

Influência da concentração de BAP e AG₃ no desenvolvimento *in vitro* de mandioquinha-salsa

Nuno R. Madeira¹; João B. Teixeira²; Célia T. Arimura³; Cristina S. Junqueira²

¹Embrapa Hortaliças, C.Postal 218, 70359-970 Brasília-DF; ²Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Parque Estação Biológica, 70770-900 Brasília-DF; ³UEMG - Campus Ituiutaba, C..Postal 431, 38302-192 Ituiutaba-MG

RESUMO

Foram realizados dois experimentos com o objetivo de avaliar o efeito das concentrações de BAP e de AG₃ no desenvolvimento *in vitro* de mandioquinha-salsa. Foram avaliadas as concentrações de 0,0; 0,2 e 0,4 mg L⁻¹ de BAP e de 0,0; 0,125 e 0,250 mg L⁻¹ de AG₃ no desenvolvimento de ápices caulinares com cerca de 2 mm das cultivares Amarela de Senador Amaral e Amarela Comum. A interação cultivares x concentração de BAP não foi significativa para nenhuma das características avaliadas (P>0,0617). O aumento na concentração de BAP reduziu a formação de calos; entretanto, promoveu proporcionalmente redução no desenvolvimento da parte aérea. A concentração de BAP que apresentou os melhores resultados foi em torno de 0,3 mg L⁻¹ de BAP, conciliando diâmetro de calo relativamente reduzido e bom desenvolvimento da parte aérea, cerca de 4,5 brotos com altura média de 43 mm. A interação cultivares x concentração de AG₃ não foi significativa para nenhuma das características avaliadas (P>0,4310). O aumento na concentração de AG₃ promoveu elevação significativa na altura média e máxima das brotações e aumento no tamanho de calos. Nos dois experimentos, observou-se maior número de brotações na cultivar Amarela Comum.

Palavras-chave: *Arracacia xanthorrhiza*, benzilaminopurina, ácido giberélico.

ABSTRACT

Influence of BAP and GA₃ concentration on the *in vitro* development of arracacha

Two experiments were carried out to evaluate the effect of BAP and GA₃ concentrations on the *in vitro* arracacha development. The concentrations tested were 0.0; 0.2 and 0.4 mg L⁻¹ of BAP and 0.0; 0.125 and 0.250 mg L⁻¹ of GA₃ in the shoot tips with about 2 mm of arracacha, cultivars Amarela de Senador Amaral and Amarela Comum. The interaction of cultivars x BAP concentration was not significant for any one of the evaluated variables (P>0,0617). The increase in the BAP concentration reduced the callus formation; however, promoted larger reduction in the shoot development. The best BAP concentration was around 0.3 mg L⁻¹, with relatively reduced callus diameter and good development of shoot, with a mean of 4.5 shoots and a height of 43 mm. The interaction of cultivars x GA₃ concentration was not significant for any one of the studied variables (P>0,4310). The increase in the GA₃ concentration promoted the improvement in the mean and maximum height of the shoots and in callus size. More shoots were observed for Amarela Comum cultivar in both trials.

Keywords: *Arracacia xanthorrhiza*, 6-benzilaminopurine, gibberellic acid.

(Recebido para publicação em 7 de junho de 2004 e aceito em 31 de julho de 2005)

A micropropagação *in vitro* pode ser útil na produção de plantas com alta qualidade sanitária, isentas de vírus, além de ser uma ferramenta importante para a manutenção e o intercâmbio de germoplasma (HERMANN, 1997; ASSIS, 1999; FLETCHER; FLETCHER, 2001).

Alguns trabalhos já foram realizados na área de micropropagação de mandioquinha-salsa no Brasil e no exterior (PESSOA et al., 1994; LUZ et al., 1997).

Castillo (1991), Cevallos e Castillo (1991) e Duque (1993) recomendam para o cultivo *in vitro* de mandioquinha-salsa o meio básico MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) adicionado de 3% de sacarose e de 0,25 mg L⁻¹ de AG₃.

Castillo (1991) verificou rápida formação de calos durante a micropropagação de ápices caulinares,

aspecto não desejado por ser promotor de modificações genéticas e por exaurir os nutrientes em detrimento da formação de folhas e raízes (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1990). Para minimizar este problema, recomenda subcultivos *in vitro*, formando plântulas normais.

