

MICROPROPAGAÇÃO DE *Dioscorea multiflora* Grised

Micropropagation of *Dioscorea multiflora* Grised

Ana Valéria de Souza¹, Bianca Waléria Bertoni²,
Suzelei de Castro França², Ana Maria Soares Pereira²

RESUMO

Dioscorea multiflora uma planta nativa do Sul do Brasil produz a diosgenina como metabólito secundário majoritário, uma substância potencialmente usada pela indústria farmacêutica para a produção de cortisona e substâncias com ação contraceptiva. Objetivou-se, neste trabalho otimizar o protocolo de micropropagação de *D. multiflora*, visando a produção de mudas em escala comercial. Segmentos nodais subcultivados em meio MS sólido foram transferidos para multiplicação em meio MS suplementado com BAP (0,01; 0,1; 0,5; 1,0 e 3,0 mg L⁻¹) e meio MS suplementado com 0,1 mg L⁻¹ ou 0,5 mg L⁻¹ de BAP acrescido de diferentes concentrações de sacarose (2, 4, 6, 8 e 10%). Para o enraizamento, as brotações foram cultivadas em meio MS suplementado com AIB (0,1; 0,5; 1,0 e 3,0 mg L⁻¹) e meio MS suplementado com ANA (0,1; 0,5; 1,0 e 3,0 mg L⁻¹). Os experimentos *in vitro* foram instalados em delineamento experimental inteiramente casualizado e cada tratamento constituiu-se de 3 repetições e 10 cubetas/parcela. Plântulas com e sem raízes foram aclimatizadas em casa de vegetação. Melhores resultados de multiplicação e enraizamento foram obtidos em meio MS + 0,1 mg L⁻¹ de BAP (80%) e em meio MS + 1,0 mg L⁻¹ de AIB (42,6%), respectivamente. Não houve diferença quanto à porcentagem de sobrevivência das plântulas *in vitro* e *ex vitro* durante a aclimatização (75%). O protocolo de micropropagação para *D. Multiflora* é efetivo e pode ser usado para a produção em escala comercial.

Termos para indexação: Diosgenina, cultivo *in vitro*, aclimatização.

ABSTRACT

Dioscorea multiflora is a plant native to southern Brazil that produces diosgenin as a major secondary metabolite, a substance which is used by the pharmaceutical industry for the production of cortisone and substances with contraceptive action. The objective of this work was to optimize the micropropagation protocol of *D. multiflora*, for the production of seedlings on a commercial scale. Nodal segments subcultured in solid MS medium were transferred for multiplication to MS medium supplemented with BAP (0.01, 0.1, 0.5, 1.0 and 3.0 mg L⁻¹) and MS medium supplemented with 0.1 mg L⁻¹ or 0.5 mg L⁻¹ BAP plus different concentrations of sucrose (2, 4, 6, 8 and 10%). For rooting, the shoots were cultured on MS medium supplemented with IBA (0.1, 0.5, 1.0 and 3.0 mg L⁻¹) and MS medium supplemented with NAA (0.1, 0.5, 1.0 and 3.0 mg L⁻¹). A completely randomized design was used with treatment consisting of 3 replicates with 10 buckets per plot. Seedlings with and without roots were acclimatized in a greenhouse. The best results of multiplication and rooting were obtained in MS medium + 0.1 mg L⁻¹ BAP (80%) and in MS medium + 1.0 mg L⁻¹ IBA (42.6%), respectively. There was no difference in the survival percentage of seedlings *in vitro* and during *ex vitro* acclimatization (75%). The micropropagation protocol for production of *D. multiflora* is effective and can be used for commercial production.

Index terms: Diosgenin, *in vitro* cultivation, acclimatization.

