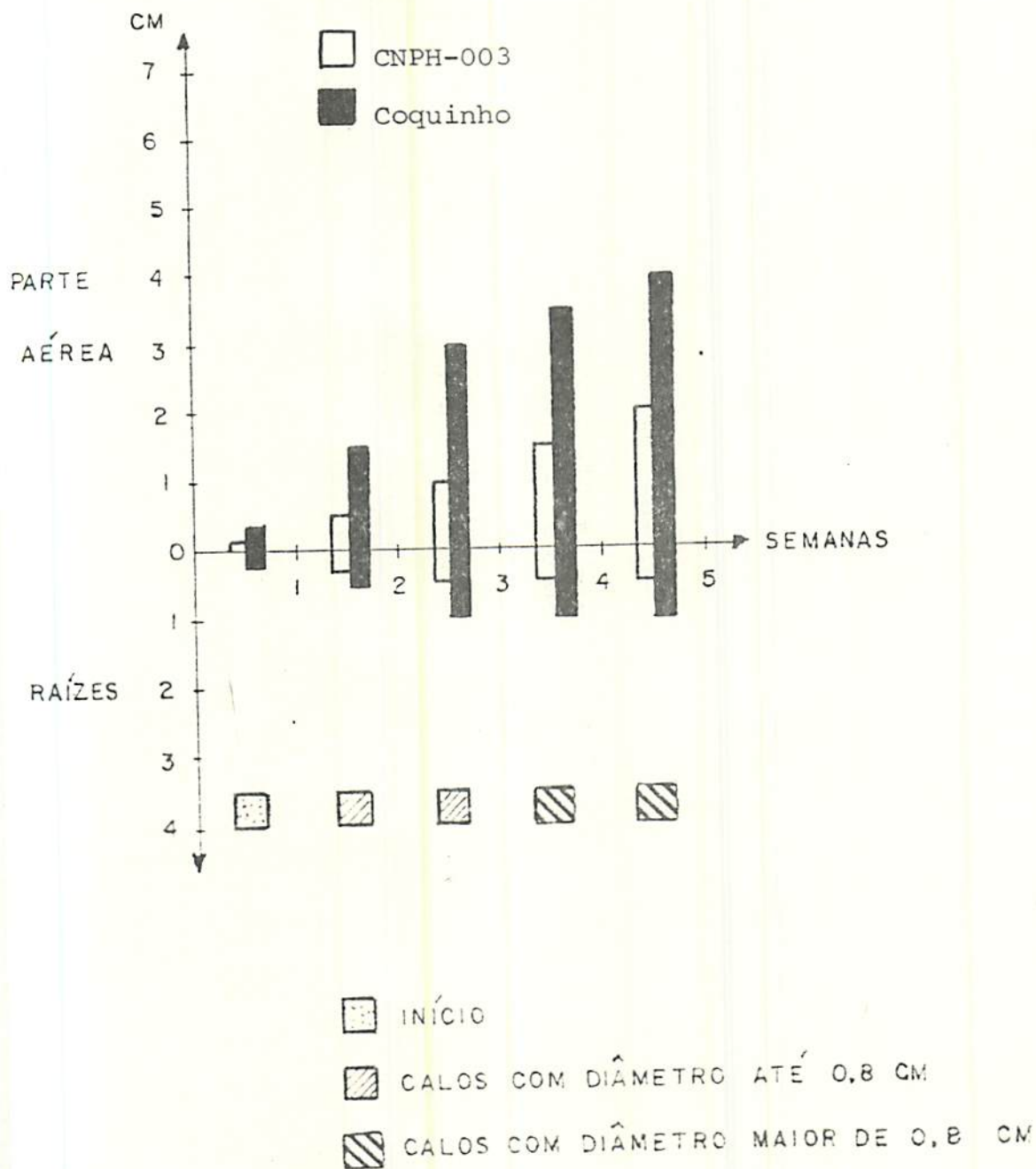


FIGURA 14 - Histograma do desenvolvimento da gema comparando as cultivares CNPH-003 e Coquinho no decorrer de 5 semanas *in vitro* após a repicagem, em meio MS + ANA $0,01 \text{ mgL}^{-1}$ + BAP $0,10 \text{ mgL}^{-1}$. A legenda se refere à ocorrência de calogênese.

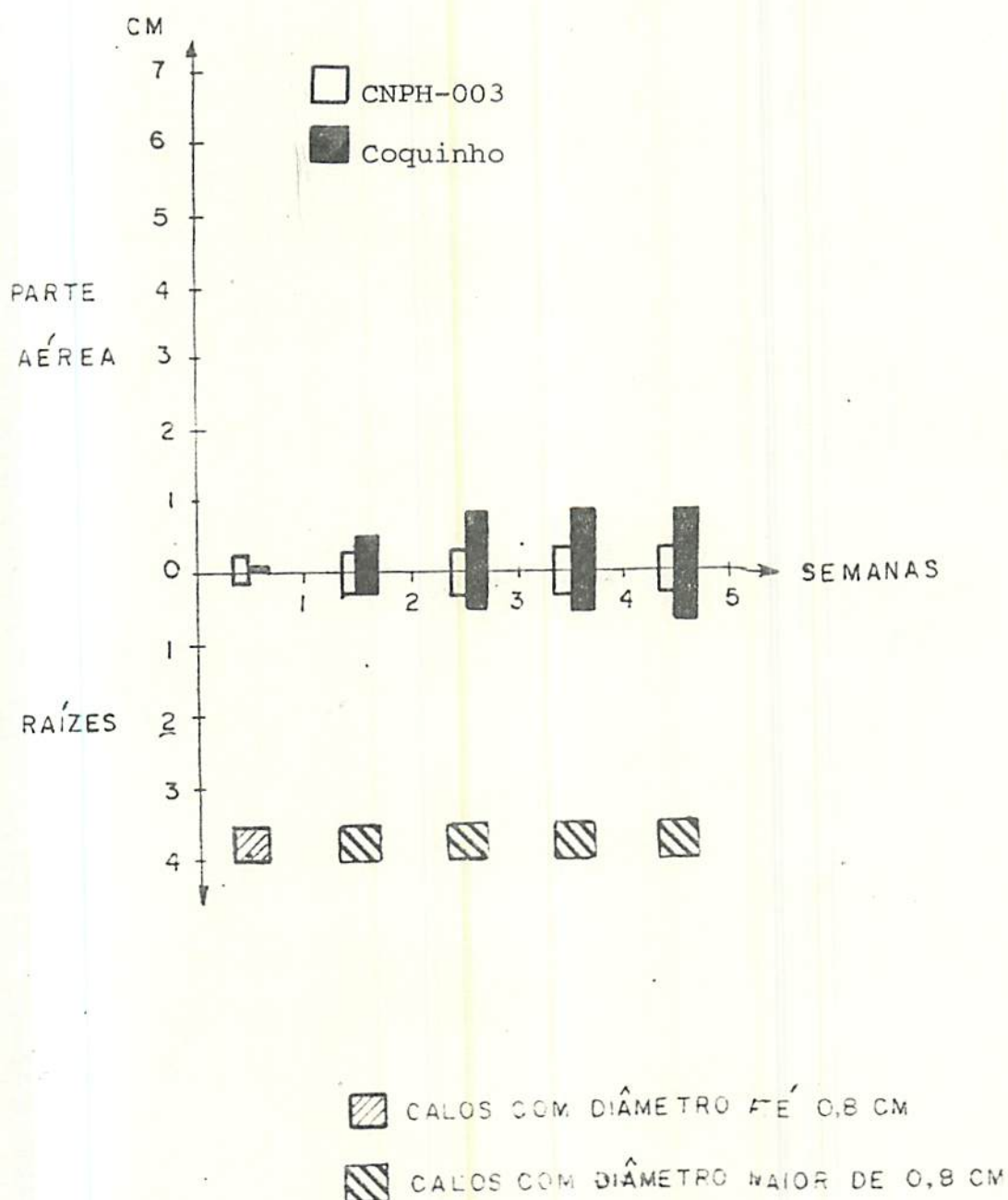


FIGURA 15 - Histograma do desenvolvimento da gema comparando as cultivares CNPH-003 e Coquinho no decorrer de 5 semanas *in vitro* após a repicagem, em meio MS + ANA $0,01 \text{ mgL}^{-1}$ + BAP $0,50 \text{ mgL}^{-1}$. A legenda se refere à ocorrência de calogênese.

