

**ESTUDOS SOBRE A EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA E A
REGENERAÇÃO PARA DUAS CULTIVARES DE MANDIOCA
(*Manihot esculenta* Crantz) CULTIVADAS NO ESTADO DO
CEARÁ**

JOÃO LUIZ PINHEIRO BASTOS

**FORTALEZA – CEARÁ
2003**

**ESTUDOS SOBRE A EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA E A
REGENERAÇÃO PARA DUAS CULTIVARES DE MANDIOCA
(*Manihot esculenta* Crantz) CULTIVADAS NO ESTADO DO
CEARÁ**

JOÃO LUIZ PINHEIRO BASTOS

**TESE SUBMETIDA À COORDENAÇÃO DO CURSO DE PÓS-
GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA, COMO REQUISITO PARCIAL
PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM BIOQUÍMICA**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

FORTALEZA – CEARÁ

MARÇO /2003

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

B329e Bastos, João Luiz Pinheiro.

Estudos sobre a embriogênese somática e a regeneração para duas cultivares de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) cultivadas no estado do Ceará / João Luiz Pinheiro Bastos. – 2003.

108 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2003.

Orientação: Prof. Dr. Francisco de Assis de Paiva Campos.

1. Embriogênese somática. 2. Organogênese. 3. Regeneração in vitro. 4. *Manihot esculenta*. I. Título.

CDD 572

Esta tese foi apresentada como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Bioquímica, outorgado pela Universidade Federal do Ceará, e encontra-se à disposição dos interessados na Biblioteca de Ciências e Tecnologia da referida Universidade.

A transcrição de qualquer trecho desta tese é permitida desde que seja feita de conformidade com as normas de ética científica.

JOÃO LUIZ PINHEIRO BASTOS

TESE APROVADA EM: 24 de março de 2003

Prof. Dr. Francisco de Assis de Paiva Campos

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular
Universidade Federal do Ceará
Orientador

Prof. Dr. Abdellatif Kamaledine Benbadis

Departamento de Biologia
Universidade Federal do Ceará
Conselheiro

Prof. Dr. João Licínio Nunes de Pinho

Departamento de Fitotecnia
Universidade Federal do Ceará
Conselheiro

Dra. Ana Cristina Portugal Pinto de Carvalho

EMBRAPA – Agroindústria Tropical
Conselheiro

Dr. Rómulo Marino Llamoca Zárate

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular
Universidade Federal do Ceará
Conselheiro

A **Deus**,

Aos meus **pais**,

Aos meus **irmãos**,

À minha esposa **Filomena**,

Aos meus filhos **Lara e Mateus**,

dedico com amor

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Francisco de Assis de Paiva Campos, pela forma criteriosa como conduziu a orientação deste trabalho, proporcionando todas as condições possíveis para a sua realização.

À Profa. Dra. Arlete Aparecida Soares, colega do Laboratório de Anatomia Vegetal do Depto. de Biologia da UFC, pela amizade e pelo companheirismo, como também por ter enriquecido este trabalho com sugestões e questionamentos pertinentes, além de ter contribuído com a realização das análises histológicas.

Ao Prof. Dr. Abdellatif Kamaledine Benbadis, pela amizade e pela colaboração nos trabalhos iniciais, quando ingressei no Depto. de Biologia, despertando em mim o interesse nos estudos sobre a cultura de tecidos vegetais. Agradeço também pela disponibilidade em compor a banca examinadora.

Ao Prof. Dr. João Licínio Nunes de Pinho, do Centro de Ciências Agrárias, especialista na cultura de *Manihot esculenta*, pela importante contribuição quanto aos esclarecimentos sobre a exploração dessa planta no Estado do Ceará e pela disponibilidade em compor a banca examinadora.

À Dra. Ana Cristina Portugal Pinto de Carvalho, pela disponibilidade em compor a banca examinadora.

Ao Dr. Rómulo Marino Llamoca Zárate, pela amizade, colaboração e pela disponibilidade em compor a banca examinadora.

À EMBRAPA – Agroindústria Tropical, pela cessão dos laboratórios de captação de imagens microscópicas, imprescindíveis para a consolidação do presente trabalho.

Ao Departamento de Biologia da UFC, pela compreensão da necessidade de adequação na minha carga horária didática, para que fosse possível a desenvolvimento dessa tese.

Aos colegas da Pós-Graduação em Bioquímica, pelas discussões e sugestões, que muito contribuíram para o bom desenvolvimento do trabalho, como também pela amizade, que se perpetuará em minha vida.

À minha esposa Filomena, pelo companheirismo de todas as horas, pelo incentivo constante, principalmente nos momentos mais difíceis, e por todo o apoio no decorrer da minha vida acadêmica e profissional.

Este trabalho foi possível graças ao auxílio das seguintes instituições:

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

Fundação Cearense de Amparo à Pesquisa e Tecnologia do Estado do Ceará (FUNCAP)

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza/CE.

Departamento de Biologia, Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza/CE.

SUMÁRIO

	Página
<u>LISTA DE FIGURAS</u>	xi
<u>LISTA DE TABELAS</u>	xiv
<u>ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES</u>	xvi
<u>RESUMO</u>	xvii
<u>ABSTRACT</u>	xix
1 – <u>INTRODUÇÃO</u>	1
1.1 – <u>Origem e Aspectos Botânicos da Mandioca</u>	2
1.2 – <u>Importância Social e Econômica da Cultura</u>	4
1.3 – <u>Propagação da Mandioca</u>	12
1.4 – <u>Regeneração de Plantas <i>in vitro</i></u>	12
1.4.1 – Micropropagação	13
1.4.2 – Embriogênese Somática	15
1.4.3 – Organogênese	16
1.5 – <u>Cultura de Tecidos da Mandioca</u>	18
1.5.1 – Cultura de Meristemas e Eliminação de Doenças	20
1.5.2 – Micropropagação	21
1.5.3 – Conservação de Germoplasma	22
1.5.4 – Embriogênese Somática	22
1.5.5 – Organogênese	24
1.5.6 – Histologia	25
1.5.7 – Transformação Genética da Mandioca	27
1.6 – <u>Potencial da Engenharia Genética no Melhoramento da Mandioca</u>	28
1.7 – <u>Importância da Biotecnologia para o Cultivo da Mandioca no Ceará</u>	29
2 – <u>OBJETIVOS</u>	30
2.1 – <u>Gerais</u>	31
2.2 – <u>Específicos</u>	31
3 – <u>MATERIAIS</u>	32
3.1 – <u>Material Vegetal</u>	33

3.2 – <u>Reagentes</u>	33
4 – <u>MÉTODOS</u>	35
4.1 – <u>Estabelecimento da Cultura <i>in vitro</i> e Micropropagação</u>	36
4.2 – <u>Embriogênese Somática Primária</u>	36
4.3 – <u>Embriogênese Somática Secundária</u>	38
4.4 – <u>Organogênese de Partes Aéreas</u>	39
4.5 – <u>Histologia</u>	40
4.5.1 – Embriogênese	40
4.5.2 – Organogênese	40
4.6 – <u>Análise Estatística</u>	41
5 – <u>RESULTADOS E DISCUSSÃO</u>	42
5.1 – <u>Embriogênese Somática Primária</u>	43
5.2 – <u>Embriogênese Somática Secundária</u>	49
5.3 – <u>Organogênese de Partes Aéreas</u>	56
5.4 – <u>Histologia</u>	64
5.5 – <u>Regeneração das Plantas</u>	69
6 – <u>PERSPECTIVAS FUTURAS</u>	72
7 – <u>CONCLUSÕES</u>	74
8 – <u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	76
9 – <u>APÊNDICE</u>	87
9.1 – <u>A Lenda da Mandioca</u>	88

LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1 - Planta de mandioca (<i>Manihot esculenta</i> Crantz), da variedade Bujá Preta, com 10 meses de idade e cerca de 3,0 metros de altura. Aspecto geral do sistema radicular adventício, evidenciando as raízes tuberosas.	3
FIGURA 2 - Mapa do estado do Ceará, mostrando a produção de mandioca (em toneladas) em 2001, nos diferentes municípios.	11
FIGURA 3 - Estabelecimento <i>in vitro</i> da cultura de mandioca. (A) Haste caulinar de plantas cultivadas no campo. Barra 1 cm. (B) Meristema apical (→) com 3 primórdios foliares, após dissecação do ápice caulinar. Barra 1 mm. (C) Desenvolvimento do meristema apical em meio básico MS após 10 dias de incubação. Barra 1 cm. (D) Enraizamento após 30 dias de incubação no meio básico.	37
FIGURA 4 - Indução e maturação de embriões somáticos de mandioca – cultivar Bujá Preta. (A) Embriões somáticos primários no estágio de torpedo (→), induzidos a partir de ápices caulinares em meio MS suplementado com Picloram. Barra 1 mm. (B) Embriões somáticos secundários em estágio de torpedo e cotiledonar, induzidos a partir de fragmentos de cotilédones somáticos primários. Barra 1 mm. (C) Agrupamento de embriões somáticos secundários, formados diretamente no explante. Barra 1 mm. (D) Observação da estrutura bipolar do embrião. Barra 1 mm. (E) Obtenção de embriões somáticos em diferentes	55

estádios de desenvolvimento, mostrando ausência de sincronismo na indução direta. Barra 1 mm. (F) Embriões somáticos após 20 dias de incubação no meio de maturação. Barra 2 cm.