Senna Neto (1990), trabalhando com o clone BGH 5746, comumente chamado de 'Amarela de Caranda' ou 'Amarela Comum', avaliou diferentes meios de cultivo e concentrações de fitoreguladores com a finalidade de induzir a diferenciação de ápices caulinares com dois primórdios foliares de mandioquinha-salsa. Concluiu que os meios MS, Knudson e White não foram eficientes, havendo paralisação do crescimento e desenvolvimento de plantas. Nos meios MS e White o crescimento foi muito lento e irregular, com ausência de folhas expandidas e presença de

folhas afiladas (pontiagudas). 0,01 e 0,02 mg L⁻¹ de ácido naftaleno acético (ANA) e 0,6, 1,0 e 1,4 mg L⁻¹ de 6-benzilaminopurina (BAP) no meio de Gamborg promoveram desenvolvimento lento e irregular. Os melhores resultados para o desenvolvimento do sistema radicular e da parte aérea foram obtidos com o meio de Gamborg suplementado de 0,02 mg L⁻¹ de ANA + 0,1- 0,2 mg L⁻¹ de BAP.

Luz (1993), visando obter plantas de mandioquinha-salsa a partir da cultura de meristemas e de sua micropropagação, obteve melhor desenvolvimento com a combinação de 0,1 mg L⁻¹ de ANA + 0,2 mg L⁻¹ de BAP acrescido ao meio de cultivo B5 (GAMBORG, 1968). Na fase de multiplicação, os melhores resultados foram obtidos em meio de cultura B5 acrescido de 0,1 e 0,2 mg L⁻¹ de BAP.

Este trabalho objetivou avaliar o efeito das concentrações de BAP e de AG₃, de modo a tornar mais eficiente o protocolo de micropropagação *in vitro* de mandioquinha-salsa.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram realizados dois experimentos relativos à cultura de tecidos de mandioquinha-salsa. No primeiro, realizado no laboratório de cultura de tecidos da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen) em março-abril de 2002, estudaram-se diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP); no segundo, realizado no laboratório de cultura de tecidos da Embrapa Hortaliças em setembro-outubro de 2002, foram avaliadas diferentes concentrações de ácido giberélico (AG₃).

O meio de cultura utilizado foi o B5 (GAMBORG, 1968), acrescido de 0,1 mg L⁻¹ de ácido naftalenoacético (ANA), com base nos resultados positivos obtidos por Senna Neto (1990) e Luz (1993).

No primeiro experimento, foram avaliadas as concentrações de 0; 0,2 e 0,4 mg L⁻¹ de BAP. No segundo, a partir dos resultados obtidos no primeiro experimento, fixando-se a concentração de BAP em 0,3 mg L⁻¹, foram avaliadas as concentrações de 0; 0,125 e 0,250 mg L⁻¹ de AG₃. Para todos os meios, adicionaram-se sacarose a 3% e ágar a 0,7%. Os experimentos foram implantados em um fatorial 2 x 3, representando duas cultivares (Amarela de Senador Amaral e Amarela Comum) e três concentrações de BAP no primeiro experimento e de AG₃ no segundo experimento, dispostos no delineamento experimental inteiramente casualizado com quatro repetições.

A desinfestação do material oriundo do campo foi feita inicialmente na sala de preparo, por imersão em álcool 70% e água destilada. Em seguida, na sala de transferência em capela de fluxo laminar, realizou-se a imersão em solução de hipoclorito de sódio a 1,25% por 10 minutos, seguida por três enxágües em água autoclavada.

Os explantes utilizados foram ápices caulinares com cerca de 2 mm extraídos de plantas matrizes vigorosas com seis meses, sem sintomas visuais de doenças e cultivados individualmente em tubos de ensaio, utilizando-se cerca de 15 ml de meio autoclavado por tubo.