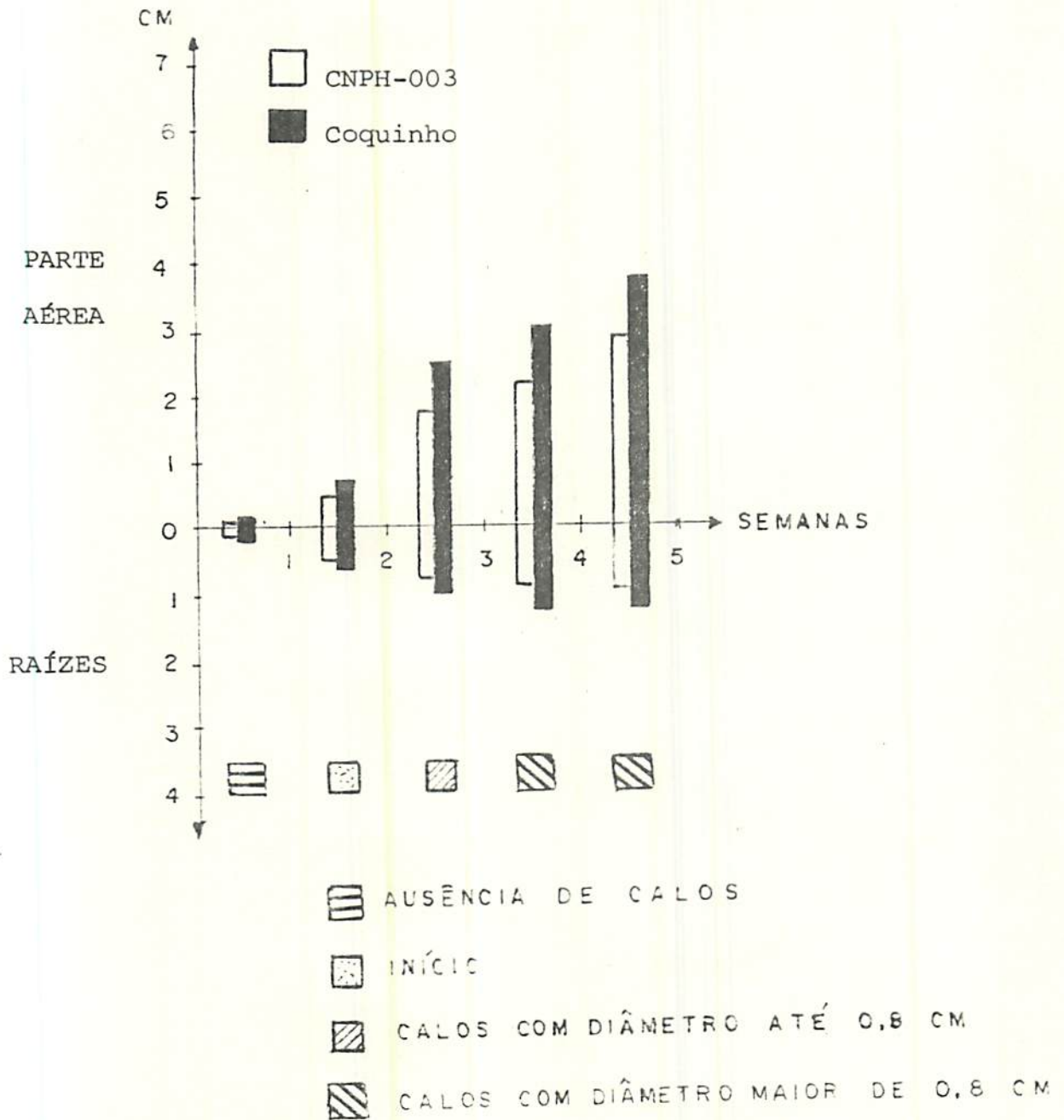


FIGURA 16 - Histograma do desenvolvimento da gema comparando as cultivares CNPH-003 e Coquinho no decorrer de 5 semanas *in vitro* após a repicagem, em meio MS + ANA $0,10 \text{ mgL}^{-1}$ na ausência de BAP e com BAP $0,01 \text{ mgL}^{-1}$. A legenda se refere à ocorrência de calogênese.

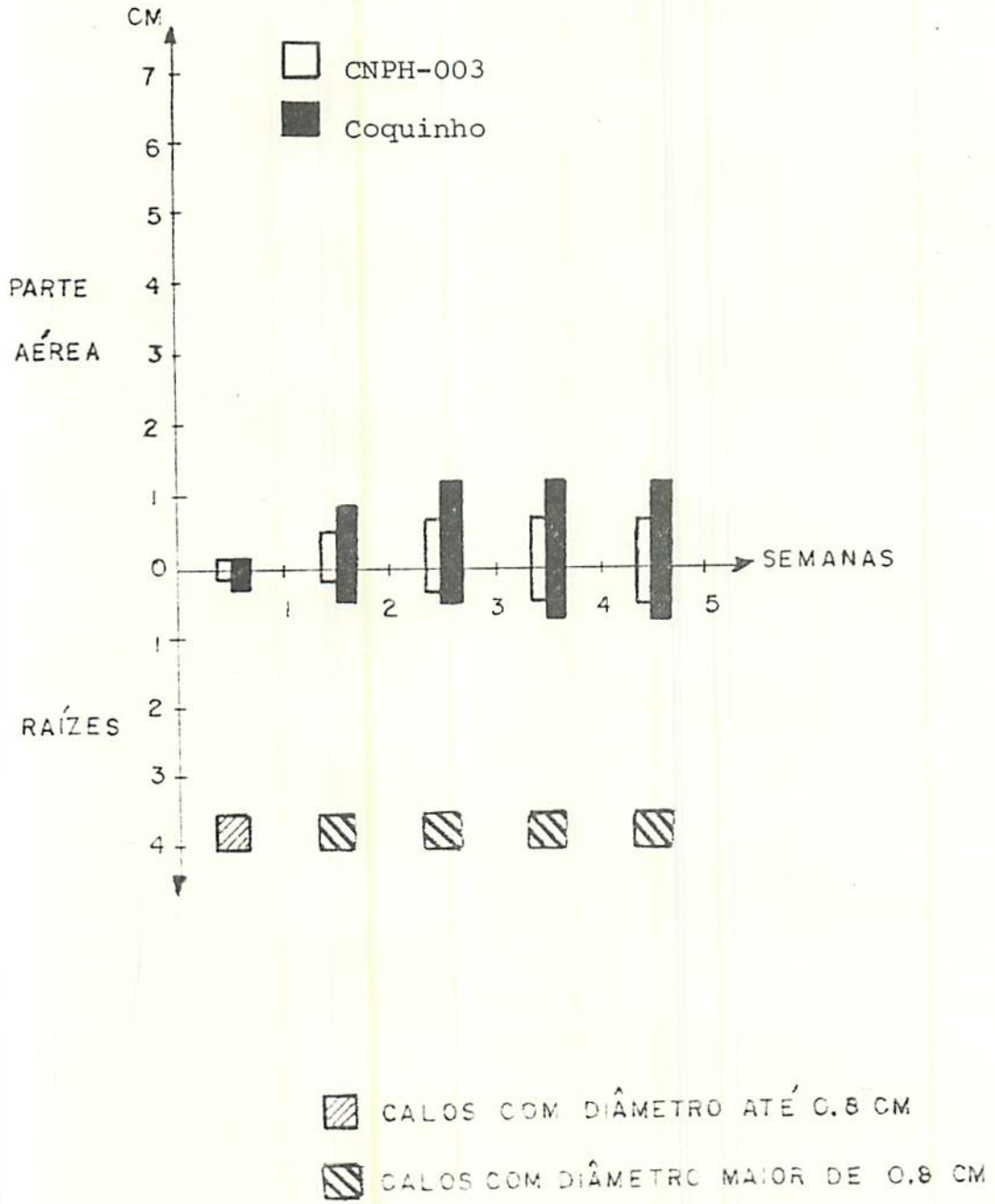


FIGURA 17 - Histograma do desenvolvimento da gema comparando as cultivares CNPH-003 e Coquinho no decorrer de 5 semanas in vitro após a repicagem, em meio MS + ANA $0,10 \text{ mgL}^{-1}$ e com BAP a $0,10 \text{ mgL}^{-1}$ e $0,50 \text{ mgL}^{-1}$. A legenda refere à ocorrência de calogênese.

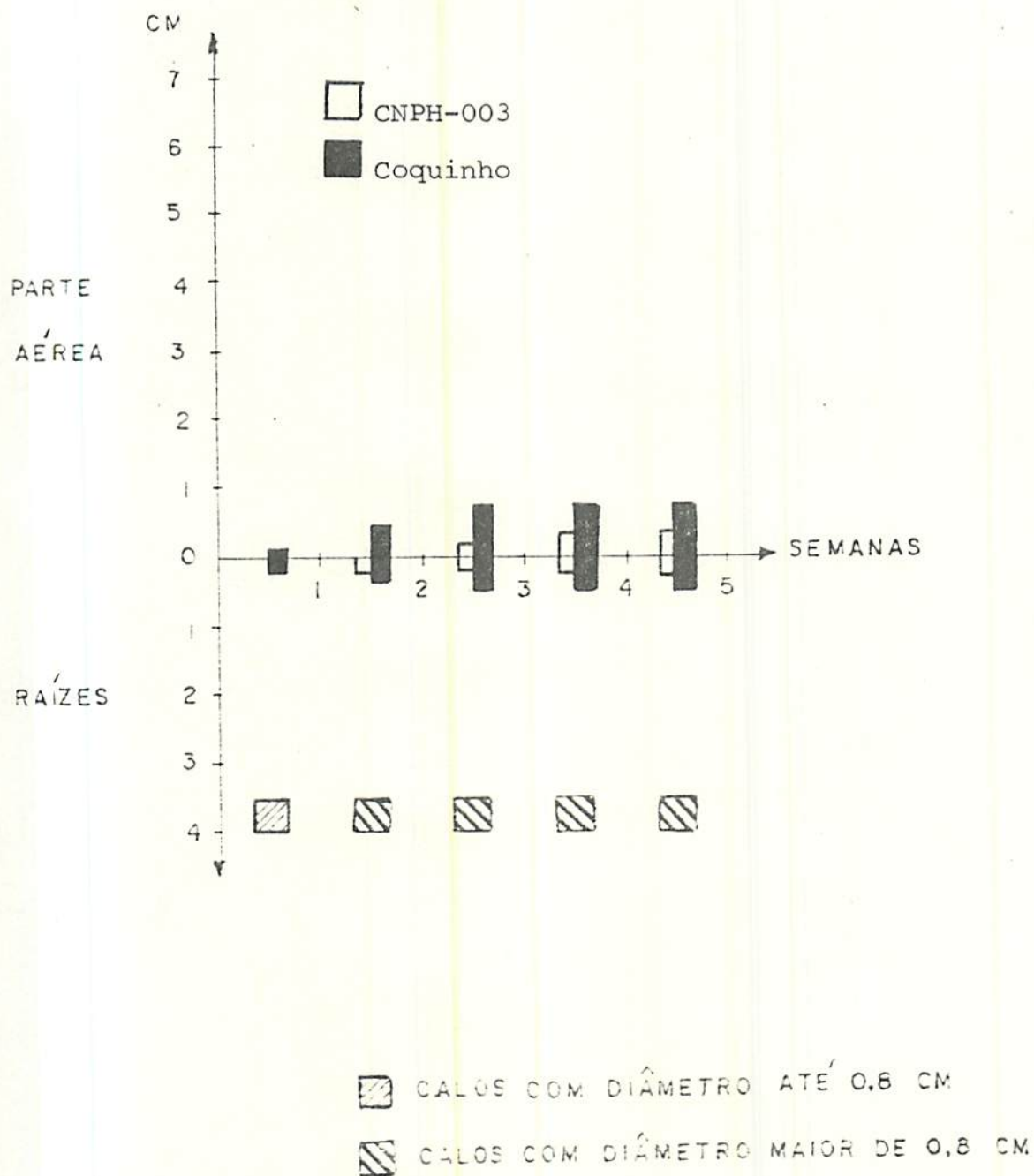


FIGURA 18 - Histograma do desenvolvimento da gema comparando as cultivares CNPH-003 e Coquinho no decorrer de 5 semanas in vitro após a repicagem, em meio MS + ANA $0,50 \text{ mgL}^{-1}$ na ausência de BAP e com BAP a $0,01$; $0,10$ e $0,50 \text{ mgL}^{-1}$. A legenda se refere à ocorrência de calogênese.