(Recebido em 18 de junho de 2009 e aprovado em 17 de março de 2010)

INTRODUÇÃO

A família Dioscoreaceae é composta por 850 espécies distribuídas em nove gêneros, sendo o mais representativo o gênero *Dioscorea*, com 600 espécies encontradas nas regiões temperadas e tropicais do planeta (Melo Filho et al., 2000; Shu yu Shu, 2000; Pedralli et al., 2002). O interesse econômico por espécies de *Dioscorea* foi despertado na década de 30, quando Takamoto & Ueno (1936), conseguiram isolar a diosgenina, a partir de tubérculos de *Dioscorea tokoro*. Essa substância é destacada entre as mais importantes

dentro do grupo das saponinas esteroidais, devido à possibilidade de sua utilização na produção de cortisona e substâncias com ação contraceptiva.

A elucidação de métodos para a transformação da diosgenina em hormônios foi um marco relevante para a indústria farmacêutica (Chaturvedi, 1979; Zullo et al., 1987; Niño et al., 2007) e, atualmente, a maior parte do material coletado em regiões de ocorrência das espécies do gênero, tem como finalidade o fornecimento de matéria-prima para a extração dessa substância (Zullo et al., 1987; Itharat et al., 2004; Sautour et al., 2004; Niño et al., 2007; Olayemi &

¹Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária/Embrapa – Centro de Pesquisa Agropecuária Trópico Semiárido/CPATSA – Km 458 – Zona Rural – Cx. P. 601 – 56304-010 – Petrolina, PE – ana.valeria@cpatsa.embrapa.br

²Universidade de Ribeirão Preto/UNAERP – Departamento de Biotecnologia de Plantas Medicinais – Ribeirão Preto, SP

Ajaiyeoba, 2007). Dentre as espécies mais exploradas e com maior rendimento de diosgenina (1%), encontra-se a *Dioscorea multiflora*, nativa da região sul do Brasil (Costa & Mukherjee, 1984).

No levantamento bibliográfico realizado para *D. multiflora*, pode-se perceber que a taxonomia para as espécies do gênero é problemática, devido ao número elevado e ainda pouco descritas. Mas todas são conhecidas popularmente como inhame ou cará, são trepadeiras herbáceas, formam rizomas ou tubérculos e apresentam plantas dióicas. As flores masculinas são inconspícuas e pequenas e nascem em panículas produzidas nas axilas das folhas. As flores femininas são maiores que as masculinas e nascem em espigas que saem das axilas das folhas. O ovário possui três lóculos, sendo cada um deles com dois óvulos, com três estigmas (Coursey, 1980; Pedralli et al., 2002).

Monteiro & Peressin (2002), destaca que o florescimento de todas as espécies do gênero *Dioscorea* em condições brasileiras é raro. Sendo assim, toda a propagação das plantas é realizada assexuadamente. Contudo, ainda não há um programa consistente de produção comercial de mudas ou assistência técnica adequada para o cultivo ou manejo sustentável de populações naturais de *D. multiflora*, o que pode comprometer a conservação e a propagação dos genótipos de interesse, principalmente quando se considera que o sistema subterrâneo é, ao mesmo tempo, a fonte de matéria-prima empregada na extração da diosgenina e o material utilizado para a propagação. Alizadeh et al. (1998), ressaltam que, uma das maiores dificuldades encontradas para o cultivo em escala comercial de todas as espécies do gênero, é a variação nos níveis de diosgenina acumulados nos tubérculos.

Considerando que a técnica da propagação *in vitro* de plantas possibilita a preservação e a reprodução das características desejáveis da planta matriz, a obtenção de elevado número de plantas num curto período de tempo e espaço reduzido, em excelentes condições fitossanitárias (Bajaj et al., 1988; Grattapaglia & Machado, 1998; Pasqual, 2001), essa foi apontada como o método mais adequado para produção em escala comercial de clones de *D. multiflora*.

Objetivou-se, neste trabalho, estabelecer um protocolo eficiente de micropropagação de *Dioscorea multiflora*, para que possa ser utilizado como alternativa na produção de mudas em escala comercial e conservação de genótipos da espécie.

MATERIAL E MÉTODOS

Realizaram-se os trabalhos no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do Departamento de

Biotecnologia de Plantas Medicinais da Universidade de Ribeirão Preto (UNAERP), em Ribeirão Preto, SP. Plantas de *D. multiflora*, foram coletadas no município de Araucária, PR e um exemplar foi destinado diretamente à realização dos experimentos.