- FIGURA 5 - Organogênese de partes aéreas de mandioca – cultivar Tapicínea. (A) Indução após 20 dias de incubação de fragmentos de cotilédones somáticos secundários em meio MS suplementado com AIB e IBA. Barra 1 mm. (B) e (C) Aspecto geral do desenvolvimento de estruturas caulinares, com a presença de folhas características, que auxiliam na distinção entre parte aérea e embrião. Barra 1 mm. (D) Alongamento das partes aéreas (→) após 7 dias de incubação no meio de alongamento. (E) Partes aéreas enraizadas após 30 dias no meio básico MS. Barra 2,5 cm. (F) resultado da incubação de fragmento de cotilédones somáticos em meio MS suplementado com 3,0 mg/L de AIB, após 21 dias. Nota-se a intensa formação de raízes e ausência de calos. Barra 2 cm. 62
- FIGURA 6 - Fluxograma da indução de embriões somáticos e da regeneração de plantas, via organogênese de partes aéreas. 63
- FIGURA 7 - Embriogênese somática secundária em mandioca. (A) Aspecto geral da estrutura interna do explante. Epidermes definidas (ep), mesofilo lacunoso (me) e células ricas em cloroplasto. Barra 60 µm. (B) Início da formação de células embriogênicas em áreas internas do mesofilo, após 6 dias de incubação. Barra 100 µm. (C) Faixa central de células embriogênicas em divisão, após 10 dias (K), mostrando algumas estruturas 65

globulares em início de formação (▶). Barra 250 µm. (D) Aspecto das células do mesofilo (K), separadas das células embriogênicas por uma camada de células com muitos vacúolos (▶). Nota-se células em divisões periclinais na faixa embriogênica (→). Barra 60 µm. (E) Detalhe das estruturas globulares indicadas em C. Barra 60 µm.

FIGURA 8 - Organogênese de partes aéreas em mandiocas – 67
cultivar Bujá Preta. (A) Aspecto geral da estrutura interna do explante, após 4 dias de incubação no meio indutor mostrando o início da dediferenciação de células da região sub-epidérmica (→). Barra 200 µm. (B) Detalhe da região indicada em A, mostrando células com núcleos bem evidentes. Barra 100 µm. (C) Formação de gema adventícia após 8 dias de incubação. Barra 250 µm. (D) Estruturação da parte aérea, mostrando o ápice com uma organização túnica-corpo característica e primórdios foliares, aos 13 dias de incubação. Barra 250 µm.

LISTA DE TABELAS

	Página
TABELA 1 - Confronto das Safras de 2002 e das Estimativas para 2003 - Brasil - Janeiro de 2003	9
TABELA 2 - Safra de mandioca no estado do Ceará	10
TABELA 3 - Relação de reagentes utilizados nos experimentos	34
TABELA 4 - Efeito do Picloram na indução de embriões somáticos primários a partir de ápices caulinares de plantas das variedades Tapicínea e Bujá Preta, cultivadas <i>in vitro</i>	44
TABELA 5 - Distribuição de frequência dos resultados de indução de embriões somáticos primários em ápices caulinares de plantas da cultivar Tapicínea.	45
TABELA 6 - Distribuição de frequência dos resultados de indução de embriões somáticos primários em ápices caulinares de plantas da cultivar Bujá Preta	46
TABELA 7 - Frequência de indução de embriões somáticos primários	48
TABELA 8 - Efeito do Picloram na indução de embriões somáticos secundários a partir de cotilédones de embriões somáticos primários	50
TABELA 9 - Distribuição de frequência dos resultados de indução de embriões somáticos secundários em cotilédones de embriões somáticos primários da cultivar Tapicínea	51
TABELA 10 - Distribuição de frequência dos resultados de indução de embriões somáticos secundários em cotilédones de embriões somáticos primários da cultivar Bujá Preta	52

TABELA 11 -	Frequência de indução de embriões somáticos secundários	54
TABELA 12 -	Distribuição de frequência dos resultados de indução de organogênese de partes aéreas em cotilédones de embriões somáticos secundários da cultivar Tapicínea	57
TABELA 13 -	Distribuição de frequência dos resultados de indução de organogênese de partes aéreas em cotilédones de embriões somáticos secundários da cultivar Bujá Preta	58
TABELA 14 -	Correlação entre as variáveis medidas no experimento de organogênese para a cultivar Tapicínea	59
TABELA 15 -	Frequência de indução de organogênese de partes aéreas	61
TABELA 16	Regeneração de plantas a partir do desenvolvimento de partes aéreas obtidas via organogênese para a cultivar Tapicínea	70

ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES

°C -	Grau Celsius
2,4-D -	Ácido 2,4 - diclorofenoxiacético
ABA -	Ácido abscísico
AIB -	Ácido Indolbutírico
ANA -	Ácido naftalenoacético
BAG -	Banco Ativo de Germoplasma
BAP -	6-Benzilaminopurina
CBN -	Cassava Biotechnology Network
cm -	Centímetro
cm ² -	Centímetro quadrado
DNA -	Ácido desoxirribonucléico
ESP -	Embriões somáticos primários
ESS -	Embriões somáticos secundários
GUS -	β- Glucoronidase
HCN -	Ácido cianídrico
m -	Metro
MA -	Meio de alongamento
μM -	Micromolar
mg/L -	Miligrama por litro
MIE -	Meio de indução de embriogênese somática
mm -	Milímetro
MME -	Meio de maturação de embriões somáticos
MO -	Meio de organogênese de partes aéreas
MS -	Meio de cultura completo, elaborado por Murashige & Skoog (1962)
PA -	Parte aérea
Picloram -	Ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico
RNA -	Ácido ribonucléico
t/ha -	Tonelada por hectare
TDZ -	Thidiazuron

RESUMO

Protocolos de indução de embriogênese somática primária, embriogênese somática secundária (cíclica) e organogênese de partes aéreas, foram desenvolvidos, objetivando a regeneração *de novo*, de plantas de mandioca de duas cultivares amplamente exploradas no estado de Ceará, Tapicínea e Bujá Preta.

As culturas foram estabelecidas *in vitro*, a partir de meristemas apicais caulinares de plantas no campo e mantidas em meio básico MS, suplementado com sacarose, sulfato de cobre e agargel. A multiplicação se deu através de repicagens mensais de ápices e regiões nodais.

Ápices caulinares com 2 ou 3 primórdios foliares, de plantas mantidas *in vitro*, foram utilizados para a indução de embriogênese somática primária, em meio básico MS, suplementado com Picloram. Esse regulador de crescimento foi capaz de induzir a formação de embriões em diferentes concentrações, sendo a concentração de 8,0 mg/L a mais apropriada para as duas cultivares estudadas. Os embriões foram, então, transferidos para o meio de maturação (MS + 0,1 mg/L de BAP).

Fragmentos de cotilédones verdes ($\pm 6 \text{ mm}^2$), de embriões somáticos primários em processo de maturação, foram utilizados para a indução de embriogênese somática secundária, em meio MS suplementado com diferentes concentrações de Picloram. Foi observada uma maior competência para a embriogênese nesse tipo de explante, quando comparado a ápices caulinares,

tanto em frequência como em produtividade. As concentrações de Picloram mais adequadas para os 2 genótipos foram 4,0 mg/L para a Tapicínea e 8,0 mg/L para a Bujá Preta.

Segmentos de cotilédones de embriões somáticos secundários foram utilizados nos experimentos de indução de organogênese de partes aéreas. Os explantes foram inoculados em meio MS suplementado com AIB e BAP, nas concentrações de 0,0; 0,25; 0,5; 1,0 e 3,0 mg/L, para ambos os reguladores, combinados segundo fatorial (5 x 5), num total de 25 tratamentos.

Houve resposta positiva em ambos os genótipos, sendo as concentrações de AIB e BAP de 1,0 mg/L e 0,25 mg/L, e de 1,0 mg/L e 0,5 mg/L, as mais adequadas para Bujá Preta e Tapicínea, respectivamente.

A análise histológica dos processos de embriogênese somática secundária em Bujá Preta mostrou uma proliferação de células embriogênicas, iniciando-se a partir das regiões vasculares. Estruturas globulares surgiam a partir dessa massa celular, configurando a origem pluricelular dos embriões.

A análise histológica da organogênese de partes aéreas, também em Bujá Preta, apresentou resultado bastante diverso daquele da embriogênese. O início da formação das estruturas ocorreu em camadas sub-epidérmicas, formando protuberâncias (gemas adventícias) que se desenvolviam em partes aéreas, mantendo uma conexão vascular com o explante.

ABSTRACT

Primary somatic embryogenesis, secondary somatic embryogenesis (cyclic) and shoot organogenesis protocols, were developed, for 2 genotypes of cassava plants – Tapicínea and Bujá Preta, cultivated in the state of Ceará.

Cultures were established, using shoot apical meristems of plants maintained in the field, and using the basic MS medium, supplemented with sucrose, copper sulfate and agar. The material was maintained by monthly sub-culture as *in vitro* shoot, using nodal explants and cultured on MS medium without growth regulators.

Apical shoot meristems from *in vitro* plants, with 2 or 3 immature leaves were used for induction of primary somatic embryos, on basic medium, supplemented with Picloram. That growth regulator was capable to induce the embryos formation in different concentrations, being the 8,0 mg/L concentration, the most appropriate for the 2 genotypes. The embryos were, then, transferred to maturation medium (MS + 0,1 mg/L of BAP).

Cotyledons from germinating primary somatic embryos were used to induction secondary (cyclic) somatic embryos, in MS medium supplemented with different Picloram concentrations. A larger competence was observed for the embriogênese in that explante type, when compared to shoot apexes, in both, frequency and productivity. The most appropriate concentrations for the 2 genotypes were 4,0 mg/L and 8,0 mg/L - Tapicínea and Bujá Preta, respectively.