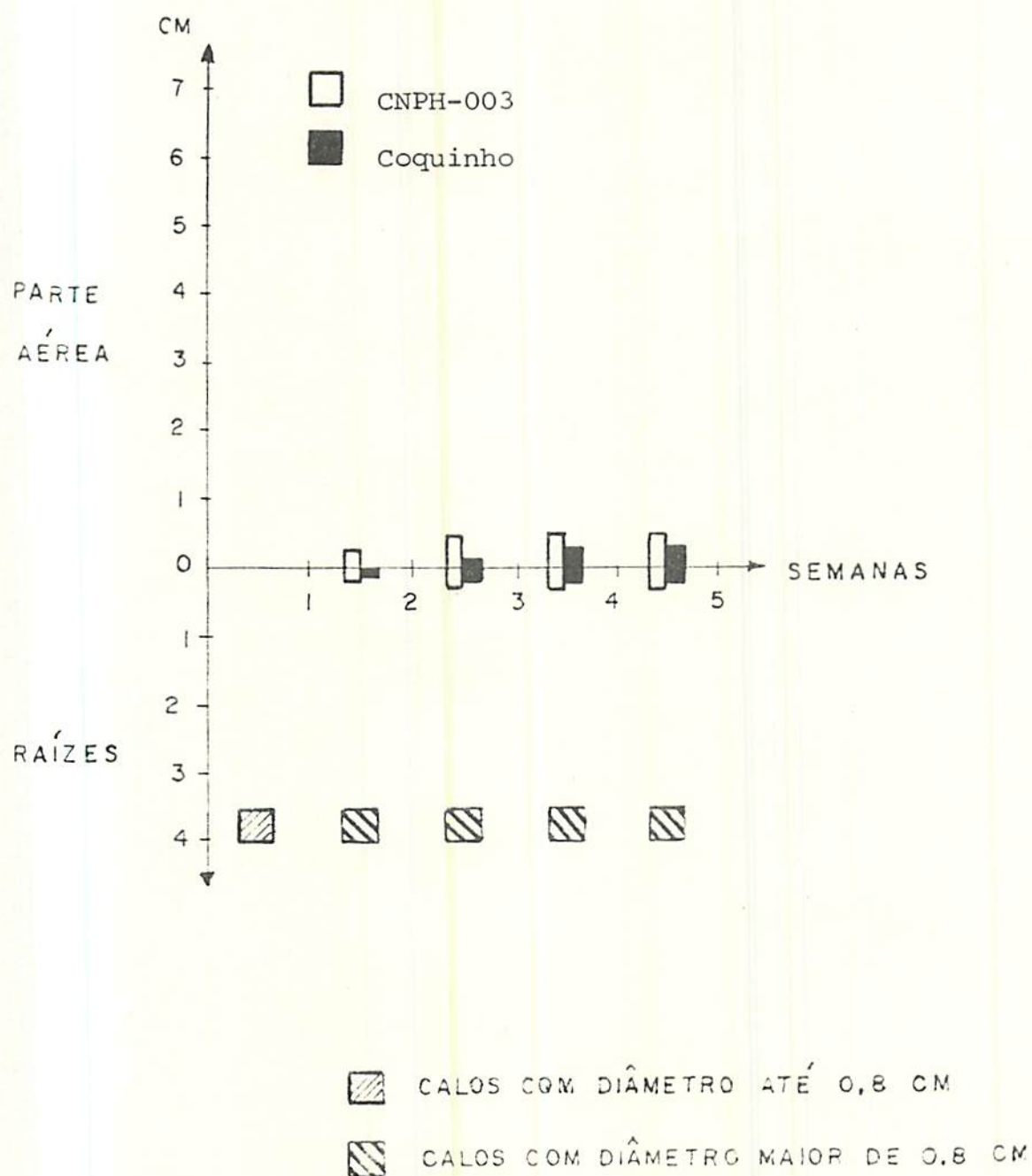


FIGURA 19 - Histograma do desenvolvimento da gema comparando as cultivares CNPH-003 e Coquinho no decorrer de 5 semanas in vitro após a repicagem, em meio MS + ANA $1,00 \text{ mgL}^{-1}$ na ausência de BAP e com BAP a $0,01$; $0,10$ e $0,50 \text{ mgL}^{-1}$. A legenda se refere à ocorrência de calogênese.

dicionado ao meio de cultura o início de calogênese nas extremidades dos segmentos, nas duas cultivares testadas (Fig. 16). Juntamente com esta formação de calos notou-se o desenvolvimento das brotações da parte aérea, como também de raízes nas duas variedades. Nos tratamentos com as maiores concentrações de reguladores de crescimento foi observado o crescimento dos calos nas extremidades dos segmentos, apresentando nesta época um diâmetro médio de aproximadamente 0,6 cm, e pouco desenvolvimento nas brotações. Por outro lado, nos tratamentos com as menores concentrações de reguladores de crescimento ($0,01 \text{ mgL}^{-1}$ de BAP e/ou ANA) e nos que estes estavam ausentes, notou-se pleno desenvolvimento das brotações da parte aérea, que atingiam o comprimento médio de 1,2 cm para a cultivar CNPH 003 e 2,3 cm para a cultivar Coquinho, assim como a formação do sistema radicular nas duas cultivares (Fig. 9, 12 e 13). Diferenças entre variedades nas respostas a um determinado tratamento são comuns, sendo citadas por vários autores (18, 26, 45, 46, 59) tendo causa atribuída a diferenças nos genótipos.

A partir de 3 semanas de cultivo in vitro foi notada nos tratamentos sem reguladores de crescimento e com BAP e/ou ANA na concentração de $0,01 \text{ mgL}^{-1}$, uma tendência à produção de respostas mais precoces, no caso, a obtenção de plântulas completas, com parte aérea bem desenvolvida e sistema radicular formado. De fato, estes tratamentos propiciaram as melhores respostas, ou seja, a obtenção ao final de 5-6 semanas de plântulas aptas para o transplante para substrato sólido e aclimação.

Foi observado nestes tratamentos que a posição da gema na plântula repicada não teve influência no desenvolvimento vege-

tativo, pois as gemas apicais não mostraram nenhum desenvolvimento acentuado em relação às gemas axilares.

Portanto, a inibição correlativa foi liberada com a ocorrência de um bom desenvolvimento vegetativo, de acordo com HILMAN (22).

Em todos os demais tratamentos foi observada calogênese, que em grau variável de intensidade prejudicou o desenvolvimento de plântulas. Nos tratamentos com BAP e/ou ANA na concentração de $0,10 \text{ mgL}^{-1}$ (Figuras 10, 14 e 16), a formação e crescimento dos calos retardou relativamente o desenvolvimento das brotações da parte aérea e o crescimento de raízes, acarretando na produção de plântulas menores e mais susceptíveis ao estresse na fase de transplântio e aclimatação. Quando as concentrações de reguladores de crescimento no meio de cultura eram mais elevadas, com $0,50 \text{ mgL}^{-1}$ de BAP e/ou $0,50$ e $1,00 \text{ mgL}^{-1}$ de ANA (Figuras 11, 15, 17, 18 e 19) o crescimento da massa de calos foi grande, tomando todo o diâmetro dos tubos de ensaio (2,5 cm), e, decorridas cinco semanas de cultivo in vitro; não se observou desenvolvimento satisfatório nas brotações surgidas inicialmente, sendo que em alguns tubos estas tornaram-se necróticas.

Conclusões

- A inibição correlativa foi liberada com o desenvolvimento vegetativo dos segmentos contendo gemas apicais semelhantes aos que tinham gemas axilares.

- O meio MS na ausência de reguladores de crescimento possibilitou as melhores respostas, ou seja a obtenção de plântulas completas e aptas para o transplântio e aclimatação ao final de aproximadamente 40 dias de cultivo in vitro.

- De modo geral, a cultivar Coquinho apresentou melhor desenvolvimento vegetativo após a repicagem.

- Concentrações de reguladores de crescimento maiores que $0,01 \text{ mgL}^{-1}$ provocaram calogênese em ambas as cultivares.

CAPÍTULO III

"EFEITO DE FUNGOS MICORRÍZICOS VESÍCULO-ARBUSCULARES (MVA) NA ACLIMATAÇÃO E CRESCIMENTO DE PLÂNTULAS DE BATATA DOCE MICROPROPAGADAS IN VITRO"

Material e Métodos

Plântulas de batata doce obtidas através da cultura de meristema (Capítulo I) e micropropagadas in vitro (Capítulo II) foram inoculadas com 3 espécies de fungos micorrízicos vesículo-arbusculares (MVA) aos 40 dias após a micropropagação, em mistura de solo com vermiculita na proporção de 2:1, respectivamente. Foi utilizado Latossolo Roxo distrófico, proveniente de mata nativa do Campus da ESAL, não cultivado anteriormente, contendo 1 ppm de fósforo, sem adubação e esterilizado à seco em estufa a 120°C durante 3 horas.

As espécies de fungos MVA inoculadas nas mudas de batata doce obtidas in vitro e transplantadas para sacos plásticos de mudas de café, foram: Gigaspora margarita (Becker & Hall) - GMRG;

Scutellospora heterogama (Walker & Sanders) - SHTR; e Glomus clarum (Nicolson & Schenk) - LCLR. Incluiu-se ainda um tratamento controle não inoculado - NI, ou testemunha.

A inoculação foi feita no momento do transplântio, com o auxílio de pipetas volumétricas, utilizando-se 5 ml de suspensão de esporos obtidas segundo o método do peneiramento úmido de GERDEMANN & NICOLSON (16), com uma média de 95 esporos por planta.

Após a inoculação as mudas foram levadas para casa de vegetação e mantidas a uma temperatura de $28^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa do ar de aproximadamente 50% (Fig. 20).

Aos 60 dias após a inoculação amostrou-se duas plantas de cada tratamento para determinação da percentagem de colonização micorrízica das raízes segundo GIOVANETTI & MOSSE (17), pesos fresco e seco da parte aérea e de raízes. As plantas restantes foram transplântadas para recipientes maiores, usando-se vasos plásticos contendo material de solo desinfestado com brometo de metila. Determinações semelhantes foram feitas aos 90, 120 e 180 dias após a inoculação, usando-se, sempre, duas amostras de cada tratamento.