Como fonte de explantes iniciais, utilizaram-se segmentos nodais (1 cm) lavados durante duas horas em água corrente, posteriormente imersos em solução de fungicida sistêmico (0,2% p/v) por 24 horas e transferidos para solução de hipoclorito de sódio (0,5% p/v), por 30 minutos. Os explantes foram inoculados diretamente em meio MS sólido (Murashige & Skoog, 1962), onde permaneceram durante duas semanas, para o estabelecimento *in vitro*.

Para a indução de múltiplas brotações nos explantes, instalaram-se dois experimentos de multiplicação: 1) MS suplementado com 0,01; 0,1; 0,5; 1,0 e 3,0 mg L⁻¹ de BAP (6-benzilaminopurina), totalizando cinco tratamentos; 2) MS suplementado com 0,1 mg L⁻¹ ou 0,5 mg L⁻¹ de BAP acrescido de 2, 4, 6, 8 e 10% de sacarose em esquema fatorial (2x5), totalizando 10 tratamentos.

Para o enraizamento das brotações, também foram instalados dois experimentos: 1) MS suplementado com 0,1; 0,5; 1,0 e 3,0 mg L⁻¹ de AIB (ácido indol-butírico); 2) MS suplementado com 0,1; 0,5; 1,0 e 3,0 mg L⁻¹ de ANA (ácido naftaleno-acético).

Plântulas com e sem raízes foram transferidas para vasos de polietileno de 2 litros, contendo areia para aclimatização em casa de vegetação. As plântulas foram irrigadas diariamente e a umidade foi mantida com a sobreposição de frascos de vidro transparente (5 cm de diâmetro x 8,5 cm de altura), sobre cada plântula durante 40 dias.

Para a instalação dos experimentos *in vitro* utilizou-se 10 mL de meio solidificado com 3 g L⁻¹ de fitagel® e o pH foi aferido para 6 ± 0,1, antes da autoclavagem. Foram utilizadas cubetas de vidro (85 mm x 15 mm) vedadas com tampa plástica e com plástico do tipo parafilme. As cubetas foram mantidas em sala de crescimento sob condições controladas de temperatura 26±1° C, fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de 25 μmol m⁻² s⁻¹ fornecida por lâmpadas do tipo fluorescente branca fria.

Os experimentos de multiplicação e enraizamento *in vitro* foram instalados em delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC) e cada tratamento constituiu-se de três repetições e 10 cubetas/parcela. As avaliações foram realizadas aos 60 dias quanto ao número, comprimento das brotações e porcentagem de explantes com brotos e quanto à porcentagem de plântulas enraizadas e número de raízes por plântula.

Para o experimento de aclimatização, utilizaram-se 50 plântulas enraizadas e 50 plântulas não enraizadas e a avaliação foi realizada após 90 dias quanto ao índice de sobrevivência das plântulas e enraizamento *ex vitro*.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O método empregado na assepsia de *D. multiflora* foi eficiente na desinfestação dos segmentos nodais, com 90% de descontaminação. O trabalho realizado por Kulkarni et al. (2007), com sementes de *Dioscorea drageana* indicou a efetividade do cloreto de mercúrio na descontaminação de explantes. Entretanto, o procedimento de assepsia utilizando fungicida e hipoclorito de sódio utilizado no presente trabalho é certamente mais vantajoso devido à baixa toxicidade e reduzido impacto ambiental desses compostos, quando comparado ao cloreto de mercúrio. Os resultados com *D. multiflora* corroboram com os trabalhos realizados por Pereira et al. (2000) e Biondo et al. (2007), quando obtiveram êxito na assepsia de segmentos nodais para multiplicação *in vitro* de *Pothomorphe umbellata* e *Mandevilla velutina*, respectivamente.