Pieces of cotyledons from secondary somatic embryos were used in the shoot organogenesis induction. The explantes were inoculated in MS medium, supplemented with IBA and BAP (0,0; 0,25; 0,5; 1,0 and 3,0 mg/L, for both regulators), in factorial (5 x 5) arranged.

The positive answer was observed in both genotypes, being the concentrations of IBA and BAP of 1,0 mg/L and 0,25 mg/L, and of 1,0 mg/L and 0,5 mg/L, the best for Bujá Preta and Tapicínea, respectively.

The histological analysis of secondary somatic embryogenesis – Bujá Preta cultivar - showed an embryogenics cells proliferation, starting from the vascular areas. Globular structures appeared starting from that cellular mass, configuring the multicelular origin of the embryos.

Histological analysis of the shoot organogenesis, also in Bujá, Preta cultivar, presented different result compared to embryogenesis. The structures formation occur in sub-epidermal layers, forming buds that development in to shoots, with a vascular connection from the explante

1. INTRODUÇÃO

1.1. Origem e aspectos botânicos da mandioca

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) (FIGURA 1) provavelmente é uma espécie de origem brasileira segundo OLSEN & SCHAAL (1999). Esses autores baseiam-se na grande variabilidade genética do gênero encontrada no País. O centro de origem, no entanto, ainda é bastante discutido. Os índios utilizavam essa planta tanto para a alimentação como para a fabricação de bebidas alcoólicas, como uma aguardente conhecida como tiquira.

Pelos navegadores portugueses a mandioca foi levada aos países africanos e asiáticos. Hoje ela é cultivada entre as latitudes de 30^o Norte/Sul e a altitudes menores, quando se afasta desse ponto (COCK, 1982).

A mandioca é um arbusto perene, medindo de 1 a 5 m de altura, pertencente a família Euphorbiaceae, sub-família Crotonoidea, e possui raízes armazenadoras de amido. O gênero *Manihot* sp. apresenta cerca de 180 espécies descritas ($2n = 36$ cromossomos), a maioria das quais nativas do Brasil, sendo a espécie *M. esculenta* a de maior interesse agrônomo, por ser a única espécie que é explorada comercialmente (ROCA, 1990).

A planta apresenta características botânicas amplamente diversas em decorrência de um elevado grau de hibridação interespecífica. Assim sendo, existem milhares de cultivares dessa espécie que se diferenciam, principalmente por suas características morfológicas. Os autores agrupam esses caracteres morfológicos da cultura em constantes e variáveis. Os caracteres constantes são aqueles típicos da taxonomia da planta, ou seja, da espécie ou da variedade. Já os caracteres variáveis recebem influência do meio ambiente, ou seja, a expressão do genótipo sofre ação do ambiente. Portanto, quando da descrição fenotípica de uma variedade deve-se ter sempre em conta a interação genótipo *versus* ambiente (FAO, 2002).

A mandioca é uma planta monóica, com flores masculinas no ápice e flores femininas na base da panícula. O sistema radicular é composto de raízes tuberosas ricas em amido, que representam a principal fonte de produção econômica da cultura, e de raízes fibrosas responsáveis pela absorção de água

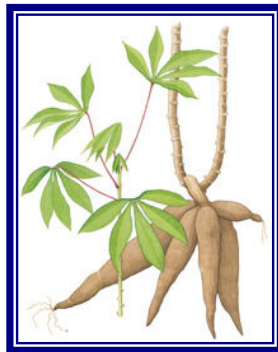
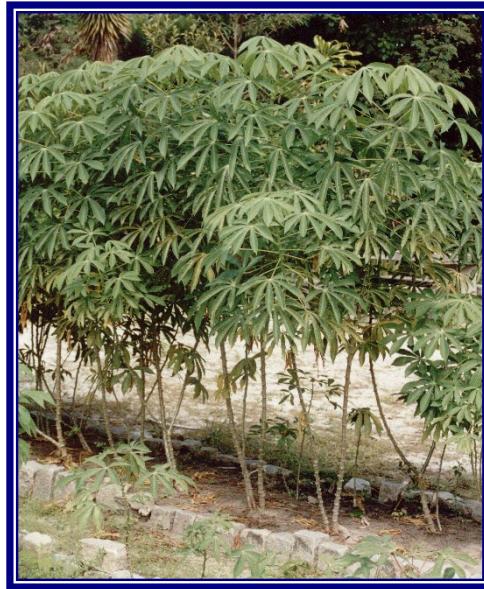


FIGURA 1 – Plantas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) da variedade Bujá Preta, com dez meses de idade e cerca de 3,0 metros de altura. Aspecto geral do sistema radicular adventício, evidenciando as raízes tuberosas.

e nutrientes e pela fixação da planta. O caule é de uma altura variável, entre 1 e 5 metros, podendo ser ramificado ou não, com internódios bem definidos. Constitui o órgão de propagação assexuada da mandioca. Normalmente, apresenta coloração bem variada: cinza, cinza-prateado, pardo-amarelado, pardo-avermelhado (BUENO, 1985).

As folhas são verdes, palminérveas, fendidas e constituídas de 3, 4, 5, ou 7 lobos, sendo encontradas folhas até com 9. O formato dos lobos também é bastante variável, sendo uma característica ligada principalmente a fatores genéticos. As folhas são caducas e sua duração está ligada a fatores genéticos e ambientais. No entanto, a seca e o frio são os fatores mais determinantes da queda das folhas (CONNOR & COCK, 1979)

As flores são dispostas em inflorescências cimosas, localizadas nos pontos de ramificação e o fruto é uma cápsula trilocular, de deiscência loculicida e septicida, que se abre por seis valvas quando completamente maduro. As sementes têm forma carunculada, coloração levemente marrom ou acinzentada com manchas, lembrando pequenas sementes de mamona (BUENO, 1985).

1.2. Importância Social e Econômica da Cultura

Conhecida pela rusticidade e pelo papel social que desempenha entre as populações de baixa renda, a cultura da mandioca tem grande adaptabilidade a diferentes ecossistemas, o que possibilita seu cultivo em várias partes do mundo (FAO, 2002).

A mandioca é uma planta tolerante à seca e aos solos de baixa fertilidade, sendo cultivada em todo o Brasil, que já foi o maior produtor mundial. Hoje é o segundo. A produção brasileira atingiu o máximo de 30 milhões de toneladas no início da década de 70, estabilizou-se em torno de 24 milhões de toneladas no período de 1972 a 1987 e atingiu o mínimo de cerca de 20 milhões de toneladas em 2000 (CAVALCANTI, 2002).

A mandioca constitui-se uma das principais fontes de calorias para os países da América Latina, África, Sudeste da Ásia e Oceania, sendo consumida diariamente por mais de 500 milhões de pessoas (ROCA, 1990; TAYLOR *et al.*, 1996).

O baixo teor protéico (1% a 2% do peso da raiz) e a sua toxicidade, caracterizada pela liberação de ácido cianídrico a partir da hidrólise de compostos cianogênicos, são os principais fatores que limitam o uso da mandioca (PUONTI-KAERLAS, 1998).

As folhas são excelente fonte de fibras e proteínas e são utilizadas como suplemento alimentar na dieta de populações carentes (ADRIAN & PEYROT, 1971).

Porém, o alto teor do glicosídeo cianogênico Linamarina (derivado da Valina) presente em toda a planta, constitui uma limitação ao consumo. A Linamarina sofre a ação da linamarase (uma β -glucosidase) quando o órgão vegetal sofre alguma injúria, liberando glicose e cianoidrinas. Essas são degradadas a cetonas e ácido cianídrico (HCN). O teor de Linamarina não tem correlação com o aspecto morfológico da planta e parece aumentar em condições de estresse ambiental (COCK, 1982; NYE, 1991; SHEWRY *et al.*, 1992; PUONTI-KAERLAS, 1998; JOSEPH *et al.*, 2001).

As raízes tuberosas são o produto principal dessa cultura. Ricas em carboidratos, embora pobres em proteínas. Elas são empregadas na dieta humana nas formas *in natura* ou como matéria prima para rações. O amido é utilizado em vários setores da indústria, como: no farmacêutico, no têxtil, no de fabricação de cerâmica, detergente, papel e gêneros alimentícios, dentre outros (COCK, 1986).

As raízes da mandioca possuem valor energético semelhante ao do milho. A parte aérea tem valor protéico semelhante aos das melhores forrageiras. O baixo valor protéico das raízes pode ser corrigido com a adição de 2% de uréia, quando as raspas são destinadas aos ruminantes, como caprinos, ovinos e bovinos. Pode ser considerada uma reserva estratégica de alimentos para homens e animais em época de seca severa (CAVALCANTI, 2002).

Dentre as espécies de interesse no aumento de produção e melhoramento genético, a mandioca, apesar de não exercer ainda uma importância marcante na agro-economia mundial, como acontece com outras espécies vegetais, tais como a soja, o café, o arroz, o milho, o algodão, a cana-de-açúcar, o trigo, etc., tem despertado, nessas últimas décadas, um largo interesse por parte das autoridades de alguns países latino-americanos, africanos e asiáticos (PUONTI-KAERLAS, 1998).

Segundo especialistas, o interesse pela cultura deve-se a sua capacidade de adaptação às mais variadas condições ambientais. Por suas características de rusticidade, em períodos de seca, a mandioca é capaz de produzir alimento, mesmo que precariamente, o que não acontece com a quase totalidade das mesófitas cultivadas nessas regiões, desempenhando, assim, um importante papel social, notadamente junto às populações de baixa renda. Quando as condições ambientais lhe são favoráveis, a mandioca se destaca das outras espécies vegetais por sua elevada produção de biomassa por unidade de área (FAO, 2002).