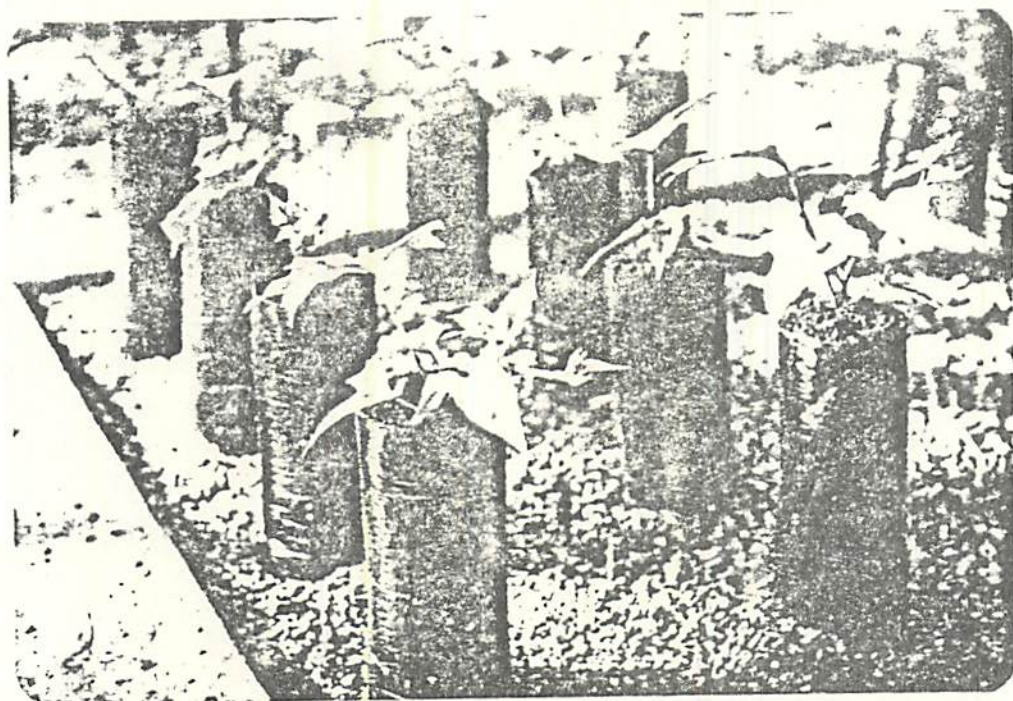


FIGURA 20 - Aclimação em casa de vegetação de plântulas de batata doce micropropagadas in vitro e inoculadas com fungos MVA, aos 20 dias pós plantio.

Resultados e Discussão

A inoculação com diferentes fungos micorrízicos vesículo arbusculares (MVA) apresentou efeito benéfico no crescimento e aclimatação das plantas de batata doce de ambas as cultivares estudadas (Fig. 21 e 22). O peso seco da parte aérea e raízes foi notavelmente maior nas plantas micorrizadas em relação as não inoculadas (Fig. 23 e 24). Tanto para a cultivar Coquinho como para a CNPH 003, observou-se pequenas diferenças do peso seco da parte aérea entre os tratamentos aos 60 dias após a inoculação. A partir dos 90 dias, o tratamento inoculado com Glomus clarum mostrou-se mais efetivo em relação aos demais, atingindo aos 180 dias incrementos consideráveis no peso seco para ambas as cultivares. As plantas não inoculadas mostraram-se pouco adaptadas as condições de fertilidade e de cultivo com seu crescimento bastante dificultado, sendo que na última colheita, aos 180 dias, sobreviveram apenas as plantas não inoculadas da cultivar CNPH 003. Isso evidencia uma condição micotrófica da batata doce e a importância das MVA no crescimento de plântulas micropropagadas in vitro.

Para peso seco de raízes, foram observadas algumas dife-

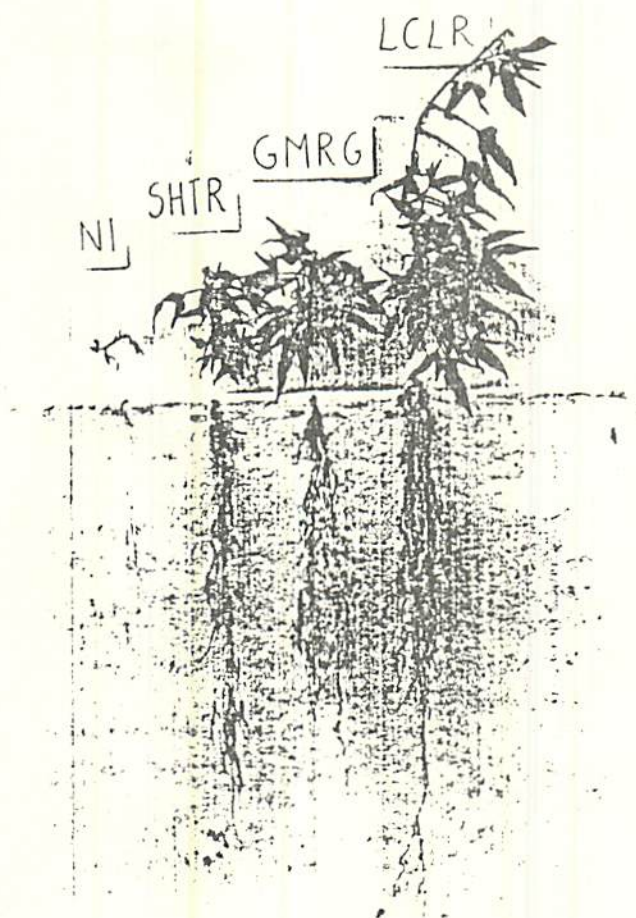


FIGURA 21 - Crescimento de plântulas de batata doce da cultivar Coquinho, com 60 dias após o transplântio, inoculadas com os fungos MVA Scutellospora heterogama (SHTR), Gigaspora margarita (GMRG), Glomus clarum (LCLR) e não inoculadas (NI).

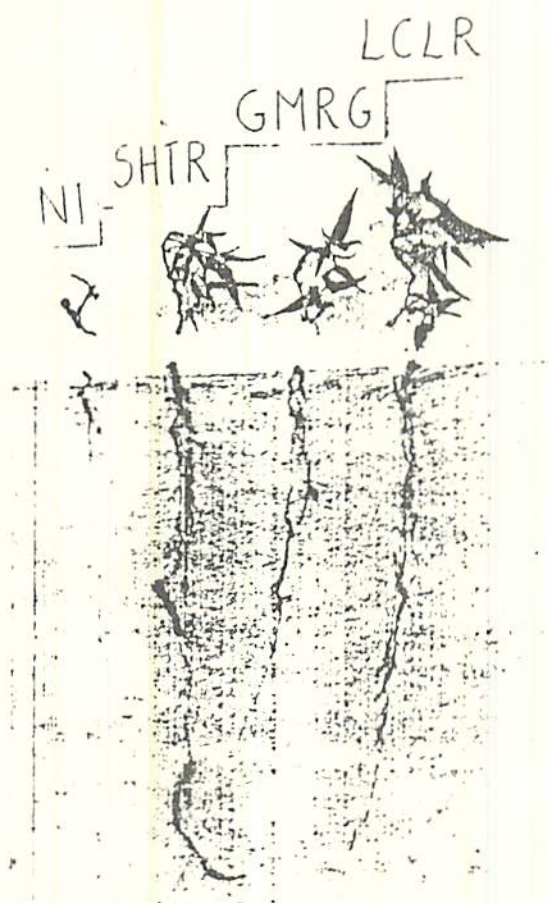


FIGURA 22 - Crescimento de plântulas de batata doce da cultivar CNPH-003, com 60 dias após o transplântio, inoculadas com os fungos MVA Scutellospora heterogama (SHTR), Gigaspora margarita (GMRG), Glomus clarum (LCLR) e não inoculadas (NI).

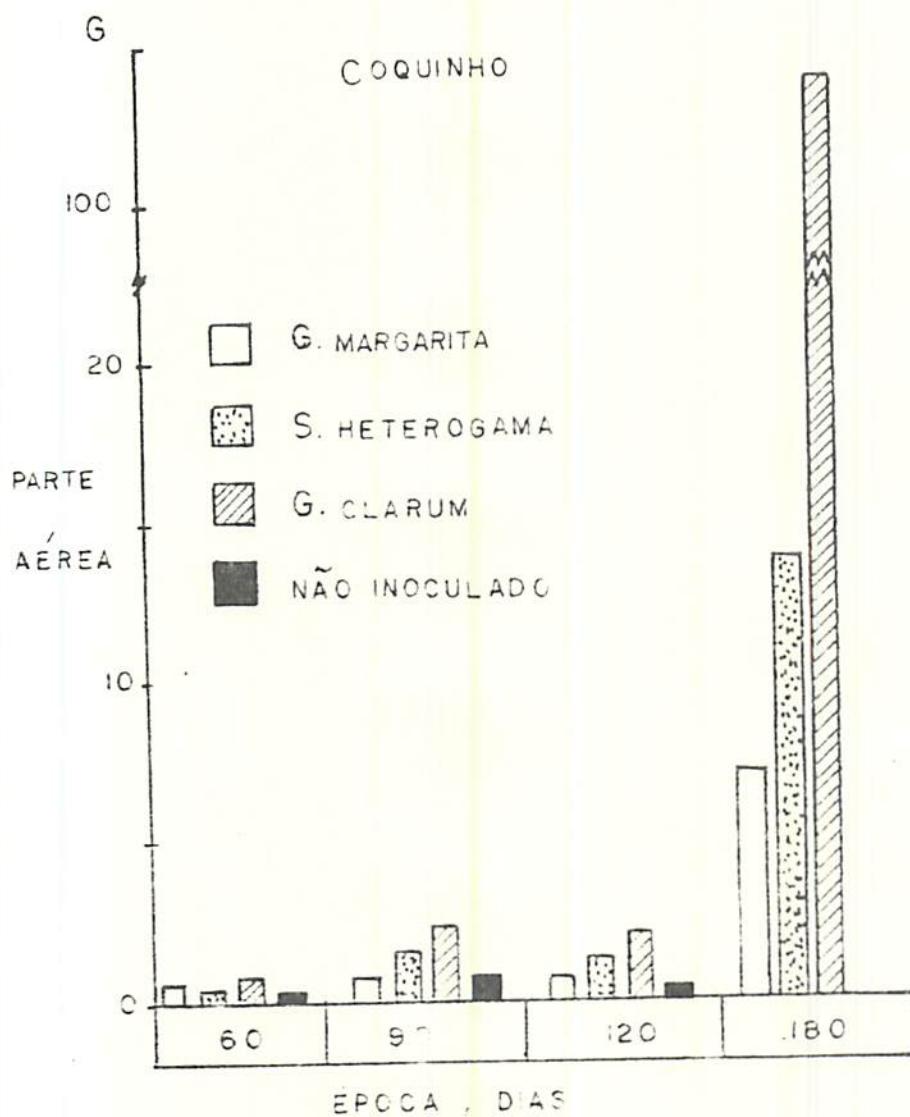


FIGURA 23 - Histograma do peso seco de parte aérea de plantas de batata doce, cultivar Coquinho, aos 60, 90, 120 e 180 dias após a inoculação com diferentes espécies de fungos MVA.