A otimização de protocolos de micropropagação com êxito depende da elucidação de vários fatores diretamente envolvidos no processo. Para o início dos trabalhos, dois fatores são importantes e devem ser considerados: o tipo de explante a ser utilizado para o estabelecimento da cultura *in vitro* e a assepsia. Dentre os tipos de explantes mais utilizados, as gemas apicais e axilares e os segmentos nodais, promovem clones “true-to-type”, ou seja, idênticos à planta matriz e por isso são os mais indicados para a multiplicação e conservação *in vitro* de genótipos elites e, a assepsia determinará a possibilidade ou não de continuação dos trabalhos, no que se refere à obtenção de culturas totalmente axênicas. Vários autores ressaltam que os cuidados iniciais na seleção e na desinfestação dos explantes são fundamentais para o sucesso do cultivo *in vitro* (Bajaj et al., 1988; Grattapaglia & Machado, 1998; Pasqual, 2001; Moraes et al., 2007).

Para a indução de brotações múltiplas nos segmentos nodais, observou-se que a espécie respondeu significativamente à ação de reguladores vegetais testados. A adição de baixas concentrações de BAP (0,01 mg L⁻¹) ao meio MS foi suficiente para induzir a multiplicação *in vitro*. No entanto, maior porcentagem de explantes brotados (80%) foi obtida em 0,1 mg L⁻¹ de BAP. Quando adicionou-se 3,0 mg L⁻¹ de BAP ao meio de multiplicação, não ocorreu desenvolvimento de gemas. Concentrações de BAP superiores a 1,0 mg L⁻¹ podem ter causado um efeito fitotóxico nos explantes, e por isso, a porcentagem de brotações foi significativamente menor quando comparada ao resultado obtido em 0,1 mg L⁻¹ (Tabela 1). Alguns autores relatam que o BAP, por ter um efeito mais expressivo quanto à multiplicação *in vitro*, quando comparado às outras citocininas, pode realmente, apresentar fitotoxicidade em algumas espécies quando utilizado em concentrações relativamente altas, acarretando um efeito negativo quando o objetivo é a indução de múltiplos brotos (Grattapaglia & Machado, 1998; Pasqual, 2001; Souza et al., 2007).

Esta afirmativa tem sido cada vez mais consolidada, segundo os resultados apresentados nos inúmeros trabalhos desenvolvidos visando à propagação *in vitro* de espécies de interesse. Em estudos realizados por Chen et al. (2003), Kadota & Niimi (2004) e Poornima & Ravishankar Raí (2007), sobre o efeito do BAP na multiplicação *in vitro* de *Dioscorea zingiberensis*, *Dioscorea japonica* e *Dioscorea oppositifolia* e *Dioscorea pentaphylla*, respectivamente, os autores observaram que melhores respostas, quanto à multiplicação de *in vitro*, também ocorreram quando menores concentrações dessa citocinina foram adicionadas ao meio de cultura, corroborando com os resultados obtidos neste trabalho.

O efeito negativo atribuído a altas concentrações de BAP quanto à indução de múltiplos brotos *in vitro*, pode estar também, relacionado ao reduzido crescimento das brotações, visto que, em alguns casos ela acontece, mas pode ser mascarada pelo pouco crescimento dos brotos formados, não sendo possível a individualização para a contagem segura e posterior repicagem.

Tabela 1 – Efeito do BAP na multiplicação *in vitro*, em segmentos nodais de *Dioscorea multiflora*.

Concentração BAP (mg L ⁻¹)	Número brotações	Comprimento brotação (cm)	% explantes brotados
0,01	1,0 b	0,6 b	20 c
0,1	1,5 b	1,6 a	80 a
0,5	1,0 b	1,5 a	56 b
1,0	2,6 a	0,5 b	33 c
3,0	0 c	0 c	0 d

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($\alpha 5\%$).

Quando avaliou-se o número de brotações na presença de 1,0 mg L⁻¹ de BAP, embora os resultados tenham apresentado um valor superior (2,6 brotos) em comparação com os outros tratamentos, somente 33% dos explantes brotaram com comprimento médio de 0,5 cm. De acordo com Grattapaglia & Machado (1998), brotações adequadas para o enraizamento *in vitro* devem apresentar um comprimento igual ou superior a 1,0 cm, o que corrobora com o valor de 1,6 cm obtido, neste trabalho, na presença de 0,1 mg L⁻¹ de BAP, em que o número de brotações foi de 1,5 (Tabela 1).