A produção anual de mandioca em 2000 foi de 170 milhões de toneladas em 16 milhões de hectares. Aproximadamente 57% da produção mundial são usadas para o consumo humano, 32% para a alimentação animal e propósitos industriais e 11% são perdidas como refugo. Sob condições ótimas, pode ser produzida num período de 12 meses, uma média de 80 t/ha de raízes de mandioca. Da produção total, África, Ásia e América Latina produzem 52,7%, 29,8% e 17,5% respectivamente (FAO, 2002).

Segundo OLIVEIRA *et al.* (2000), a produtividade brasileira de mandioca é de apenas 8 t/ha, por ser cultivada, geralmente, em terras marginais de baixa fertilidade e com problemas climáticos, como a seca, além de não serem adotadas práticas agrônômicas de controle de pragas e doenças. Devido à propagação vegetativa, a partir de estacas (chamadas manivas-semente), várias doenças, principalmente as sistêmicas, podem ser transmitidas por meio de sucessivas gerações, através de patógenos como vírus, bactérias e fungos. Essas doenças afetam a produtividade da cultura em níveis de até 100%.

O Nordeste é a maior região consumidora de farinha de mesa e importa o produto de São Paulo e do Paraná, devido à eventual redução na produção provocada por irregularidades climáticas. O período chuvoso irregular impede, também, a oferta de matéria-prima de qualidade às indústrias modernas, não conseguindo competir com as farinhas produzidas naqueles estados. Além disso, a farinha é considerada um produto inelástico, cujo consumo não aumenta com o aumento da renda da população e apresenta tendência de redução com a urbanização. A indústria de fécula também sofre limitações pois necessita de água, em quantidade e qualidade, nem sempre disponíveis. A mandioca ainda pode ser transformada em raspas (raízes picadas e secas ao sol) como é feito em países como a Tailândia, maior exportador de raspas de mandioca para o Mercado Comum Europeu, onde são empregadas na formulação de rações. A produção de raspas no Nordeste foi estimulada por meio de um projeto conduzido no período de 1989 a 1995 no Ceará, que concentrou esforços em ajudar as comunidades a se organizarem em torno da agroindústria (CAVALCANTI, 2002).

A TABELA 1 contém as safras obtida (2002) e esperada (2003) de algumas culturas exploradas no Brasil e os dados da TABELA 2 permitem uma comparação entre as safras de mandioca no Ceará nos anos de 2001 e 2002. Nota-se que, apesar da expectativa de redução na produção em termos nacionais, no Ceará houve um incremento tanto na área plantada como na produtividade.

A FIGURA 2 apresenta o perfil da produção de mandioca nos diversos municípios cearenses. Nota-se uma influência marcante da pluviosidade sobre a produção da cultura.

Muito embora a mandioca (*Manihot esculenta*) esteja entre as dez mais importantes culturas agrícolas no mundo, até recentemente uma quantidade relativamente pequena de pesquisas haviam sido dirigidas no sentido de melhorar diversos aspectos dessa cultura tais como rendimento, propagação, qualidade nutricional, resistência a doenças, etc. Com a criação da **Cassava Biotechnology Network (CBN)** em 1988, esta situação começou a mudar e graças ao estabelecimento de prioridades de pesquisas básicas e aplicadas em

biotecnologia da mandioca e ao trabalho de articulação da CBN, uma série de tecnologias importantes estão disponíveis à comunidade interessada em explorar aspectos particulares da biotecnologia da mandioca (PUONTI-KAERLAS, 1998).

O ritmo das pesquisas com mandioca acelerou nos últimos anos e como consequência houve a realização de cinco congressos internacionais da CBN. América Latina (Colômbia e Brasil), América do Norte (Estados Unidos), Ásia (Indonésia) e África (Uganda). Estes esforços culminaram com o desenvolvimento de protocolos para a regeneração e transformação genética de duas cultivares de mandioca (MCol 22 e TMS 60444) que até então vinham sendo utilizadas como modelo (SCHOPKE *et al.*, 1996; TAYLOR *et al.*, 1996 e LI *et al.*, 1996).

TABELA 1 - Confronto das Safras de 2002 e das Estimativas para 2003 - Brasil - Janeiro de 2003

Produtos Agrícolas	P r o d u ç ã o (t)		
	Obtida safra 2002	Esperada safra 2003	Varição %
Algodão herbáceo (em caroço)	2 159 984	2 233 721	3,41
Arroz (em casca)	10 471 800	10 538 441	0,64
Batata-inglesa 1ª safra	1 423 931	1 367 004	-4,00
Batata-inglesa 2ª safra	909 436	908 396	-0,11
Batata-inglesa 3ª safra	548 141	548 141	-
Café (em grão)	2 442 526	2 471 512	1,19
Cana-de-açúcar	367 496 275	380 764 050	3,61
Feijão (em grão) 1ª safra	1 623 799	1 886 046	16,15
Feijão (em grão) 2ª safra	1 057 582	1 111 262	5,08
Feijão (em grão) 3ª safra	368 823	368 823	-
Laranja	18 931 919	18 932 296	0,00
Mandioca	22 989 965	22 090 413	-3,91
Milho (em grão) 1ª safra	29 298 146	32 050 043	9,39
Milho (em grão) 2ª safra	6 203 527	6 203 527	-
Soja (em grão)	42 020 445	49 112 246	16,88
Trigo	2 934 659	2 934 659	-

Fonte: IBGE, DPE, DEAGRO - Levantamento Sistemático da Produção Agrícola.

TABELA 2 – Safra de mandioca no estado do Ceará, nos anos de 2001 e 2002.

Safra 2001			Safra 2002			Variação (%)		
Área (há)	Prod. (t)	Rend. (kg/ha)	Área (ha)	Prod. (t)	Rend. (kg/ha)	A/A	P/P	R/R
84.308	731.791	8.680	86.059	808.191	9.391	2,08	10,44	8,19

Fonte: IBGE/GCEA

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB
 SUPERINTENDÊNCIA REGIONAL DO CEARÁ - SUREG/CE

PRODUÇÃO DE MANDIOCA NO CEARÁ
 TOTAL DA PRODUÇÃO EM NOVEMBRO DE 2001 . • 731.796 t

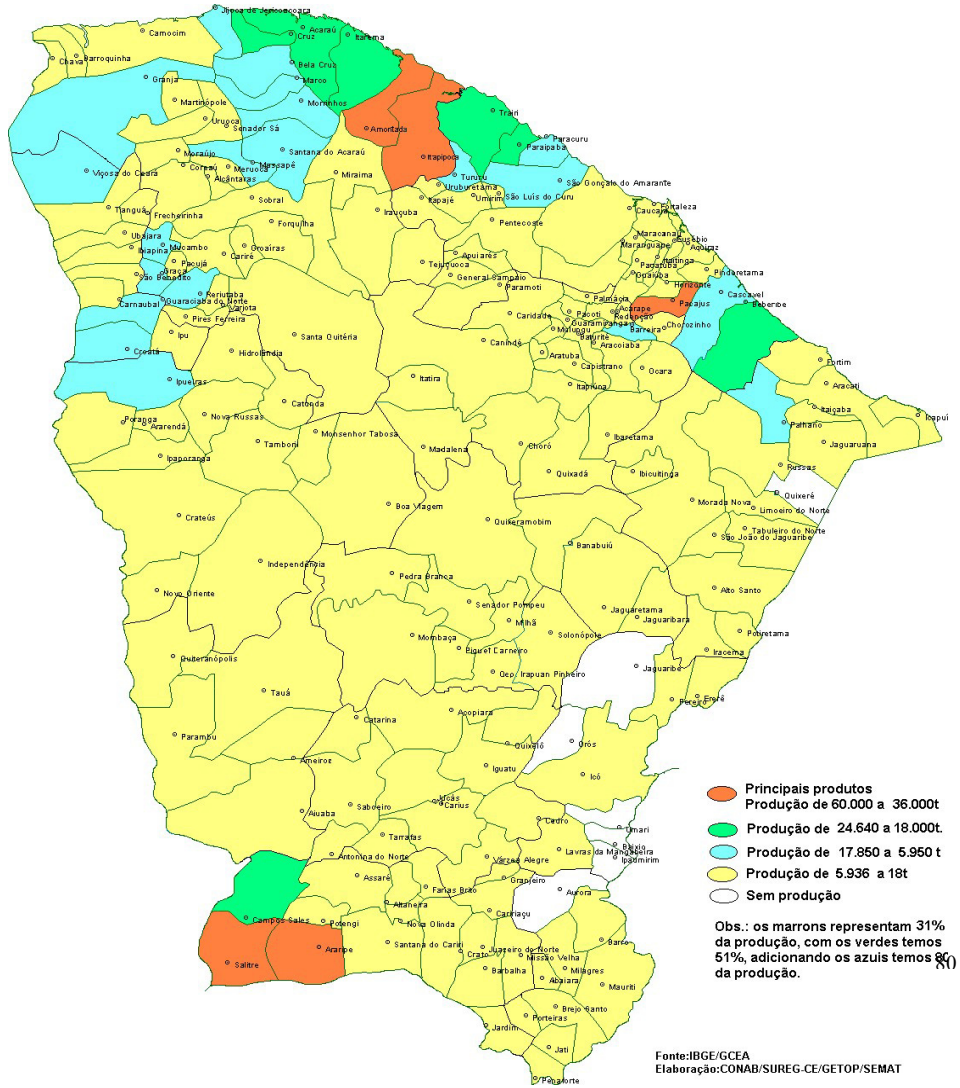


FIGURA 2 – Mapa do estado do Ceará, mostrando a produção de mandioca (em toneladas) em 2001, em diferentes municípios.