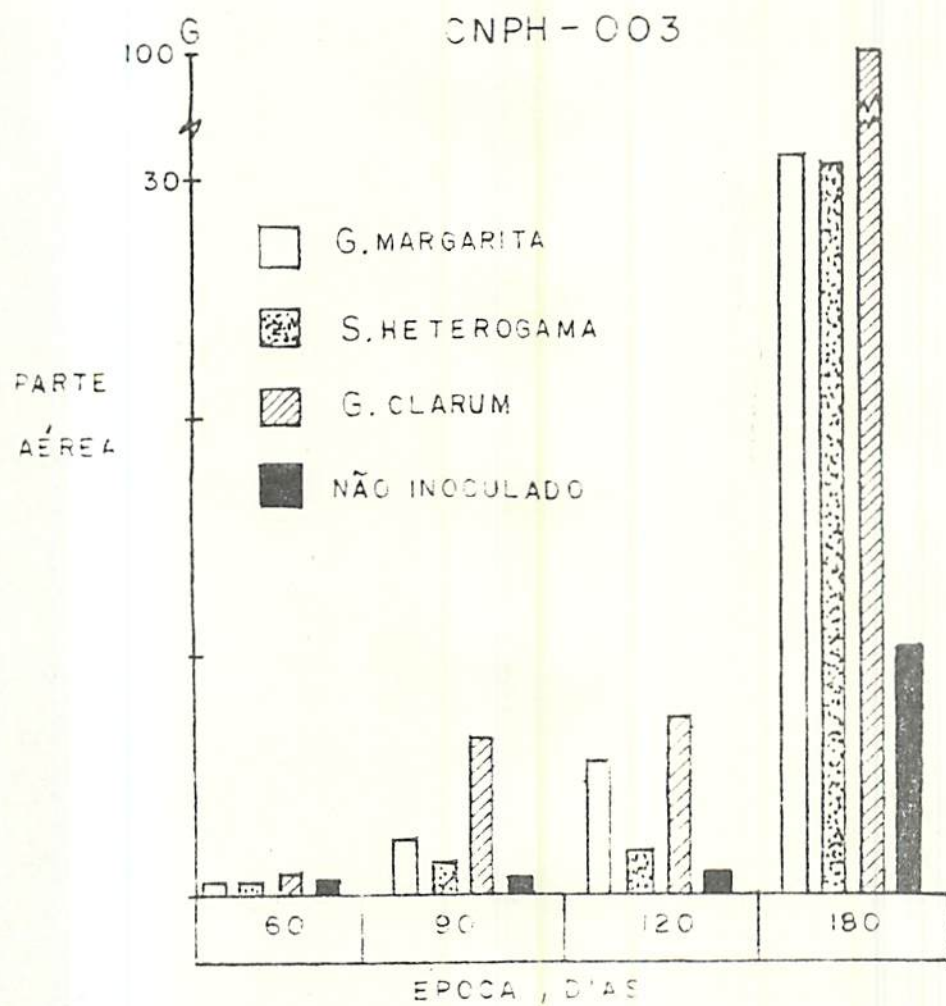


FIGURA 24 - Histograma do peso seco de parte aérea de plantas de batata doce, cultivar CNPH-003, aos 60, 90, 120 e 180 dias após a inoculação com diferentes espécies de fungos MVA.

renças entre as cultivares de batata doce nas respostas à micorri-
zação (Fig. 25 e 26). Para ambas as cultivares houve pequena di-
ferença entre as espécies fúngicas aos 60 dias após a inoculação.
Para a cultivar Coquinho, os tratamentos com Scutellospora hete-
rogama e Glomus clarum apresentaram maior peso seco de raízes, en-
quanto que para a CNPH 003, o tratamento com Gigaspora margarita
destacou-se em relação aos demais. Esses resultados sugerem que, a
lém de diferenças na relação planta-fungos MVA, podem existir di-
ferenças consideráveis na relação cultivar de planta-fungos MVA,
conforme descrito por AZCON & OCAMPO (6). Aos 180 dias foi obser-
vada a tuberização de raízes apenas nos tratamentos com Glomus
clarum na cultivar Coquinho, e para a CNPH 003 nos com Glomus
clarum e Gigaspora margarita.

A colonização de raízes por fungos MVA (Fig. 27) mostrou
se crescente até aproximadamente 100 dias de cultivo para ambas
as cultivares. Para a cultivar Coquinho, as maiores taxas de colo-
nização foram observadas nos tratamentos inoculados com Scutellos-
pora heterogama, seguido de Glomus clarum e Gigaspora margarita,
sendo que a última, a partir de 90 dias, apresentou uma tendência
de estabilização na taxa de colonização, enquanto que, para as de-
mais espécies ocorreu redução. Já na cultivar CNPH 003, houve uma
tendência de ocorrer o máximo de colonização por volta de 90 dias
após a inoculação, sendo relativamente menores as diferenças nas
taxas de colonização entre as diferentes espécies de fungos MVA.
Através de montagem de lâminas de fragmentos de raízes, foi possí-
vel observar grande número de células auxiliares, esporos vegeta-
tivos, arbúsculos, vesículas e micélio externo e interno nos tra-

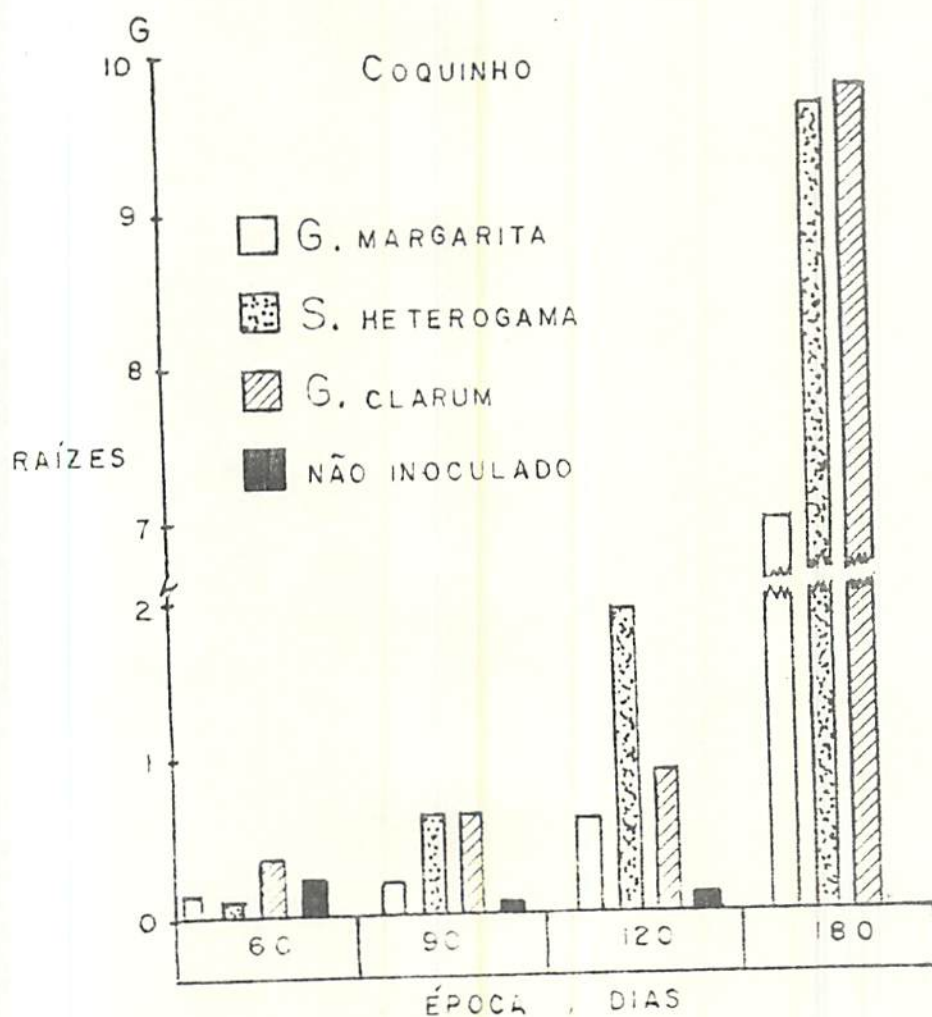


FIGURA 25 - Histograma do peso seco de raízes de plantas de batata doce, cultivar Coquinho, aos 60, 90, 120 e 180 dias após a inoculação com diferentes espécies de fungos MVA.