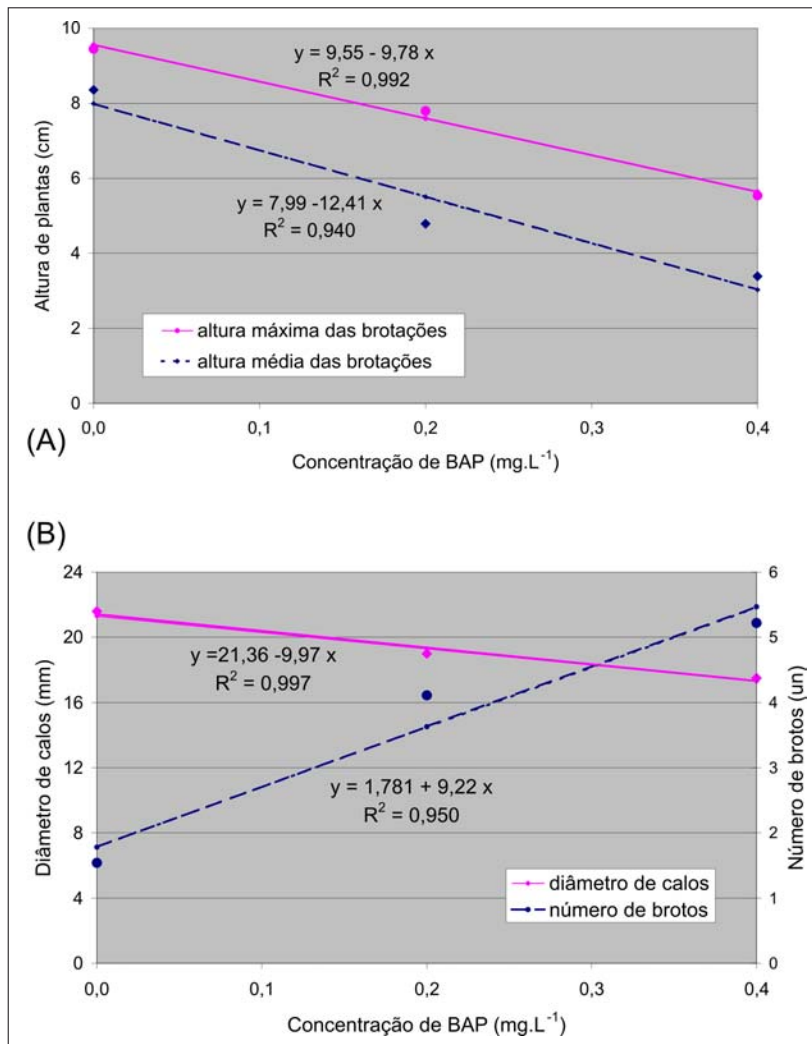


Figura 1. Altura média e máxima das brotações (A) e número de brotos e diâmetro de calos (B) em função da concentração de BAP. Brasília, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2002.

Estes foram mantidos em salas de crescimento a 25±2°C com 14 horas de fotoperíodo e iluminação fluorescente com intensidade luminosa de 110 μmol m⁻² s⁻¹.

As taxas de contaminação e de regeneração, o número e altura de brotos, o número de raízes e o diâmetro dos calos foram avaliados após quatro semanas.

Efetuem-se análises de variância e testes de média Tukey para cultivares e análises de regressão para concentrações de BAP e AG₃.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A interação cultivares x concentração de BAP não foi significativa para

nenhuma das características avaliadas (P>0,0617).

Não foram observadas diferenças significativas com relação à taxa de contaminação, cujo valor médio neste experimento foi de 8,4%.

A ausência de BAP levou à formação de plantas estioladas, com poucas brotações. À medida que se elevou a concentração de BAP, observou-se a formação de plantas com menor altura (Figura 1A), porém com maior número de brotações (Figura 1B).

Na cultivar Amarela Comum (AC), foram obtidos 4,1 brotos, significativamente superior aos 3,2 brotos obtidos com a cultivar Amarela de Senador Amaral (ASA). O comportamento das