Não houve diferença estatística significativa para o número de brotações entre as concentrações de 0,01 e 0,5 mg L⁻¹ de BAP. Entretanto, pode-se inferir que o tratamento mais adequado para a multiplicação *in vitro* de *D. multiflora* foi a suplementação do meio MS com 0,1 mg L⁻¹ de BAP, haja vista a obtenção de maior porcentagem de explantes com brotação, com comprimento adequado à etapa de enraizamento *in vitro* (Tabela 1).

Os resultados de multiplicação obtidos neste trabalho corroboram com aqueles apresentados por Biondo et al. (2007), quando estudaram a indução de múltiplos brotos em segmentos nodais de *Mandevilla velutina*, cujo sistema subterrâneo também é composto por tubérculos. Assim como para a espécie em estudo, o melhor meio de multiplicação foi o MS, suplementado com 0,1 mg L⁻¹ de BAP.

Quando avaliou-se o efeito de diferentes concentrações de BAP e sacarose, constatou-se interação entre as variáveis analisadas. Os valores obtidos para número e comprimento de brotações diminuíram à medida

que se aumentou a concentração de sacarose no meio de cultura (Tabela 2).

Os resultados obtidos neste experimento diferem daqueles encontrados por Alizadeh et al. (1998), quando encontraram melhores respostas para a indução de microtubérculos e desenvolvimento da parte aérea *in vitro* de *D. composita*, na concentração de 8% de sacarose.

Em um trabalho de revisão realizado por Stadem & Fowlds (1992), mostra-se que várias espécies de *Diocorea* sp. cultivadas *in vitro* sob níveis reduzidos de sacarose, apresentam formação de microtubérculos aéreos. A redução da concentração de sacarose no meio de cultura favoreceu a proliferação de brotos em *D. multiflora*, mas não promoveu a formação de minitubérculos.

Os resultados obtidos neste experimento demonstraram que um número satisfatório de brotações (4,1), pode ser obtido em concentrações relativamente baixas de BAP (0,1) e sacarose (2%). Esse fato implica, diretamente, na redução de custos, o que é extremamente relevante quando o objetivo é a produção de mudas em escala comercial.

Quando as brotações foram transferidas para o meio de enraizamento, os resultados mostraram que a indução de raízes adventícias *in vitro* foi ineficiente na presença das duas auxinas testadas, pois somente 42,6% das brotações apresentaram em média 1,5 raízes (Tabela 3). Em plântulas enraizadas *in vitro*, pôde-se observar que as raízes adventícias desenvolveram-se somente na região basal das brotações, o que pode ser uma característica desse gênero, uma vez que isso também foi relatado por Alizadeh et al. (1998), em trabalho realizado com *D. composita*.

Tabela 2 – Efeito de reguladores vegetais e concentrações de sacarose na multiplicação *in vitro*, em segmentos nodais de *Dioscorea multiflora*.

Concentração BAP (mg L ⁻¹)	Sacarose (%)	Número brotações	Comprimento brotação (cm)
0,1	2	4,1 a	0,5 a
	4	1,1 c	0,1 c
	6	1,0 c	0,1 c
	8	1,8 b	0,3 b
	10	1,1 c	0,1 c
0,5	2	3,3 a	0,5 a
	4	4,0 a	0,6 a
	6	1,0 c	0,5 a
	8	1,5 b	0,4 b
	10	1,6 b	0,4 b

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott (α 5%).

Tabela 3 – Efeito da concentração de IBA e NAA, no enraizamento de *Dioscorea multiflora*.

Regulador vegetal	Concentração (mg L ⁻¹)	Enraizamento (%)	Número de raízes / plântula
ANA	0,1	0 c	0 b
	0,5	20 b	1,2 a
	1,0	0 c	0 b
	3,0	0 c	0 b
AIB	0,1	20 b	1,3 a
	0,5	0 c	0 b
	1,0	43 a	1,5 a
	3,0	0 c	0 b

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($\alpha 5\%$).