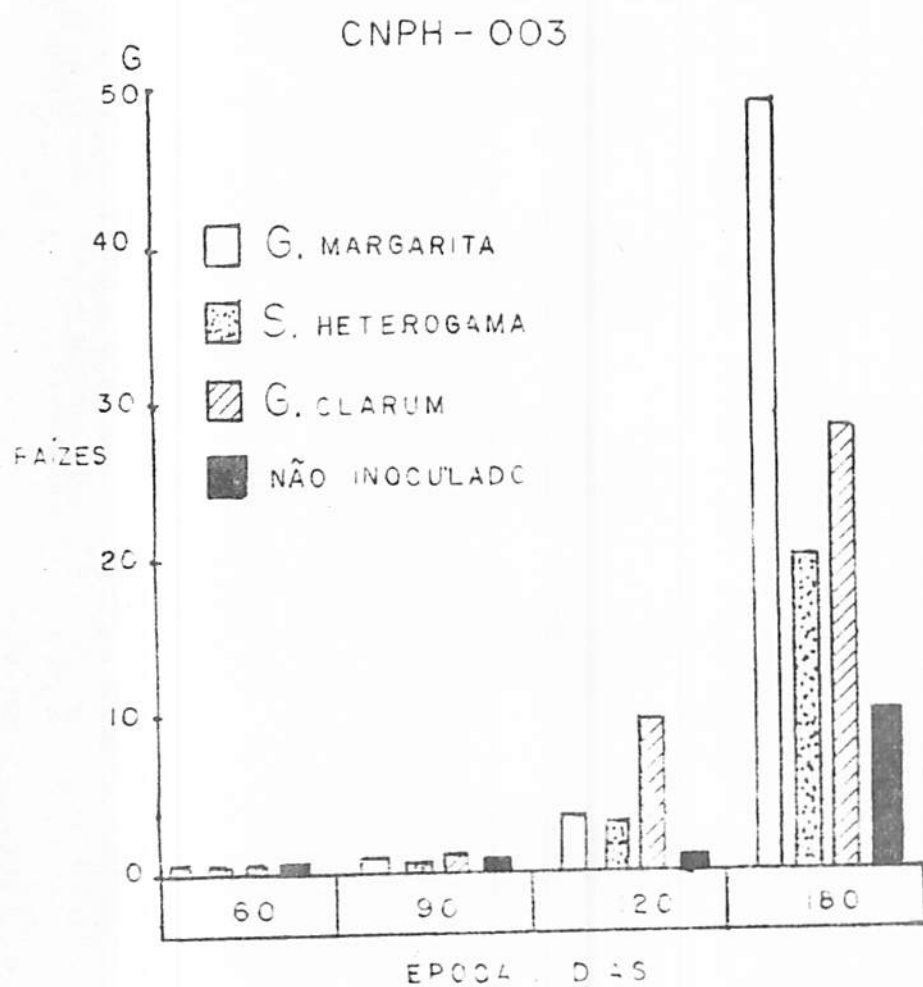


FIGURA 26 - Histograma do peso seco de raízes de plantas de batata doce, cultivar CNPH-003, aos 60, 90, 120 e 180 dias após a inoculação com diferentes espécies de fungos MVA.

tamentos inoculados (Figs. 28, 29, 30 e 31).

Embora não haja especificidade na formação de micorrizas vesículo-arbusculares, pode existir uma certa habilidade discriminatória de espécies de fungos MVA por determinadas espécies de plantas, segundo JANOS (25). Todos os fungos MVA testados colonizaram e apresentaram benefícios para a batata doce, mas houve uma tendência do fungo Glomus clarum apresentar maior efetividade para as cultivares em estudo. Os benefícios da micorrização observados neste trabalho, provavelmente estão relacionados à melhoria na nutrição, especialmente por uma maior absorção de fósforo, considerando as condições de baixa fertilidade do substrato utilizado. O aumento do crescimento das plantas, associado com a maior absorção de fósforo (TINKER, 58), e de outros nutrientes (MOSSE, 41 e TINKER & GILDON, 59) devido às MVA tem sido demonstrado para diferentes espécies vegetais e condições de cultivo. Além disso, uma maior resistência à estresse de ambiente e melhor absorção e utilização de água propiciada pela micorrização, podem estar envolvidas, PAULA & SIQUEIRA (48).

Fica então evidente que as micorrizas vesículo-arbusculares apresentam um grande potencial na otimização da delicada fase de transferência de plântulas obtidas in vitro para substrato sólido e condições de aclimação, mesmo para espécies vegetais consideradas bastante rústicas, como a batata doce.

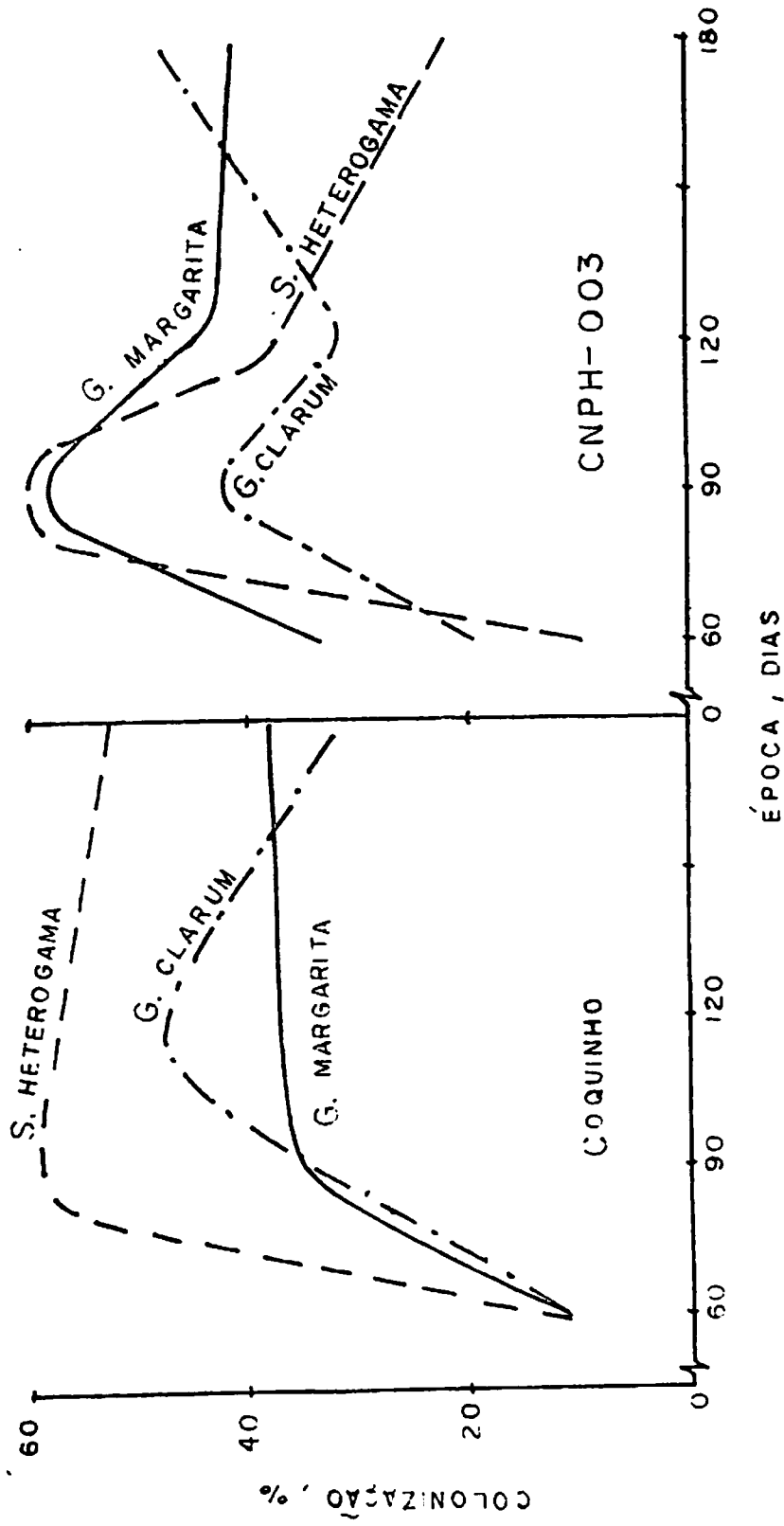


FIGURA 27 - Taxas de colonização de raízes de batata doce, cultivares Coquinho e CNPH-003, aos 60, 90, 120 e 180 dias após a inoculação com diferentes espécies de fungos MVA.



FIGURA 28 - Raiz de batata doce, cultivar CNPH 003, colonizada por Scutellospora heterogama (aumento 100x).

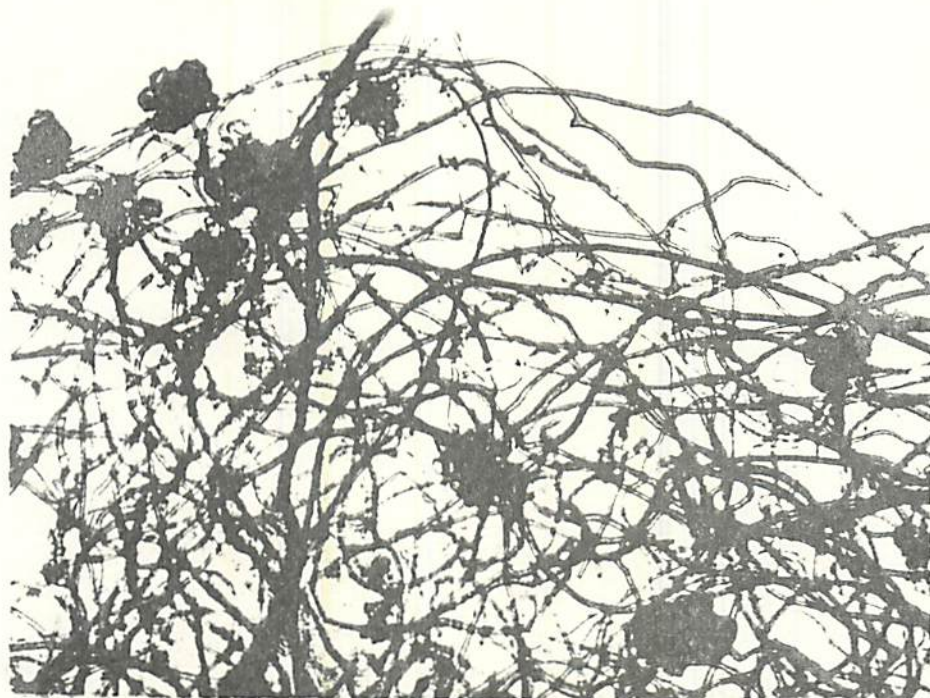


FIGURA 29 - Células auxiliares de Gigaspora margarita em rizosfe-
ra de batata doce, cultivar Coquinho (aumento 200 x).