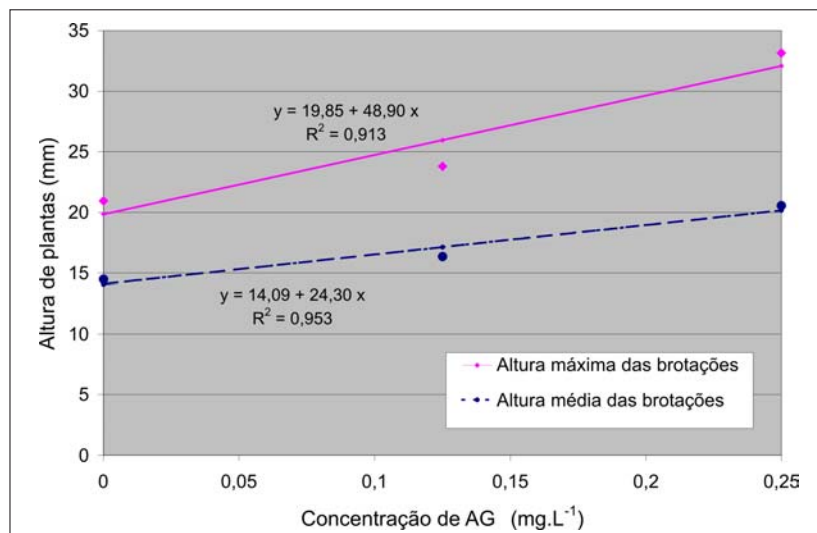


Figura 2. Altura média e máxima das brotações em função da concentração de AG₃. Brasília, Embrapa Hortaliças, 2002.

duas cultivares foi semelhante nas demais características avaliadas: taxa de sobrevivência (96,7% em AC e 99,0% em ASA), diâmetro de calos (19,9 mm em AC e 18,9 mm em ASA), altura média de brotos (55,4 mm em AC e 54,8 mm em ASA), altura máxima de brotos (78,8 mm em AC e 73,2 mm em ASA) e número de raízes (0,2 em AC e 0,3 em ASA).

O aumento na concentração de BAP reduziu o tamanho dos calos formados na parte basal das plantas (Figura 1B). Um calo basal de tamanho excessivo é indesejável por ser potencial promotor de modificações genéticas e por exaurir os nutrientes do meio de cultura em detrimento da formação de folhas e raízes (CASTILLO, 1991). As concentrações de BAP utilizadas, recomendadas por Senna Neto (1990) e Luz (1993), levaram à produção de plantas com elevado tamanho de calo na parte basal. Aumentando-se a concentração de BAP, reduziu-se este efeito. Por outro lado, não se pode elevar muito sua concentração, por inibir o desenvolvimento da parte aérea (Figura 1A). Portanto, buscou-se o balanço ideal para concentração de BAP, isto é, um ponto intermediário que combinasse o bom desenvolvimento da parte aérea, em tamanho e número de brotos, com menor tamanho do calo basal. Concentrações em torno de 0,3 mg L⁻¹ de BAP foram as que proporcionaram o melhor desenvolvimento para as três características consideradas. O modelo

linear ajustado, considerando o intervalo estudado, apresentou elevado coeficiente de determinação para as três características morfológicas avaliadas (tamanho do calo basal, $r^2 > 0,997$; número de brotos, $r^2 > 0,950$; e tamanho de brotos, $r^2 > 0,940$).

No segundo experimento, a interação cultivares x concentração de AG₃ não foi significativa para nenhuma das características avaliadas ($P > 0,4310$).

A taxa de contaminação média foi de 7,3% neste segundo experimento, não havendo diferenças significativas entre os tratamentos.

O aumento na concentração de AG₃ promoveu elevação na altura média e máxima das brotações (Figura 2), sem aumentar o tamanho do calo basal, demonstrando o efeito benéfico promovido por este regulador de crescimento no desenvolvimento *in vitro* de mandioquinha-salsa, em concordância com Castillo (1991), Cevallos e Castillo (1991) e Duque (1993) que trabalharam com o meio MS. Por outro lado, Senna Neto (1991) e Luz (1993) concluíram que o meio B5 era superior ao meio MS, possivelmente pela menor concentração de sais. No entanto, Senna Neto (1991) e Luz (1993) não avaliaram o uso de ácido giberélico adicionado ao meio B5. Este trabalho vem, portanto, confirmar o efeito benéfico do AG₃ adicionado ao meio B5, considerando o intervalo que

vai de 0 a 0,25 mg L⁻¹, à semelhança do que foi verificado no meio MS.