Assis & Teixeira (1998) e Grattapaglia & Machado (1998) ressaltam que a dificuldade encontrada para induzir o enraizamento em espécies vegetais é mais expressiva em lenhosas quando comparadas às herbáceas. Entretanto, *D. multiflora*, é uma espécie herbácea e o protocolo para o enraizamento adventício *in vitro* não foi obtido com êxito.

Nesse caso, pôde-se inferir, do mesmo modo, que também existe dificuldade na indução de raízes adventícias *in vitro* em espécies herbáceas, cujo sistema subterrâneo é diferenciado em tubérculos, xilopódios e outras estruturas. Os resultados obtidos nos experimentos com *D. multiflora*, corroboram com os trabalhos realizados por Corrêa et al. (2003), Biondo et al. (2007) e Poornima & Ravishankar (2007), quando estudaram o enraizamento e/ou a tuberização *in vitro* de *Ipomoea batatas*, *Mandevilla velutina* e *Dioscorea oppositifolia* e *Dioscorea pentaphylla*.

Assim como a etapa de assepsia, o enraizamento das espécies vegetais *in vitro* tem merecido maior atenção na otimização de protocolos de micropropagação. Segundo Souza & Pereira (2007), o desenvolvimento do sistema radicular a partir da formação de raízes adventícias em plantas propagadas vegetativamente sob condições *in vitro* ou *in vivo* é um processo de grande complexidade e envolve diversos fatores que ainda não estão completamente elucidados.

No entanto, mesmo que o enraizamento *in vitro* de *D. multiflora* não tenha sido satisfatório, este fato não foi limitante para a obtenção de mudas. As plântulas que não desenvolveram raízes *in vitro* e que foram transferidas para casa de vegetação para aclimatização, formaram raízes *ex vitro* três meses após o plantio em substrato, com índice de sobrevivência (75%) idêntico ao das plântulas enraizadas *in vitro*. Esse resultado é

relevante no contexto da otimização do protocolo de micropropagação, uma vez que a etapa de enraizamento *ex vitro* tem sido apontada como vantajosa do ponto de vista de redução de custos e do tempo para a obtenção de mudas e portanto, almejada quando o objetivo é a produção em escala (Assis & Teixeira, 1998; Grattapaglia & Machado, 1998; Pasqual, 2001; Almeida et al., 2008). Rocha et al. (2009), também conseguiram aclimatizar mudas de helicônia micropropagadas. Contudo, as brotações foram enraizadas *in vitro*.

O processo de enraizamento adventício envolve a conjugação entre auxinas internas e externas e quando a espécie possui uma concentração adequada do hormônio endógeno AIA (ácido indol-acético), a conjugação com reguladores vegetais sintéticos, como AIB ou ANA por determinados períodos entre dez e vinte dias, aproximadamente, já é suficiente para induzir a formação de raiz sob condições *in vitro*. A permanência da brotação na presença da auxina sintética por períodos prolongados, pode acarretar na inibição do crescimento das raízes induzidas (Gaspar & Hofinger, 1988; Grattapaglia & Machado, 1998; Souza & Pereira, 2007).

Logo, pode-se afirmar que a retirada das brotações de *D. multiflora* do meio de cultura contendo AIB ou ANA e aclimatização das plântulas em substrato sem reguladores vegetais, culminou no desenvolvimento e crescimento das raízes adventícias sob condições *ex vitro*. Os resultados apresentados para a espécie em estudo, corroboram com aqueles relatados por Poornima & Ravishankar Raí (2007), quando estudaram a propagação *in vitro* de *Dioscorea oppositifolia* e *Dioscorea pentaphylla*. O enraizamento *ex vitro* para as duas espécies foi superior em relação ao enraizamento *in vitro* e 90% das plântulas sobreviveram na etapa de aclimatização. Os autores também ressaltam que as

auxinas podem ter um efeito negativo no crescimento de raízes adventícias *in vitro*, quando as plântulas permanecem durante todo o tempo na presença dessas.