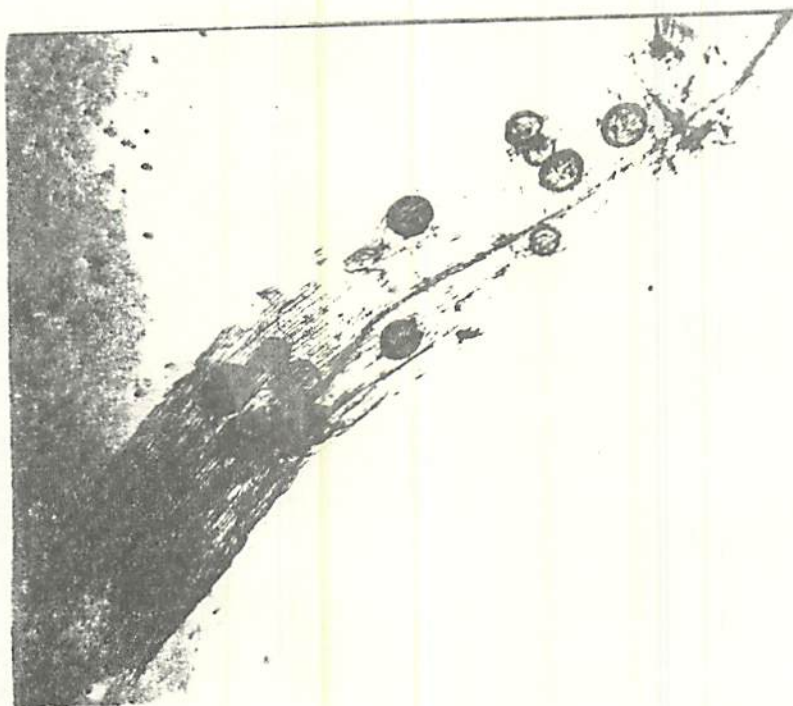


FIGURA 30 - Esporos de Glomus clarum em raízes de batata doce, cul_tivar CNPH 003 (aumento 100x).

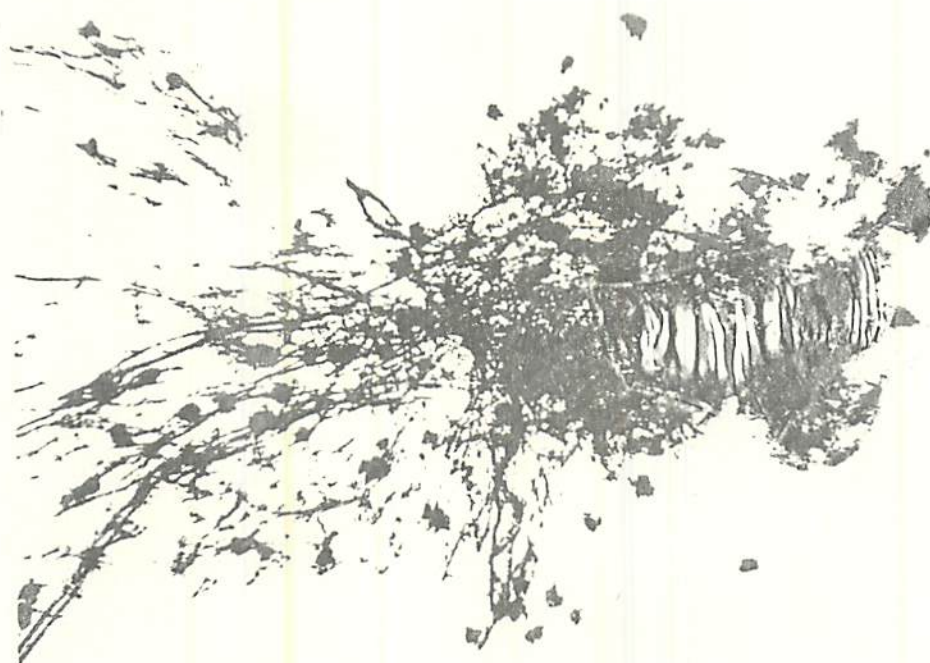


FIGURA 31 - Crescimento micelial de Scutellospora heterogama em raízes de batata doce, cultivar Coquinho (aumento 100x).

Conclusões

- A micorrização proporcionou melhor aclimação e crescimento das plântulas micropropagadas, com incremento significativo na produção de matéria seca.

- A colonização radicular mostrou-se elevada nas duas cultivares para todas as espécies fúngicas testadas.

- De modo geral, os melhores resultados foram propiciados pela espécie fúngica MVA Glomus clarum.

RESUMO

Duas cultivares de batata doce, Coquinho e CNPH 003 foram micropropagadas in vitro utilizando-se a técnica de cultura de meristemas, no Laboratório de Biotecnologia da Escola Superior de Agricultura de Lavras.

Meristemas com tamanho médio de 0,5 mm provenientes de gemas apicais e laterais foram isolados em meio modificado de Murashige & Skoog (43) suplementado com todas as combinações possíveis de ANA (0,05 e 0,10 mgL⁻¹), GA₃ (1,00 e 5,00 mgL⁻¹) e BAP (0,50; 1,00 e 2,00 mgL⁻¹).

Inicialmente foi observada calogênese, e a regeneração de plântulas completas conseguida no final de 40 dias em meio suplementado com (em mgL⁻¹) BAP 1,00 + ANA 0,05 + GA₃ 1,00 para a cultivar Coquinho e com BAP 1,00 + ANA 0,10 + GA₃ 1,00 para a cultivar CNPH 003.

Estas plântulas foram seccionadas em segmentos de 0,5 a 1,0 cm contendo uma gema cada, os quais foram caracterizados de acordo com sua posição apical, mediana ou basal e, transferidos para meio "MS" acrescido de BAP nas concentrações de 0,00; 0,01;

0,10 e 0,50 mgL^{-1} e de ANA com 0,00; 0,01; 0,10; 0,50 e 1,00 mgL^{-1} em todas as combinações. Todos os tratamentos com concentrações de reguladores de crescimento acima de 0,01 mgL^{-1} apresentaram calogênese. Nos tratamentos que estes estavam ausentes, a posição da gema não influenciou o desenvolvimento vegetativo. Portanto, o correu liberação da inibição correlativa, com a regeneração de plântulas completas, independente da posição do explante inicial, ao final de aproximadamente 40 dias de cultivo in vitro.

Em seguida, fez-se o transplântio para substrato sólido, utilizando-se terra com vermiculita na proporção de 2:1, juntamente com a inoculação de fungos micorrízicos vesículo-arbusculares de 3 espécies, sendo estas: Gigaspora margarita, Scutellospora heterogama e Glomus clarum. Foram feitas determinações dos pesos fresco e seco da parte aérea e raízes, e da percentagem de colonização micorrízica de raízes aos 60, 90, 120 e 180 dias após a inoculação (transplântio). A micorrização proporcionou melhor aclimação e crescimento das plantas micropropagadas, com significativo incremento na produção de matéria seca, e a colonização radicular mostrou-se elevada para todas as espécies fúngicas testadas.

SUMMARY

"IN VITRO PROPAGATION OF SWEET POTATO (Ipomoea batatas (L) Lam)"

In vitro propagation of the sweet potato cultivars Coqui_nho and CNPH 003 was obtained on modified Murashige & Skoog media using axillary buds and shoot tips explants. Complete plantlets were regenerated in 40 days from a single isolated meristem 0.5 mm long. Cultivars differed in response to levels of growth regulators. The best responses were in MS supplied with 1.00 mgL^{-1} of BAP, 0.005 mgL^{-1} of NAA and 1.00 mgL^{-1} of GA_3 for the cultivar Co_quin_ho and 1.00 mgL^{-1} of BAP, 0.10 mgL^{-1} of NAA and 1.00 mgL^{-1} of GA_3 for the cultivar CNPH 003.

These plantlets were micropropagated in segments 0.5-1.0 cm long observing the bud position (apical, median or base) on MS modified media with and without growth regulators. In all treatments with more than 0.01 mgL^{-1} of growth regulators occurred callogenesis. On treatments without growth regulators, bud position did not influence the development. So, the correlative inhibition was liberated, and complete plantlets were regenerated in 40 days of in

vitro cultivation.

Following, the plantlets were transplanted on a mixture of soil vermiculite (2:1) and inoculated with 3 VAM species (Gigaspora margarita, Scutellospora heterogama and Glomus clarum). Dry and fresh weigh from roots and aerial parts were determined in 60, 90, 120 and 180 days after inoculation (transplant). The mycorrhizal inoculation provided best acclimatation and growth of micropropagated plants, with significant increase on dry matter production, and root colonization was high for all fungi species tested.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALCONERO, R.; SANTIAGO, A.G.; MORALES, F. & RODRIGUES, F. Meristem tip culture and virus indexing of sweet potatoes. Phytopathology, St. Paul, 65(6):769-73, July 1975.
2. ALKALIFA, M.A. & CHAMBLISS, O.L. Feasibility of tissue culture propagation of sweet potatoes for foundation and stock-evaluation of different propagation procedures. HortScience, Alexandria, 20(4):665, Aug. 1985. (Conference Abstract).
3. ANTONI, H.J. & FOLQUER, G. Cultivo in vitro de tecidos de batatas (Ipomoea batatas (L) Lam) para la producción de nuevos cultivares. Revista Agronômica del Noroeste Argentino, Tucuman, 12(1/2):177-8, mar. 1975.
4. ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO BRASIL - 1980. Rio de Janeiro, IBGE, v. 41, 1980.
5. ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO BRASIL - 1985. Rio de Janeiro, IBGE, v. 46, 1986.

6. AZCON, R. & OCAMPO, J.A. Factors affecting the vesicular-arbuscular infection and mycorrhizal dependency of thirteen wheat cultivars. The New Phytologist, London, 87:667-85, 1981.
7. BARRERA, P. Batata doce; uma das doze mais importantes culturas do mundo. São Paulo, Ed. Ícone, 1986. 95p. (Coleção Brasil Agrícola).
8. CARSWELL, G.K. & LOCY, R.D. Root and shoot initiation by leaf, stem and storage root explants of sweet potato culture medium effect. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, Netherlands, 3(3):229-36, Mar. 1984.
9. CHANDLER, F.L. & HAQUE, S.Q. The use of tissue culture in the production of yam and sweet potato planting disease free material. Plant Prod.Pro.Pad., 59:69-87, 1984. (Conference paper). In: DERWENT BIOTECHNOLOGY ABSTRACTS, New York, 4 (16):63, Abst. 8508090, Aug. 1985.
10. CUSHMAN, K.E.; PATERSON, D.R.; TABER, R.A. & EARHART, D.R. The effect of mycorrhizal inoculation and four nutrient regimes on water consumption of hydroponically grown sweet potatoes Ipomoea batatas. HortScience, Alexandria, 20(4):654, Aug. 1985. (Conference Abstract).
11. ELLIOTT, R.F. Growth of excised meristem tips of kumara Ipomoea batatas (L) Poir in axenic culture. New Zealand Journal of Botany, Wellington, 7:158-66, 1969.