1.3. Propagação da Mandioca

A mandioca é propagada vegetativamente, a partir de estacas, chamadas de manivas-sementes, sendo a propagação em campo muito lenta. São produzidas em média, a cada ano, sob condições adequadas de cultivo, estacas para o plantio de uma área oito vezes maior que a de sua origem. Além disso, várias doenças, principalmente as sistêmicas, podem ser transmitidas por meio de sucessivas gerações, tais como as causadas por vírus e bactérias (OLIVEIRA *et al.*, 2000).

Em virtude da baixa taxa de propagação da cultura e da irregularidade climática da região Nordeste, a produção de manivas-sementes deve ser realizada em nível de comunidade, com apoio de programas governamentais que forneçam orientação técnica e sementes básicas de cultivares superiores e livres de pragas e doenças (CAVALCANTI, 2002).

1.4. Regeneração de Plantas *in vitro*

Apesar da extensa utilização da regeneração de plantas *in vitro* em processos biotecnológicos, pouco se conhece, até o momento, sobre os mecanismos envolvidos na aquisição de competência para regeneração. Pode-se dizer que, virtualmente, todos os processos tecnológicos são derivações de conhecimentos básicos adquiridos nos mais variados campos da ciência (PERES, 2002).

O termo desenvolvimento refere-se ao crescimento integrado das várias partes de um ser pluricelular envolvendo basicamente, os processos de divisão, expansão e diferenciação celular e a conseqüente formação de tecidos, órgãos e sistemas. Plantas e animais possuem notáveis diferenças quanto ao tipo de desenvolvimento. Enquanto praticamente todo o desenvolvimento dos animais se processa durante uma etapa denominada embriogênese, nas plantas essa etapa se limita à formação de um eixo contendo os meristemas caulinar e radicular em pólos opostos. Por meio das atividades desses meristemas, as plantas realizam um desenvolvimento pós-

embrionário, ou seja, continuam formando órgãos (caules, raízes, folhas, flores e frutos) ao longo de todo o seu ciclo de vida. Esse tipo de desenvolvimento constitui uma estratégia para que os vegetais possam se adaptar às variações no ambiente, já que são organismos sésseis e, portanto, não podem utilizar a locomoção para buscar ambientes favoráveis (PERES, 2002).

Uma das principais características do desenvolvimento pós-embrionário dos vegetais é justamente a separação temporal entre os processos de embriogênese e organogênese. A separação temporal entre embriogênese e organogênese torna-se relevante quando se procura regenerar plantas *in vitro*, pois o que se faz nada mais é do que tentar reproduzir essas duas etapas em condições artificiais (PERES, 2002).

A tecnologia da cultura de células, de protoplastos e de tecidos de plantas constitui uma das áreas de maior êxito da biotecnologia. Após quase meio século de progresso, esta tecnologia conquistou destacada posição na propagação comercial e industrial de plantas, no melhoramento genético, no manejo, no intercâmbio e conservação de germoplasma e em outras aplicações como as pesquisas em fisiologia vegetal e produção industrial *in vitro* de compostos secundários. Técnicas de cultura de tecidos são usadas para produção de plantas livres de doenças e para propagação em massa da plantas com interesse econômico ou acadêmico. Métodos de regeneração *de novo* são essenciais para o desenvolvimento de sistemas de transformação (PUONTI-KAERLAS, 1998).

1.4.1. Micropropagação

Ápices caulinares, gemas axilares e meristemas isolados são os explantes mais indicados na propagação clonal *in vitro*. Eles possuem determinação para o crescimento vegetativo e, satisfeitas as necessidades nutricionais, irão se desenvolver naturalmente em plantas (TORRES *et al.*, 1998).

O ápice caulinar consiste do meristema apical com primórdios foliares subjacentes e, em algumas situações, inclui as folhas emergentes. Seu tamanho pode variar de 0,3 a 20 mm ou mais. A cultura de meristemas apicais é utilizada para recuperação de plantas livres de vírus, conservação e intercâmbio de germoplasma e transformação genética. Convém ressaltar que a denominação de plantas livres de vírus somente deve ser empregada no sentido de livre de vírus para as quais foi indexada (TORRES *et al.*, 1998).

A multiplicação através de gemas axilares abrange a maioria dos sistemas de micropropagação. As gemas axilares que naturalmente se formam nas inserções das folhas são estimuladas a crescer, dando origem a novas partes aéreas, que por sua vez, repetem o mesmo processo. As partes aéreas produzidas são em seguida enraizadas e transplantadas (TORRES *et al.*, 1998).

Gemas adventícias são aquelas originadas em locais diferentes daquelas onde se formam no curso normal de desenvolvimento da planta. A sua formação ocorre de maneira direta ou indireta. A organogênese direta refere-se ao surgimento direto das gemas a partir de tecidos que apresentam potencial morfogenético na planta *in vivo*, mas que em geral, não se expressa. Esses tecidos incluem câmbio vascular, base de pecíolo em dicotiledôneas, base de folhas e escamas em bulbos de monocotiledôneas e segmentos de raízes, entre outros. A organogênese indireta ocorre quando o processo de regeneração de gemas é precedido pela formação de calo. A partir de células não organizadas do calo, surgem gemas adventícias que crescem e se desenvolvem em novas partes aéreas. Seja qual for a maneira, as partes aéreas produzidas são individualizadas, enraizadas e transplantadas. Sob o aspecto de integridade clonal, gemas adventícias são desejáveis como sistema de multiplicação, desde que a formação de calo seja mínima ou nula. (TORRES *et al.*, 1998)

1.4.2. Embriogênese Somática

Segundo SMITH *et al.* (1986), a embriogênese somática é o processo de desdiferenciação de células somáticas, formando uma estrutura bipolar que se desenvolverá numa nova planta. Os embriões somáticos são semelhantes aos embriões zigóticos e podem amadurecer e germinar. Algumas diferenças podem ser percebidas como o desenvolvimento livre de correlações físicas, fisiológicas e genéticas, as quais ocorrem durante o desenvolvimento de um embrião zigótico e a ausência de endosperma nos embriões somáticos. Uma particularidade dos embriões somáticos é a presença de um sistema vascular fechado, sem conexão vascular com os tecidos do explante inicial. Essas características diferem os embriões somáticos dos propágulos resultantes dos processos de micropropagação e de organogênese (ZIMMERMAN, 1993).

Células em diferentes estádios de diferenciação podem ser induzidas na embriogênese somática por estímulos ambientais ou químicos e, quando reprogramadas, adquirem novas competências morfogenéticas formando células embriogênicas (DODEMAN *et al.*, 1997).

A formação de embriões a partir de tecidos somáticos *in vitro* imita a embriogênese zigótica, que ocorre nos órgãos reprodutivos das plantas. Desse modo, tanto a embriogênese somática quanto a zigótica culminam na formação de uma planta inteira a partir de uma única célula. Contudo, em certos explantes, os embriões somáticos formam-se a partir da diferenciação conjunta de grupos de células embriogênicas (PERES, 2002).

Nos dois processos de regeneração, há necessidade do estabelecimento de células competentes no explante inicial. Tanto as células meristemáticas, que darão origem às gemas caulinares, quanto as células embriogênicas, podem se formar posteriormente ou podem estar preexistentes no explante. No caso do explante já possuir células meristemáticas ou embriogênicas, ocorrerá organogênese direta e embriogênese direta, respectivamente. Quando há necessidade de desdiferenciação do explante, com a conseqüente formação de calo prévia ao estabelecimento das células

competentes, ocorrerá organogênese ou embriogênese indireta (PERES, 2002).

1.4.3. Organogênese

Segundo ZHANG *et al.* (2000a) a organogênese pode ser definida como a formação e crescimento de órgãos monopolares, como partes aéreas e raízes, a partir de explantes. Esses órgãos desenvolvem vascularização de origem procambial que estabelece uma conexão com o tecido vascular pré-existente no explante. A regeneração de plantas via organogênese pode ser obtida a partir de órgãos adventícios em calo ou suspensão celular derivada do explante, ou através da emergência de órgãos adventícios, diretamente do explante.

A obtenção de organogênese *in vitro* é um processo empírico onde são testados para cada espécie, ou mesmo para cada variedade dentro de uma espécie, as seguintes condições: I) fonte de explante; II) composição mineral do meio de cultura (e também suas vitaminas e fontes de carbono); III) balanço hormonal e IV) condições ambientais (PERES, 2002)

Embora seja um processo empírico, o desenvolvimento de um protocolo para organogênese *in vitro* será facilitado, e, inclusive, o número de variáveis a serem testadas diminuirá, se forem seguidos alguns princípios e conhecimentos fisiológicos. Desse modo, quanto à fonte de explante, normalmente haverá maior sucesso se forem utilizados tecidos jovens, que possuem maior competência organogenética (PERES, 2002).

Diferenças significativas na capacidade organogenética *in vitro* são encontradas ao se variar a composição mineral, as vitaminas e as fontes de açúcares dos meios de cultura. Contudo, os componentes mais críticos adicionados ao meio de cultura são os hormônios vegetais. Os principais hormônios utilizados na organogênese são as auxinas e as citocininas. Outras classes de hormônios vegetais, como as giberelinas, o etileno e o ácido abscísico ou mesmo substâncias que não sejam propriamente hormônios, como poliaminas, ácido salicílico e jasmonatos também são, muitas vezes,

utilizados em processos de regeneração por organogênese. Existe considerável número de evidências de que o efeito dessas substâncias é indireto, através da alteração do balanço auxina/citocinina endógeno. O próprio efeito das auxinas e das citocininas aplicadas ao meio de cultura parece ser, na verdade, o reflexo dessas substâncias alterando os balanços endógenos de auxina/citocininas nas células vegetais (PERES *et al.*, 1999).