CONCLUSÕES

Foi possível estabelecer um protocolo eficiente para a micropropagação de *Dioscorea multiflora*, sendo uma alternativa útil para a produção em escala comercial dessa espécie.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALIZADEH, A.; MANTELL, S.H.; VIANA, A.M. *In vitro* shoot culture and microtuber induction in the steroid yam *Dioscorea composita* Hemsl. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.53, p.107-112, 1998.
- ALMEIDA, E.F.A.; LUZ, P.B. da; LESSA, M.A.; PAIVA, P.D. de O.; ALBUQUERQUE, C.J.B.; OLIVEIRA, M.V.C. Diferentes substratos e ambientes para enraizamento de mini-iroxa (*Ixora coccinea* 'COMPACTA'). **Revista Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.32, n.5, p.1449-1453, set./out., 2008.
- ASSIS, T.F.; TEIXEIRA, S.L. Enraizamento de plantas lenhosas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPq, 1998. v.1, p.261-296.
- BAJAJ, Y.P.S.; FURMANOWA, M.; OLSZOWSKA, O. Biotechnology of the micropropagation of medicinal and aromatic plants. In: BAJAJ, Y.P.S. **Medicinal and aromatic plants**. [S.l.: s.n.], 1988. v.1, p.60-103.
- BIONDO, R.; SOUZA, A.V.; BERTONI, B.W.; SOARES, A.M.; FRANÇA, S.C.; PEREIRA, A.S. Micropropagation, seed propagation and germplasm bank of *Mandevilla velutina* (Mart.) Woodson. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.64, n.3, p.263-268, May/June 2007.
- CHATURVEDI, H.C. Tissue culture of economic plants. In: KHOSHOO, T.N.; NAIR, P.K.K. (Eds.). **Progress in plant research: applied morphology and allied subjects**. New Delhi: Today and Tomorrow's Printers and Publishers, 1979. v.1, p.265-288.
- CHEN, Y.; JINYU, F.; FEI, Y.; ZHONGXUN, L.; YUNSHENG, F. Rapid clonal propagation of *Dioscorea zingiberensis*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.73, n.1, p.75-80, 2003.
- CORRÊA, R.M.; PINTO, J.E.B.P.; BERTOLUCCI, S.K.V.; REIS, E.S.; SOUZA, A.V. Potencial do carvão ativado, filtro amarelo e interação fotoperíodo/temperatura na formação de raízes tuberosas de batata-doce *in vitro*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.33, n.3, p.423-430, maio/jun. 2003.
- COSTA, F. F.; MUKHERJEE, R. Diosgenin and yamogenin from *Dioscorea multiplora*. **Journal of Natural Products**, v.47, n.5, p.909-910, 1984.
- COURSEY, D.G. **Descriptors of yam (*Dioscorea* spp.)**. Rome: IBPGR, 1980. 19p.
- GASPAR, T.; HOFINGER, M. Auxin metabolism during adventitious rooting. In: DAVIS, T.D.; HAISSIG, B.E.; SANKHLA, N. **Adventitious root formation in cuttings**. Portland: Oregon, 1988. v.2, p.117-131.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPq, 1998. v.1, p.43-76.
- KADOTA, M.; NIIMI, Y. Improvement of micropropagation of Japanese yam using liquid and gelled medium culture. **Scientia Horticulturae**, v.102, p.461-466, 2004.
- KULKARNI, M.G.; STREET, R.A.; STADEN, J.V. Germination and seedling growth requirements for propagation of *Dioscorea dregeana* (Kunth) Dur. and Schinz: a tuberous medicinal plant. **South African Journal of Botany**, v.73, p.131-137, 2007.
- ITHARAT, A.; HOUGHTON, P.J.; ENO-AMOOQUAYE, E.; BURKE, P.J.; SAMPSON, J.H.; RAMAN, A. In vitro cytotoxic activity of Thai medicinal plants used traditionally to treat cancer. **Journal of Ethnopharmacology**, v.90, p.33-38, 2004.
- MELO FILHO, P.A.; SATOS, R.C.; MAFRA, R.C.; SANTOS, J.W. Classificação de germoplasma de *Dioscorea* sp. através da análise das componentes principais. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.30, n.4, p.619-623, 2000.
- MONTEIRO, D.A.; PERESSIN, V.A. **Agricultura: tuberosas amiláceas Latino Americanas**. São Paulo: Fundação Cargill, 2002. 540p.