12. FOSSARD, R.A. Tissue culture and plant propagation. New England, University of New England, 1976. 270p.
13. FRISON, E.A. Tissue culture: a tool for improvement and international exchange of tropical root and tuber crops. ITTA Research Briefs, 2:1-4, 1981.
14. _____ & NG, S.Y. Elimination of sweet potato virus disease agents by meristem tip culture. Tropical Pest Management, Ibadan, 27(4):453-4, Apr. 1981.
15. GAMBORG, O.L.; MILLER, R.A. & OJIMA, K. Requirements of suspension cultures of soybean root cells. Experimental Cell Research, New York, 50:148-51, 1968.
16. GERDEMANN, J.W. & NICOLSON, T.H. Spores of mycorrhizal endogenous species extracted from soil by sieving and decanting. Transactions British Mycological Society, London, 46:235-46, 1983.
17. GIOVANNETTI, M. & MOSSE, B. An evaluation of techniques for measuring vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in roots. The New Phytologist, London, 84:489-500, 1980.
18. GUNKEL, S.E.; SHARP, W.R.; WILLIAM, B.W.; WEST, W.C. & DRINK - WATER, W.V. Root and shoot initiation in sweet potato explants as related to polarity and nutrient media variations. Botanical Gazette, Chicago, 133:254-62, 1972.
19. HAHN, S.K. Effects of viruses (SPMV) on growth and yield of sweet potato. Experimental Agriculture, Cambridge, 15(1): 1-5, Jan. 1979.

20. HENDERSON, J.H.M.; PHILLS, B.R. & WHATLEY, B.T. Sweet potato.
In: SHARP, W.R. et alii. Handbook of plant cell culture.
New York, MacMillan, 1984. v.2, p.302-26.
21. HENSHAW, G.C. Plant tissue culture: its potential for dissemination of pathogen-free germoplasm and multiplication of planting material. In: EBBELS, D.L. & KING, J.E. Plant health. Oxford, Blackwell Scientific, 1979. p.139-47.
22. HILMAN, J.R. Apical dominance. In: WILKIN, M.B. Advanced plant physiology. London, Pitman, 1984. cap.6, p.128.
23. HOLLINGS, L.S. Disease control through free stock. Annual Review Phytopathology, Palo Alto, 3:367-96, 1965.
24. HWANG, L.S.; SKIRVIN, R.M.; CASYAO, J. & BOUWKAMP, J. Adventitious shoot formation from sections of sweet potato grown in vitro. Scientia Horticulturae, Wageningen, 20:119-29, 1983.
25. JANOS, D.P. Mycorrhizal fungi: agents or symptoms of tropical community composition. In: NORTH AMERICAN CONFERENCE ON MYCORRHIZAE, 6, Oregon, 1985. Proceedings... Oregon, 1985. p.98-103.
26. JARRET, R.L.; SALAZAR, S. & FERNANDES, Z. Somatic embryogenesis in sweet potato. HortScience, Alexandria, 19(3):397-8, June 1984.

27. KASSANIS, B. & VARMA, A. The production of virus free clones of some british potato varieties. Annals Applied Biology, London, 59:447-50, 1967.
28. LANGHANS, R.W.; HORST, R.K. & EARLE, E.D. Disease free plants via tissue culture propagation. HortScience, St. Joseph, 12(2):149-50, Apr. 1977.
29. LIAO, C.H. & CHUNG, M.L. Shoot tip culture and virus indexing in sweet potato. Journal Agriculture Research of China, Taiwan, 28:139-44, 1979.
30. LINSMAIER, E.M. & SKOOG, F. Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum, Copenhagen, 18:100-27, 1965.
31. LITZ, R.E. & CONOVER, R.A. In vitro propagation of sweet potato. HortScience, Alexandria, 13(6):659-60, Oct. 1978.
32. LIU, J.R. & CANTLIFE, D.J. Somatic embriogenesis and plant re generation in tissue culture of sweet potato (Ipomoea batatas (L) Lam) leaf, shoot tip, stem and root explant culture. Plant Cell Report, New York, 3(3):112-5, 1984.
33. LOPES, E.S.; SIQUEIRA, J.O. & ZAMBOLIM, L. Caracterização das micorrizas vesicular-arbusculares (MVA) e seus efeitos no crescimento das plantas. Revista Brasileira de Ciências do Solo, Campinas, 7(1):1-9, jan./abr. 1983.

34. LOVE, S.L. & RHODES, B.B. Improved methods for meristem culture of sweet potatoes. HortScience, Alexandria, 20(4):655, Aug. 1985. (Conference Abstract).
35. LUO, H. A report on the experiment of making shoot tips of sweet potato free from virus propagation. International Symposium Genetic Manipulation Crops, 1984. p.79. In: DERWENT BIOTECHNOLOGY ABSTRACTS, New York, 4(20):50, Abst. 8510076, Oct. 1985.
36. MARTIN, W.J. Virus diseases. In: Thirty years of cooperative sweet potato research 1939-1969. Baton Rouge, Louisiana Agricultural Experimental Station, 1980. p.49-55. (Southern Cooperative Series Bulletin, 159).
37. MATTHEWS, R.E.F. Replication and movement. In: _____. Plant virology. New York, Academic Press, 1970. cap.7, p.165-225.
38. MELLOR, F.C. & STACE-SMITH, R. Virus free potatoes by tissue culture. In: REINERT, J. & BAJAJ, Y.P.S. Applied and fundamental aspects of plant cell tissue and organ culture. Berlin, Springer-Verlag, 1977. p.616-46.
39. MIRANDA, J.E.C.; FRANÇA, F.H.; SOUZA, A.F. & AGUILAR, J.A.E. Cultivo da batata doce (Ipomoea batatas (L) Lam.). Brasília, EMBRAPA-CNPQ, 1984. 7p. (Instruções Técnicas, 7).
40. MORI, K. Production of virus-free plant by means of meristem culture. Journal of Agricultural Research of Quenia, 6:1-7, 1971.

41. MOSSE, B. Plant growth responses to vesicular-arbuscular mycorrhiza. Annual Review Phytopathology, Palo Alto, 11:171-96, 1973.
42. MURASHIGE, T. Plant propagation through tissue culture. Annual Review Plant Physiology, Palo Alto, 25:135-66, 1974.
43. _____ & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. Physiologia Plantarum, Copenhagen, 15(3):473-97, 1962.
44. NIELSEN, L.W. Elimination of the internal cork virus by culturing apical meristems of infected sweet potatoes. Phytopathology, St. Paul, 50(11):840-1, Nov. 1960.
45. NOME, F.S. & SALVADORES, M.C. Obteccion de plantas de batata (Ipomoea batatas (L) Lam) libres de virus. Revista de Ciencias Agropecuarias, Cordoba, 1:9-21, jun. 1980.
46. OVER DE LINDEN, A.J. & ELLIOTT, R.F. Virus infection in Ipomoea batatas and a method for its elimination. New Zealand Journal of Agricultural Research, New Zealand, 14:720-4, 1971.
47. PATERSON, D.R.; TABER, R.A.; CUSHMAN, K.E. & EARHART, D.R. Influence of mycorrhizal infection on growth and storage root initiation of Ipomoea batatas under four nutritional regimes. HortScience, Alexandria, 20(4):654, Aug. 1985. (Conference Abstract).

48. PAULA, M.A. & SIQUEIRA, J.O. Efeitos da umidade do solo sobre a simbiose endomicorrízica em soja. II. Crescimento, nutrição e relação água-planta. Revista Brasileira de Ciências do Solo, Campinas, 11:289-93, 1987.
49. PEIXOTO, N. & MIRANDA, J.E.C. Cultivo da batata doce em Goiás. Goiânia, EMGOPA, 1984. 24p. (Circular Técnica, 7).
50. QUAK, F. Meristem culture and virus free plants. In: REINERT, J. & BAJAJ, Y.P.S. Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture, Berlin, Springer-Verlag, 1977. cap.5, p.598-615.
51. SCOOT, L.E.; HARRIS, H.; CONSTANTIN, R.J.; BOGGESE, T.S. & HOOVER, M.W. Processing. In: Thirty years of cooperative sweet potato research 1939-1969, Baton Rouge, Louisiana Agricultural Experimental Station, 1980. p.39-45. (Southern Cooperative Series Bulletin, 159).
52. SHENK, R.V. & HILDEBRANDT, A.C. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. Canadian Journal of Botany, Ottawa, 50:199-204, 1972.
53. SIHACHAKR, P. Premiers resultats concernant la multiplication vegetative in vitro de la patate douce (Ipomoea batatas (L) Lam., Convolvulacea). Agronomi Tropicale, Paris, 37(2): 142-51, avr./juin 1982.

54. SIHACHAKR, P. & OSSE, A. Analyse du polimorphisme radical observe chez divers explants de patate douce (Ipomoea batatas) mis en culture in vitro. Phytomorphology, Delhi, 31(1/2): 112-21, Mar./June 1981.
55. SMALL virus free sweet potato roots for international testing. Centerpoint, Taiwan, 3(6):1-4, Dec. 1984.
56. STEINBAUER, C.E. & KUSHMAN, L.J. Sweet potato culture and diseases. Washington, Agriculture Research Service, 1971. 74p. (Agric. Handbook, 38).
57. TEMPLETON-SOMERS, K.M. & COLLINS, W. Genetic variation in sweet potato tissue culture - calus culture: culture medium effect. HortScience, Alexandria, 20(4):664, Aug. 1985. (Conference Abstract).
58. TINKER, P.B. Soil chemistry of phosphorus effect on plant growth. In: SANDERS, F.E.; MOSSE, B. & TINKER, P.B., eds. Endomycorrhizas. London, Academic Press, 1975. p.353-71.
59. _____ & GILDON, A. Mycorrhizal fungi and ion uptake. In: ROBB, D.A. & PIERPOINT, W.S., eds. Metal and micronutrients uptake and utilization by plants. London, Academic Press, 1983. p.21-32. (Phytochemical Society of Europe Symposia Series, 21).
60. TSAI, H.S. & LIN, C.I. The grow of calus induced from in vitro culture of sweet potato anthers. Journal of Agriculture Association of China, Taipei, 81:12-9, 1973.

61. TSAI, H.S. & TSENG, M.T. Embryoid formation and plantlet re - generation from anther calus of sweet potato. Botanical Bulletin Academia Sinica, Shangai, 20:117-22, 1979.

4 62. WHITE, P.R. The cultivation of animal and plant cells. 2.ed. New York, Ronald, 1963. 228p.