As condições ambientais influenciam notavelmente a organogênese *in vitro*. Normalmente as salas de cultivo são mantidas em temperatura ambiente (25° C), sendo a luz o fator ambiental que parece mais afetar a organogênese. Muitos protocolos de regeneração são conduzidos no escuro, sobretudo para evitar a oxidação do explante na fase de estabelecimento. Esse procedimento baseia-se no fato de a enzima chave da produção de compostos fenólicos, a fenilalaninamonioliase, ser dependente da luz (PERES, 2002).

No processo de organogênese, a competência seria entendida como a capacidade de responder ao estímulo hormonal necessário à indução da formação do órgão. A falha de competência de um tecido poderia refletir, portanto, a falta de receptores para a classe hormonal que irá induzir o processo organogenético (PERES, 2002).

Um fator associado à falta de competência organogenética seria o próprio metabolismo hormonal do explante, pois é ele que determinará, em última análise, o balanço hormonal endógeno para indução da organogênese. Desse modo, explantes com alta atividade de citocinina oxidase, enzima que degrada citocininas, podem não chegar a um balanço auxina/citocinina endógeno indutor da formação de gemas, mesmo que sejam adicionadas elevadas concentrações de citocininas ao meio de cultura. De modo semelhante, explantes com elevada atividade de degradação oxidativa ou de inativação de auxina por conjugação com açúcares e aminoácidos podem falhar na indução de raízes adventícias. O efeito diferencial dos vários tipos de auxinas e citocininas quando aplicados ao meio de cultura pode ser também correlacionado com o fato de cada um deles interferir de modo particular no metabolismo hormonal endógeno (PERES & KERBAUY, 1999).

Explantos comprometidos para vias particulares de desenvolvimento (elevada determinação para formar um órgão específico) podem falhar na alteração dessa via para assumir uma outra. De modo geral, pode-se dizer que, quanto maior for a determinação de um explante para uma via de desenvolvimento (por exemplo, a formação de raízes) menor será a competência para formar outro tipo de órgão (por exemplo, gemas caulinares). Um exemplo de tecido com baixa determinação e elevada competência tanto para formação de raízes quanto de gemas caulinares é o calo. Tanto a aquisição de “competência” quanto a “determinação” são reflexos da expressão diferencial de genes envolvidos nos processos de desenvolvimento. Resta saber, portanto, que tipo de genes seriam esses (PERES & KERBAUY, 1999).

A regeneração de um explante depende tanto da sensibilidade quanto do metabolismo para uma determinada classe hormonal. Desse modo, genes associados à capacidade de regeneração poderiam ser os próprios genes que codificam componentes da via de transdução de sinal ou as enzimas do metabolismo hormonal. Além disso, para que um tecido se diferencie em um determinado órgão, faz-se necessário que ele possua a capacidade de expressão dos chamados “genes mestres”, que coordenam a expressão dos vários genes que serão requeridos durante a organogênese. Nesse sentido, explantes que falham em formar um determinado órgão *in vitro*, por estarem “determinados”, podem ter perdido a capacidade de expressão de “genes mestres” durante um processo intenso de diferenciação sofrido anteriormente (PERES, 2002).

1.5. Cultura de Tecidos em Mandioca

A regeneração da mandioca, tanto por organogênese quanto por embriogênese somática, foi conseguida por vários grupos de pesquisa, em diferentes países (PUONTI-KAERLAS, 1998). A regeneração através da embriogênese somática direta foi estabelecida e tem sido usada amplamente (ROCA, 1990; RAEMAKERS *et al.*, 1993a,b; KONAN *et al.*, 1994 e 1997;

SMITH *et al.*, 1986; LI *et al.*, 1996 e 1998; ZHANG *et al.*, 2000 a,b,c; PUONTI-KAERLAS *et al.*, 1998).

Embora a regeneração através da embriogênese somática seja agora um procedimento comum para algumas cultivares de mandioca, ela é genótipo dependente e não há como prever se determinado protocolo desenvolvido para uma cultivar pode ou não ser aplicado a outras cultivares (PUONTI-KAERLAS, 1998).

STAMP & HENSHAW (1986) foram os primeiros a desenvolver protocolos para a embriogênese somática de mandioca. Esses estudos tomaram uma velocidade e uma eficiência maiores a partir dos anos noventa.

RAEMAKERS *et al.* (1993), desenvolveram um protocolo para indução, germinação e desenvolvimento de partes aéreas de embriões somáticos e obtiveram embriões somáticos da variedade MCol 22 utilizando lobos foliares incubados em meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), suplementado com 2,4-D na concentração de 4 e 8 mg/L. Embriões secundários foram obtidos após 10 dias de incubação de cotilédones de embriões primários no mesmo meio de cultura. Após 25 dias de cultivo, os embriões no estágio de torpedo, ainda no explante, foram transferidos para meio MS suplementado com 20 % de sacarose e BAP 0,1 mg/L, a fim de obter embriões germinados. Sucessivos ciclos embriogênicos foram realizados com a cultura de embriões secundários (embriogênese cíclica).

RAEMAKERS *et al.* (1993c), apresentaram um protocolo aperfeiçoado para a embriogênese somática cíclica onde foi possível obter mais embriões somáticos no meio líquido do que no meio sólido. O meio sólido possui algumas desvantagens quando comparado ao meio líquido, porque somente a parte basal dos explantes está em contato com o meio e os nutrientes e reguladores de crescimento absorvidos são limitados, sendo formados gradientes. A maior homogeneidade do meio líquido seria a melhor explicação para a sincronização do desenvolvimento de embriões somáticos nesse meio líquido.

Esses autores observaram uma maior produção de embriões no meio líquido e num espaço de tempo menor. O desenvolvimento, além de ser mais rápido, era sincronizado. Outra grande vantagem era a remoção mecânica, devido à agitação, dos calos que se formavam junto ao explante. Segundos esses autores, os calos inibem a formação de embrião.

LI *et al.* (1998), usaram lobos de folhas imaturas de 1- 6 mm de diâmetro para indução de embriões somáticos primários no meio básico (MS) suplementado com 2,4-D (4, 6 e 8 mg/L) na ausência de luz. Após 14 a 20 dias os embriões somáticos formados foram transferidos para o meio de maturação (meio básico suplementado com 0,1 mg/L de BAP). Após 10 a 15 dias, os cotilédones verdes, dos embriões em desenvolvimento, foram cortados em pequenas áreas e inoculados em meio indutor de organogênese de partes aéreas (meio básico MS suplementado com BAP 1,0 mg/L e AIB 0,5 mg/L) na obscuridade. Após 20 dias de incubação, as partes aéreas foram isoladas e transferidas para o meio de alongamento (meio básico, suplementado com BAP 0,4 mg/L) e, finalmente, para o meio de enraizamento (meio sem reguladores de crescimento). As partes aéreas enraizadas foram transplantadas para o solo e adaptadas em casa de vegetação.

ANTHONY *et al.* (1995), desenvolveram protocolos para a produção e manutenção de protoplastos, obtidos a partir de folhas de plantas cultivadas *in vitro*.

1.5.1. Cultura de Meristemas e Eliminação de Doenças

Técnicas de cultura de meristemas apicais foram desenvolvidas há mais de 20 anos e são bastante usadas para a produção de plantas livres de vírus. A propagação *in vitro* através de explantes de ápices caulinares é agora um procedimento já estabelecido na cultura de mandioca. Em condições de termoterapia ou em condições de cultura mínima de crescimento, a propagação *in vitro* tem sido utilizada para a manutenção e multiplicação de clones livres de

vírus e reserva de germoplasma, respectivamente. (PUONTI-KAERLAS *et al.*, 1998).

Meristemas foram usados como explantes para obter plântulas livres de vírus ou doenças e para cultura de partes aéreas múltiplas das variedades elite da mandioca (KARTHA & GAMBORG 1975; ROCA 1990). A cultura de meristemas derivados de gemas axilares ou apicais em meio contendo 5-10 mg/L BAP, resulta na formação de várias brotações de gemas adventícias (KONAN *et al.* 1994 e 1997; PUONTI-KAERLAS *et al.* 1998).

1.5.2. Micropropagação

A propagação da mandioca via estacas (ou manivas-sementes) é lenta e uma planta produz apenas 10 a 20 estacas por ano (ROCA, 1990). A micropropagação *in vitro*, baseada na cultura de meristemas apresenta-se com um grande potencial, pois, teoricamente, os protocolos mais eficientes de indução de múltiplas partes aéreas foram estimados em ser capazes de produzir $1,2 \times 10^{20}$ novas partes aéreas por ano (SMITH *et al.*, 1986).

A regeneração através do superbrotamento de partes aéreas em gemas axilares e meristemas pode ser obtida adicionando-se citocinina ao meio (KONAN *et al.*, 1994). Esses autores postulam que, teoricamente, utilizando esse protocolo, seja possível produzir em 1 ano, a partir de uma única gema lateral, um milhão de plantas. Muitos ápices são derivados de gemas pré-existentes, porém ocorre a formação de gemas adventícias. Gemas axilares podem ser pré-incubadas em meio com alta concentração de citocinina e transferidas para o meio indutor de superbrotamento, suplementado com thidiazuron e ácido giberélico, com bons resultados (BHAGWAT *et al.*, 1996).

1.5.3. Conservação de Germoplasma

Bancos de germoplasma *in vitro* são alternativas para a substituição de bancos mantidos em campo, sujeitos a toda sorte de problemas. Com esse objetivo, protocolos que desaceleram o crescimento de plantas *in vitro* foram desenvolvidos (PUONTI-KAERLAS *et al.* 1998). No entanto, mesmo com o crescimento retardado, as constantes repicagens podem causar alterações genéticas. Outra técnica desenvolvida para a conservação de germoplasma e que evita esse problema é a criopreservação.

