



INDUÇÃO E MULTIPLICAÇÃO DE CALOS DE MANDIOCA (*Manihot esculenta* Crantz).

Ádila Melo Vidal¹, Antônio da Silva Souza² Carlos Alberto da Silva Ledo², Fernanda Vidigal Duarte Souza²

¹ Doutoranda em Ciências Agrárias, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, amelovidal@yahoo.com.br

² Pesquisadores Embrapa Mandioca e Fruticultura, assouza@cnpmf.embrapa.br, ledoc@cnpmf.embrapa.br, fernanda@cnpmf.embrapa.br

Resumo: A embriogênese somática pode subsidiar outras técnicas biotecnológicas no melhoramento genético da mandioca. Este estudo teve como objetivo avaliar a influência da glutamina e picloram na indução e multiplicação de calos de quatro acessos de mandioca oriundos do Banco Ativo de Germoplasma de Mandioca da Embrapa Mandioca e Fruticultura. Como material de partida foram utilizados ápices caulinares oriundos de plantas pré-estabelecidas *in vitro* e inoculados em meio MS acrescido de 20 g. L⁻¹ de sacarose, 0,5 mg. L⁻¹ de sulfato de cobre, e suplementado com glutamina (0 e 100 mg. L⁻¹) e picloram (0, 2, 4 e 8 mg. L⁻¹), e, solidificado com 2,4 g. L⁻¹ de Phytigel. A avaliação foi realizada após 21 dias de cultivo, por meio do percentual de explantes que formaram calo. Para a multiplicação, os tratamentos constituíram-se dos mesmos descritos anteriormente, com exceção do tratamento controle que não formou calo. Nesta etapa foram realizadas três avaliações em intervalos de 60 dias por meio da contagem do número de calos obtidos em cada subcultivo. Houve influência do genótipo, da glutamina e do picloram na multiplicação dos calos de mandioca.

Palavras-chave: auxina, calogênese, proliferação

Introdução

A embriogênese somática é um importante método de multiplicação em larga escala de plantas *in vitro*, tendo a cultura de calos como a forma mais utilizada para a indução de embriões somáticos. Dentro da espécie *Manihot esculenta* Crantz existe uma grande variabilidade quanto à resposta morfogênica *in vitro*, em função do genótipo e do tipo de trabalho conduzido. Essa forte dependência do genótipo resulta em demandas nutricionais e condições de cultivo distintas, necessitando de estudos específicos visando maximizar os processos de regeneração *in vitro* (OLIVEIRA et al., 1995). Diferenças significativas na capacidade organogênica *in vitro* podem ser encontradas ao se variar a composição nutricional do meio de cultura. No entanto, os componentes mais otimizados em meios de cultura são os reguladores (PERES, 2000). As auxinas desencadeiam os processos de desdiferenciação (modelo indireto) e rediferenciação (modelo direto) *in vitro*, alterando a determinação e conferindo



novas competências às células responsivas dos explantes (FEHER et al. 2003). Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar a influência da glutamina e picloram na indução e multiplicação de calos em diferentes acessos oriundos do Banco Ativo de Germoplasma de Mandioca.

Material e Métodos

Ápices caulinares extraídos de plantas de mandioca provenientes do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Mandioca e Fruticultura (BGM's 116, 264, 576 e 1282), foram pré-estabelecidos *in vitro* e inoculados em placas de Petri contendo 25 mL do meio MS (Murashige & Skoog, 1962), acrescido de 20 g. L⁻¹ de sacarose, 0,5 mg. L⁻¹ de sulfato de cobre, e suplementado com glutamina (0 e 100 mg. L⁻¹) e picloram (0, 2, 4 e 8 mg. L⁻¹), solidificado com 2,4 g. L⁻¹ de Phytigel[®], e pH ajustado para 5,78. Os explantes foram mantidos em ausência de luz e sob temperatura de 27±1°C por 21 dias, quando foram avaliados quanto a porcentagem de explantes que formaram calo. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 4 (acessos) x 2 (concentrações de glutamina) x 4 (concentrações de picloram), com três a cinco repetições por tratamento, sendo que cada repetição constituiu de uma placa com 4 a 5 explantes. Os calos obtidos neste estudo foram multiplicados a cada 60 dias nas mesmas condições descritas anteriormente, por um período de 180 dias, onde foi registrado o número de calos obtidos em cada subcultivo.

Resultados e Discussão

Após 21 dias de cultivo verificou-se que houve formação de calos em todos os tratamentos utilizados, com exceção do tratamento controle, demonstrando a necessidade de suplementação exógena de auxina na indução de calos. A porcentagem de explantes que formou calos variou de 11,76 a 20,45%. Dentre os acessos, o BGM 576 foi o que apresentou maior formação de calos, sobretudo quando cultivado no meio suplementado com 100 mg L⁻¹ de glutamina em combinação com 8 mg L⁻¹ de picloram, enquanto que o acesso BGM 264 apresentou resultado semelhante ao utilizar a mesma concentração de picloram, porém, em ausência de glutamina, reforçando a diferença de respostas de cada acesso (Tabela 1).