A cultivar Amarela Comum apresentou tamanho de calo basal de 7,6 mm e 3,5 brotos, significativamente maior que na cv. Amarela de Senador Amaral, onde o tamanho médio de calo foi de 6,3 mm e o número médio de brotos foi de 2,7. Quanto às demais características avaliadas, o comportamento foi semelhante nas duas cultivares: taxa de sobrevivência (90,0% em AC e 84,2% em ASA), altura média de brotos (17,1 mm em AC e 17,2 mm em ASA) e altura máxima de brotos (26,0 mm em AC e 25,9 mm em ASA). Não foi observada formação de raízes em nenhuma planta.

Com a avaliação conjunta dos dois experimentos, concluiu-se que os melhores resultados foram obtidos com concentrações em torno de 0,3 mg L⁻¹ de BAP e com 0,25 mg L⁻¹ de AG₃ adicionado ao meio B5.

O estabelecimento de um protocolo eficiente de produção de mudas de mandioquinha-salsa com alta qualidade sanitária e fisiológica a partir da cultura de tecidos será útil na obtenção de plantas com elevado potencial produtivo. Esta técnica pode minimizar problemas decorrentes da perda de vigor que vem ocorrendo no campo após ciclos sucessivos de cultivo dos materiais tradicionalmente cultivados nas principais regiões produtoras, provavelmente pelo acúmulo de patógenos degenerativos, especialmente vírus.

LITERATURA CITADA

- ASSIS, M. Novas tecnologias na propagação de batata. *Informe Agropecuário*, Belo Horizonte, v.20, n.197, p.30-33, 1999b.
- CASTILLO, R. Manejo e conservação de germoplasma de tuberosas andinas. *Informe final de consultoria para el Centro Internacional de la Papa (CIP)*. CIP: Quito, 1991. 7 p.
- CEVALLOS, A.; CASTILLO, R. Respuesta de ocho líneas de zanahoria blanca (*Arracacia xanthorrhiza* B.) a la introducción *in vitro*. In: REUNION NACIONAL SOBRE RECURSOS FITOGENETICOS, 1., 1991, Quito. *Memorias...* Quito: INIAP, 1991. p.109-115.
- DUQUE, L.M. *Compilacion de los medios de cultivo in vitro de raices y tuberculos andinos en el CIP*. [Zanahoria blanca]. Quito: CIP, 1993. 2 p.
- FLETCHER, P.J.; FLETCHER, J.D. *In vitro* virus elimination in three Andean root crops: Oca (*Oxalis tuberosa*), ulluco (*Ullucus tuberosus* Caldas) and arracacha (*Arracacia xanthorrhiza*). *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, Auckland, v.29, n.1, p.23-27, 2001.

- GAMBORG, O.L.; MILLER, R.A.; OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell research*, n.50, p.151-158, 1968.
- GRATTAPAGLIA, P.; MACHADO, M.A. Micropropagação In: Torres, A.C.; Caldas, L.S. *Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas*. Brasília: ABCTP/Embrapa Hortaliças, 1990. p.99-169.
- HERMANN, M. Arracacha (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft) *Andean roots and tubers: Ahípa, arracacha, maca and yacon. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops*. 21. Gatersleben, Germany e Rome, Italy: IPGRI, 1997. p.75-172.
- LUZ, J.M.Q. *Obtenção "in vitro" de plantas de mandioquinha-salsa (Arracacia xanthorrhiza Bancroft) via cultura de meristemas*. 1993. 52 f. (Tese mestrado em Fitotecnia) - ESAL, Lavras.
- LUZ, J.M.Q.; PASQUAL, M.; SOUZA, R.J. Cultura de tecidos e biotecnologia em mandioquinha-salsa. *Informe Agropecuário*, Belo Horizonte, v.19, n.190, p.18-21, 1997.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, v.15, p.473-497, 1962.
- PESSOA, A.C.S.; VIEIRA, R.C.; ESQUIBEL, M.A. Introduction and histogenesis of calli from petiole explants of Peruvian carrot (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft) *Arquivos de Biologia e Tecnologia*, v.37, n.2, p.231-246, 1994.
- SENNA NETO, N. *Micropropagação de mandioquinha-salsa (Arracacia xanthorrhiza Bancroft)*. 1990. 53 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – UFV, Viçosa.
-