1.5.4. Embriogênese Somática

A auxina é o fator chave para a indução direta de embriões somáticos (STAMP, 1987; SZABADOS *et al.*, 1987; MATHEWS *et al.*, 1993; SARRIA *et al.*, 2000; MA., 1998; MA & XU, 2002)

A produção de embriões somáticos foi relatada pela primeira vez em cotilédones e eixos embrionários de embriões zigóticos de mandioca, em 1982 (STAMP & HENSHAW, 1986) e, atualmente, esse método é o mais comumente usado para a regeneração de plantas de mandioca. A competência para a embriogênese somática está restrita a tecidos meristemáticos e embriogênicos e a um limitado número de explantes, como por exemplo: cotilédones e eixos embrionários de embriões zigóticos (STAMP & HENSHAW, 1986; KONAN *et al.*, 1992, 1994), lobos foliares imaturos (STAMP & HENSHAW, 1986; SZABADOS *et al.*, 1987; MATHEWS *et al.*, 1993; LI *et al.*, 1996, 1998), meristemas e ápices caulinares (SZABADOS *et al.*, 1987) e inflorescências imaturas (WOODWADR & PUONTI-KAERLAS, 2001).

Segundo MA & XU (2002), a auxina foi o regulador de crescimento crucial nos estádios iniciais da indução de embrião. Contudo, uma vez induzidos, a auxina passou a inibir a germinação desses embriões para a formação de partes aéreas. O BAP não apresentou relação com a indução de embriões, mesmo quando combinado com 2,4-D ou ANA, ao contrário,

apresentou até uma certa inibição. Porém, uma vez induzidas as células embriogênicas, o BAP foi fundamental para o desenvolvimento de novas partes aéreas.

Essas observações coincidem com estudos prévios sobre organogênese a partir de cotilédones de embriões somáticos (LI *et al.*, 1998; MA, 1998).

Normalmente, a regeneração de plantas via embriogênese somática é baixa (SZABADOS *et al.*, 1987; MA, 1998), exceto quando os embriões são submetidos a dessecação (MATHEWS *et al.*, 1993).

RAEMAKERS *et al.*, (1993a) observaram que a indução de embriões aumentava significativamente a partir do primeiro ciclo de embriogênese secundária e que, até o nono ciclo essa característica não era perdida. Eles classificaram os embriões, de acordo com o seu estágio de desenvolvimento, em torpedos e germinados. A conversão em planta foi incrementada com BAP (1 mg/L) e o enraizamento foi possível em meio sem regulador de crescimento. Não foi observada diferença genotípica entre as plantas regeneradas dessa maneira e as parentais cultivadas *in vitro*.

A utilização do meio líquido, para a embriogênese somática secundária de mandioca, otimizou o desenvolvimento dos embriões quando comparado ao meio sólido. Também a facilidade para isolar embriões desenvolvidos dos explantes em meio líquido é maior que a no meio sólido. A remoção mecânica dos calos formados nos explantes no meio líquido é de fundamental importância para um melhor desenvolvimento dos embriões. A obtenção de embriões somáticos, em meio líquido possui muitas vantagens quando comparada com a cultura em meio sólido. A produção é superior, o procedimento consome menos tempo e o desenvolvimento é rápido e mais sincronizado, além de um excelente material embriogênico para experimento de transformação (RAEMAKERS *et al.*, 1993a).

A indução de embriões somáticos também é afetada pela concentração de sais do meio, pelo uso de carvão ativado e pela utilização do regulador de crescimento ABA.

Segundo GROLL *et al.*, (2002a), a melhor concentração foi a do meio MS completo e a germinação desses embriões foi otimizada com o uso da dessecação com sulfato de potássio. Eles observaram também, o efeito positivo do carvão ativado na embriogênese somática e do ABA antes da germinação dos embriões.

Segundo DANSO & FORD-LLOYD, (2002), a adição de sulfato de cobre ao meio aumenta a regeneração via embriogênese somática. Talvez por ser um ativador de muitas enzimas envolvidas no metabolismo como também por ser inibidor do etileno. Esses autores observaram, também, que a ausência de luz é importante para o aumento na produção de embriões.

Segundo DODEMAN *et al.*, 1997, a ação sequencial e interativa de muitos genes está claramente envolvida no estabelecimento de eixos embrionários, porém o papel preciso de cada um desses genes ainda é desconhecido. Moléculas sinalizadoras, como os reguladores de crescimento, tiveram um importante papel no desenvolvimento dessas estruturas

1.5.5. Organogênese

LI *et al.* (1996 e 1998) e MUSSIO *et al.* (1998) obtiveram sucesso na regeneração de plantas via organogênese usando diferentes explantes. Partes aéreas adventícias foram induzidas a partir de cotilédones de embriões somáticos da cultivar MCol 22 após a cultura em meio de organogênese contendo BAP 1 mg/L e IBA 0,5 mg/L durante 20 dias (LI *et al.* 1996, 1998). Após passagem para meio de alongamento (meio MS suplementado com BAP 0,4 mg/L), as partes aéreas regeneradas foram enraizadas em meio livre de reguladores e foram transplantadas para o solo. Esse protocolo foi aplicado com sucesso em outras cultivares. Esses autores afirmaram ser esse o método mais adequado para a regeneração de plantas transformadas, uma vez que os embriões somáticos são bastante sensíveis aos antibióticos adicionados ao meio seletivo.

MA (1998), desenvolveu protocolos de organogênese de partes aéreas, em cotilédones somáticos, para a cultivar Nanzhi 188, utilizando diferentes combinações de citocininas e auxinas, com uma alta frequência de indução sendo obtida com TDZ (4,4 μM) e ANA (1,1 μM).

MA & XU (2002), demonstraram que a auxina era o fator chave para a indução de células embriogênicas. Após a indução, se a auxina fosse mantida no meio, aumentava-se a produção de embriões, porém, se o material fosse transferido para um meio com BAP, gemas adventícias seriam formadas.

Segundo ZHANG *et al*, (2001), o nitrato de prata mostrou-se eficaz na regeneração de plantas e na embriogênese somática em relação a várias espécies cultivadas como: *Brassica spp*, milho, feijão, arroz, trigo, amendoim, cevada, pepino e melão. Os íons prata (Ag^+) podem evitar uma ampla variedade de respostas ao etileno, incluindo inibição do crescimento e senescência. Isso pode se dever à inibição da ação fisiológica do etileno. O efeito do nitrato de prata sobre a organogênese parece ser genótipo-dependente e até o momento, são necessários mais estudos para esclarecer a utilidade desse composto na indução de organogênese na mandioca. Segundo ainda esse autor, a formação de calos inibe a formação de partes aéreas, com um coeficiente de correlação negativo de $-0,82$.

1.5.6. Histologia

Em mandioca, embriões somáticos, aparentemente, originam-se de grupos de células e formam uma estrutura bipolar fechada, semelhante ao embrião zigótico, sem conexão vascular com o explante (STAMP, 1987).

Segundo EMONS (1994), as células que originam embriões somáticos são chamadas de células embriogênicas e o padrão de desenvolvimento apresenta certa semelhança entre algumas espécies estudadas, como por exemplo: 1. a formação começa a partir de um grupo de células de citoplasma denso; 2. após várias divisões sem expansão celular, as células formam estruturas globulares consistentes; 3. forma-se, então, uma estrutura bipolar.

Em cereais, a região inicial de aparecimento de células embriogênicas difere das dicotiledôneas, onde se inicia nas regiões vasculares (TSUKAHARA & KOMAMINE, 1997).

Células embriogênicas lembram células meristemáticas, pois são pequenas, têm citoplasma denso, um grande nucléolo indicando intenso metabolismo de RNA e pequenos grãos de amido (MICHAUX-FERRIÈRE & SCHWENDIMAN, 1992). Segundo ainda esses autores, as células da região embriogênica que não formam embriões, iniciam o processo de diferenciação: vacuolização, mudanças no volume celular e desaparecimento dos grãos de amido.

Em fruteiras, os embriões somáticos parecem ter origem a partir de massas de células que se desenvolvem de uma única célula, ou de várias células em diferentes áreas do explante (LITZ & GRAY, 1992).

Segundo BUFFARD-MOREL *et al.* (1992), em *Cocos nucifera* L. as formações embriogênicas resultam de divisões mitóticas perivasculares, havendo a diferenciação de uma camada semelhante ao periciclo da raiz.

Em café (*Coffea arabica* L.) a formação de embriões começa a partir de células isodiamétricas sem plastídios visíveis, de citoplasma denso e núcleo proeminente, com planos de divisões organizados (QUIROZ-FIGUEROA *et al.*, 2002). Mais de 90% das divisões celulares iniciais são periclinais.

Em amendoim (*Arachis hypogaea* L.), CHENGALRAYAN *et al.* (2001) mostraram estudos histológicos comprovando que tanto estruturas embriogênicas como gemas adventícias desenvolvem-se diretamente do mesofilo e são de origem multicelular. Divisões periclinais predominam até o 7º dia após inoculação, com as células apresentando muitas granulações. A partir do 15º dia ocorrem divisões anticlinais e as células exibem citoplasma denso e núcleo com grandes nucléolos. Após 30 dias formam-se as estruturas globulares. A organogênese de partes aéreas iniciou-se com o aumento do volume celular (4 dias) e aos 7 dias, as células experimentaram divisões anticlinais. Esses autores concluíram que a auxina 2,4-D induzia as divisões

periclinais, que culminavam com a formação de estruturas embriogênicas, e que o BAP induzia divisões anticlinais que iniciavam a organogênese.