- MORAES, R.M.; CALDAS, L.S.; SILVEIRA, C.E.S.; SOUZA, A.V.; BERTONI, B.W.; PEREIRA, A.M.S. Micropropagação e banco de germoplasma “in vitro” para produção e conservação de plantas nativas do Cerrado. In: PEREIRA, A.M.S. (Org.). **Recursos genéticos e conservação de plantas medicinais do cerrado**. Ribeirão Preto: Legis Summa, 2007. v.1, p.185-214.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.1, p.437-496, 1962.
- NIÑO, J.; JIMÉNEZ, D.A.; MOSQUERA, O.M.; CORREA, Y.M. Diosgenin quantification by HPLC in a *Dioscorea polygonoides* tuber collection from colombian flora. **Journal Brazilian Chemical Society**, v.18, n.5, p.1073-1076, 2007.
- PASQUAL, M. **Cultura de tecidos**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2001.
- PEDRALLI, G.; CARMO, C.A.S.; CEREDA, M. Uso de nomes populares para as espécies de Araceae e Dioscoreaceae no Brasil. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.20, n.4, p.530-532, 2002.
- PEREIRA, A.M.R.; BERTONI, B.W.; APPEZZATO-DAGLORIA, B.; ARAÚJO, A.R.B.; JANUÁRIO, A.H.; LOURENÇO, M.V.; FRANÇA, S.C. Micropropagation of *Pothomorphe umbellata* via organogenesis from leaf explants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.60, p.47-53, 2000.
- POORNIMA G.N.; RAVISHANKAR RAI, V. *In vitro* propagation of wild yams, *Dioscorea oppositifolia* (Linn) and *Dioscorea pentaphylla* (Linn). **African Journal of Biotechnology**, Pretoria, v.6, n.20, p.2348-2352, 2007.
- ROCHA, E.L.J.; CARVALHO, A.C.P.P. de; AZEVEDO, B.M.; MARINHO, A.B.; VIANA, T.V. de A.; VASCONCELOS, D.V. Aclimatização de mudas micropropagadas de helicônia em ambiente protegido em função do tipo de substrato. **Revista Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.33, n.6, p.1457-1462, nov./dez., 2009.
- SAUTOUR, M.; MITAINE-OFFER, A.C.; MIYAMOTO, T.; DONGMO, A.; LACAILLE-DUBOIS, A.M. Antifungal steroid saponins from *Dioscorea Cayenensis*. **Planta Medica**, v.70, p.90-92, 2004.
- SOUZA, A.V.; PEREIRA, A.M.S. Enraizamento de plantas cultivadas in vitro. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v.9, n.4, p.103-117, 2007.
- SOUZA, A.V.; PINTO, J.E.B.; BERTOLUCCI, S. In vitro Propagation of *Lychnophora pinaster* (Asteraceae): a threatened endemic medicinal plant. **Hortscience**, Amsterdam, v.42, n.7, p.1665-1669, 2007.
- SHU YU SHU. DIOSCOREA Linnaeus, Sp. Pl. 2: 1032. 1753. **Flora of China**, v.24, p.276-296, 2000.
- TAUKAMOTO, T.; UENO, Y. Glycosides of *Dioscorea tokoro*: I., dioscin, dioscorea saponin, and diosgenin. **Journal Pharmacology Society of Japan**, Tokyo, n.56, p.135-140, 1936.
- ZULLO, M.A.T.; RAMOS, M.T.B.; MONTEIRO, D.A.; GODOY, G. Extração e isolamento de diosgenina de Barbasco. **Bragantia**, Campinas, v.46, n.1, p.9-15, 1987.