Tabela 1. Porcentagem de explantes que formaram calo em quatro acessos de mandioca cultivados sob diferentes concentrações de glutamina e picloram, após 21 dias.

Glutamina (mg L ⁻¹)	Picloram (mg L ⁻¹)			
	0	2	4	8
Acesso 116				
0	0,00	19,18	17,81	15,07
100	0,00	19,18	13,70	15,07
Acesso 264				
0	0,00	17,57	14,86	20,27
100	0,00	16,22	14,86	16,22
Acesso 576				
0	0,00	18,18	13,64	18,18
100	0,00	13,64	15,91	20,45
Acesso 1282				
0	0,00	19,33	15,97	11,76
100	0,00	20,17	18,49	14,29

O crescimento dos calos foi influenciado significativamente pela interação entre acessos de mandioca, concentrações de glutamina e picloram. O efeito da presença da glutamina foi mais marcante para o BGM 116, tanto no primeiro, quanto no segundo subcultivo, aumentando significativamente o número de calos. Para os outros acessos, considerando os resultados do segundo subcultivo, a adição de glutamina não favoreceu o aumento do crescimento celular e, portanto, a multiplicação dos calos (Tabela 2). O componente-chave dos meios nutritivos é o nitrogênio, elemento associado ao controle do crescimento, diferenciação e morfogênese. Pode ser fornecido na forma de nitrato, amônio ou aminoácidos, dentre eles a glutamina. A combinação dessas fontes nitrogenadas tem proporcionado bons resultados na organogênese e morfogênese *in vitro* (LAKSHMANAN & TAJI 2000).

Tabela 2. Efeito da glutamina no número médio de calos de diferentes acessos de mandioca em dois subcultivos.

Acesso	1º Subcultivo		2º Subcultivo	
	Glutamina (mg L ⁻¹)		Glutamina (mg L ⁻¹)	
	0	100	0	100
116	3,46 bB*	4,43 aA	5,15 bB	7,90 aA
264	3,68 abA	3,79 abA	4,74 bA	5,84 aA
576	4,90 aA	3,51 bcB	7,13 aA	6,63 aA
1282	2,41 cB	3,03 cA	3,14 cA	3,96 bA

*Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas não diferem estatisticamente entre si pelo teste t a 5% de probabilidade.

Foram observadas diferenças significativas entre acessos de mandioca e concentrações de picloram nos três subcultivos. No primeiro subcultivo o efeito das concentrações de picloram só foram observadas no BGM 116 e BGM 1282, com os melhores resultados registrados na concentração de 2 mg L⁻¹. Por outro lado, dentro de cada concentração da auxina e em todos os subcultivo houve grande



variação entre os acessos avaliados, sendo que no terceiro subcultivo a concentração de 2 mg L⁻¹ foi mais eficiente para o BGM 116, enquanto que para os BGM's 576 e 1282 os resultados não diferiram entre as concentrações. Já o BGM 264 respondeu melhor nas duas concentrações mais elevadas (Tabela 3).

Tabela 3. Efeito do picloram no número médio de calos de diferentes acessos de mandioca em três subcultivos.

Acesso	1º Subcultivo			2º Subcultivo			3º Subcultivo		
	Picloram (mg L ⁻¹)			Picloram (mg L ⁻¹)			Picloram (mg L ⁻¹)		
	2	4	8	2	4	8	2	4	8
116	4,47 aA*	3,97 aAB	3,40 aB	7,41 aA	5,92 aB	6,23 aAB	12,11 aA	9,26 aB	8,32 aB
264	3,13 bA	4,15 aA	3,92 aA	3,35 bB	6,62 aA	5,89 aA	4,59 bB	9,63 aA	7,59 aA
576	4,29 aA	4,13 aA	4,20 aA	7,45 aA	6,60 aA	6,60 aA	11,05 aA	8,80 aA	8,80 aA
1282	3,27 bA	2,18 bB	2,70 bB	3,66 bA	3,28bA	3,70 bA	5,08 bA	5,61 bA	5,12 bA

*Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas não diferem estatisticamente entre si pelo teste t a 5% de probabilidade.

Conclusões

Para que ocorra a formação e maximização da proliferação de calos nos diferentes acessos de mandioca é necessária adição de auxina no meio de cultura.

A presença de uma fonte nitrogenada no meio de cultura proporcionou um incremento na produção de calos de alguns acessos de mandioca, evidenciando o efeito do genótipo em resposta a morfogênese *in vitro*.

Referências Bibliográficas

- FEHER, A.; PASTERNAK, T. P.; DUDITS, D. Transition of somatic plant cells to an embryonic state. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 74, p. 201-228, 2003.
- LAKSHMANAN, P.; TAJI, A. Somatic embryogenesis in leguminous plants. **Plant Biology**, v. 2, p. 136-148, 2000.
- OLIVEIRA, R. P.; GOMES, T. S.; VILARINHOS, A. D. Avaliação de um sistema de micropropagação massal de variedades de mandioca. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, p. 2329-2334, 2000.
- PERES, L. E. P.; KERBAUY, G. B. Controle hormonal do desenvolvimento das raízes. **Universa**, v. 8, p. 181-195, 2000.