Em *Camellia japonica*, uma árvore ornamental de onde se utiliza a madeira e é extraído o óleo, PEDROSO & PAIS (1995) observaram embriogênese direta nas folhas e o acúmulo de amido e cristais de oxalato de cálcio nas células da região induzida. Ambos desaparecem nas células que formaram embriões. Foi observado um aumento na concentração de cálcio livre e na calmodulina.

Em ervilha (*Pisum sativum*) os embriões somáticos têm origem multicelular e as células que contornam as estruturas embriogênicas contêm grãos de amido, porém não às que formarão o embrião (LOISEAU *et al.*, 1998).

Gemas adventícias desenvolvem-se, usualmente, na periferia do explante (camada sub-epidérmica), e muitos estudos sobre organogênese em fruteiras demonstraram uma origem unicelular, embora a origem pluricelular também seja possível (LITZ & GRAY, 1992). Ainda segundo esses autores, células epidérmicas, além das células do parênquima paliçádico, participam da formação da gema adventícia, sofrendo divisões anticlinais, formando, posteriormente, protuberâncias na superfície do explante.

1.5.7. Transformação Genética da Mandioca

Muitos dos problemas relacionados à cultura da mandioca, como o baixo valor nutricional, susceptibilidade a insetos, bactérias e vírus, cianogênese etc., podem agora, teoricamente, ser resolvidos através da engenharia genética, uma vez que os protocolos foram disponibilizados, embora a maioria dos genes esteja protegida por leis de propriedade intelectual.

Desde 1996, três métodos de transformação genética provaram ser capazes de produzir plantas transgênicas de mandioca. Foram eles, bombardeamento de micropartículas (SCHOPKE *et al.*, 1996; RAEMARKERS *et al.*, 1997; ZHANG *et al.*, 2000b; TAYLOR *et al.*, 2001), eletroporação (SOFIARI *et al.*, 1998) e transferência via *Agrobacterium* (LI *et al.*, 1996;

GONZÁLEZ *et al.*, 1998; SARRIA *et al.*, 2000; ZHANG *et al.*, 2000a; SCHREUDER *et al.*, 2001).

O método mais apropriado dependerá da cultivar utilizada e das condições de cada laboratório.

1.6. Potencial da Engenharia Genética no Melhoramento da Mandioca

A Cassava Biotechnology Network (CBN) foi fundada em 1988, com o objetivo de colocar em contato estreito todos os pesquisadores e instituições interessadas na biotecnologia da mandioca (THRO *et al.*, 1999). A CBN estabeleceu como prioridades para o melhoramento da mandioca os seguintes tópicos:

- O melhoramento da quantidade e da qualidade do amido.
- O estudo da bioquímica e genética molecular da fermentação, para o desenvolvimento de novos produtos e melhoramento do sabor, da textura, e valor nutricional.
- O manejo integrado de pragas, incluindo interação hospedeiro / peste.
- A resistência a doenças virais.
- A modificação da bioquímica da cianogênese para uma melhor capacidade de uso e produção da mandioca.
- A caracterização molecular e citológica de genomas da espécie *Manihot esculenta* Crantz.
- A caracterização e clonagem de genes e promotores úteis.
- O melhoramento de técnicas de transformação genética.

Para tanto, faz-se necessário o desenvolvimento de protocolos de regeneração e transformação genética que sejam adequados ao maior número de cultivares.

1.7. Importância da Biotecnologia para o Cultivo da Mandioca no Ceará

Com o trabalho de articulação da CBN (criada em 1998), uma série de tecnologias foram disponibilizadas à comunidade interessada em explorar aspectos da biotecnologia da mandioca. Dessa forma, protocolos de regeneração e transformação podem ser desenvolvidos para cultivares de interesse econômico no Estado do Ceará, possibilitando, dentre outras vantagens, a melhoria da qualidade sanitária (limpeza clonal), a multiplicação de plantas elite em larga escala, a melhoria da qualidade nutricional, não somente das raízes tuberosas como também das folhas, a resistência a doenças e pragas etc.

O grupo do Prof. Francisco Campos, do Departamento de Bioquímica da UFC, iniciou os estudos sobre a biotecnologia da mandioca aqui no Ceará e protocolos de regeneração já estão disponibilizados para as cultivares Rosa e Amansa-Burro (PONTE, 2002) e Rosinha e Água Morna (FEITOSA, dados não publicados). Protocolos de transformação genética via *Agrobacterium* estão sendo desenvolvidos (FEITOSA, dados não publicados).

O nosso trabalho se insere nesse contexto, disponibilizando protocolos de regeneração para 2 cultivares de grande importância econômica aqui no Ceará, uma vez que são amplamente cultivadas na região litorânea.

Dessa forma, criam-se as condições de melhoria dessa importante cultura, incrementando a economia estadual, possibilitando o surgimento de indústrias modernas, desenvolvendo um fator gerador de emprego e renda no campo.

2. OBJETIVOS

2.1. Gerais

Estudar os aspectos da embriogênese somática e organogênese de partes aéreas em cultivares de mandioca do Estado do Ceará.

2.2. Específicos

Estudar o efeito de determinados reguladores de crescimento na indução de embriogênese somática e na formação de gemas adventícias e desenvolvimento de partes aéreas.

Estabelecer os protocolos de indução de embriões somáticos primários e de manutenção de embriogênese somática cíclica.

Estabelecer os protocolos de regeneração de plantas via organogênese de partes aéreas em cotilédones somáticos.

Analisar histologicamente os processos de embriogênese somática e organogênese de partes aéreas numa das cultivares de mandioca utilizadas.

Avaliar a interação do genótipo com os tratamentos estabelecidos.

3. MATERIAIS

3.1. Material Vegetal

Para o desenvolvimento deste estudo foram utilizadas as cultivares de mandioca Tapicínea e Bujá Preta, constantes do Banco Ativo de Germoplasma (BAG) do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará.

Essas cultivares foram escolhidas por ser amplamente cultivadas na região litorânea do estado do Ceará.

3.2. Reagentes

Todos os reagentes utilizados neste trabalho foram de grau analítico e estão relacionados na TABELA 3.

TABELA 3 – Relação de reagentes utilizados nos experimentos

Reagente	Procedência
Agargel (A-3301)	Sigma Chemical Co., St. Louis, USA
AIB (I-5386)	Sigma Chemical Co., St. Louis, USA
Alcool butílico	Reagen (Quimibras Ind. Químicas S/A)
Azul de astra	Reagen (Quimibras Ind. Químicas S/A)
Azul de toluidina	Merck Sharp & Dohme do Brasil
BAP (B-3408)	Sigma Chemical Co., St. Louis, USA
Entellan (resina sintética)	Merck Sharp & Dohme do Brasil
Fosfato de sódio monobásico	Leica Corporate, USA
Fucsina	Merck Sharp & Dohme do Brasil
Glutaraldeído	Merck Sharp & Dohme do Brasil
Hipoclorito de sódio	Reagen (Quimibras Ind. Químicas S/A)
Historresina (glicol metacrilato)	Merck Sharp & Dohme do Brasil
Mistura de vitaminas (M-7150)	Sigma Chemical Co., St. Louis, USA
Paraformaldeído	Reagen (Quimibras Ind. Químicas S/A)
Paraplasto	Reagen (Quimibras Ind. Químicas S/A)
Picloram (P-5575)	Sigma Chemical Co., St. Louis, USA
Sacarose (S-5391)	Sigma Chemical Co., St. Louis, USA
Safranina	Reagen (Quimibras Ind. Químicas S/A)
Sais MS (S-5524)	Sigma Chemical Co., St. Louis, USA
Sulfato de cobre (C-8027)	Sigma Chemical Co., St. Louis, USA
Xilol	Reagen (Quimibras Ind. Químicas S/A)

4. MÉTODOS

4.1. Estabelecimento da Cultura *in vitro* e Micropropagação

Hastes caulinares de aproximadamente 7 cm de comprimento (Fig. 3A) das variedades Tapicínea e Bujá-Preta, foram obtidas de plantas cultivadas no Jardim Botânico Didático do Depto. de Biologia da UFC. Após a retirada das folhas, o material foi desinfestado em solução de hipoclorito de sódio (1 %) por 10 minutos e lavado com água estéril, sob uma câmara de fluxo laminar.

Com o auxílio de um estereomicroscópio (ausJena) procedeu-se a retirada das gemas laterais (FIGURA 3A) e a dissecação do ápice para a obtenção da região meristemática (FIGURA 3B). O material foi inoculado em meio básico MS (Murashige & Skoog, 1962), suplementado com sacarose (2 %), sulfato de cobre (2 μM) e agargel (0,6 %) e o pH ajustado para 5,8. Pode-se observar o desenvolvimento do meristema após 10 dias de incubação (FIGURA 3C) e o enraizamento após 30 dias (FIGURA 3D). Todos os meios de cultura utilizados no presente estudo, foram autoclavados a 121 °C por 15 minutos. A incubação ocorreu a $27 \pm 2^\circ \text{C}$, num fotoperíodo de 16 horas. A cada 4 semanas, era feita a multiplicação do material através da separação e inoculação das regiões nodais (± 5) em meio fresco. As plantas foram mantidas em sala de cultura com luminosidade de $37 \mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$.

Todos os procedimentos que necessitavam de ambiente estéril foram realizados sob capela de fluxo laminar.

4.2. Embriogênese Somática Primária

Todos os experimentos relativos a embriogênese e organogênese foram realizados de acordo com ZHANG *et al.* (2000b), com algumas modificações. Ápices caulinares de plantas cultivadas *in vitro*, com aproximadamente 2 a 3 primórdios foliares, foram inoculados em placas de Petri de 9,0 cm de diâmetro

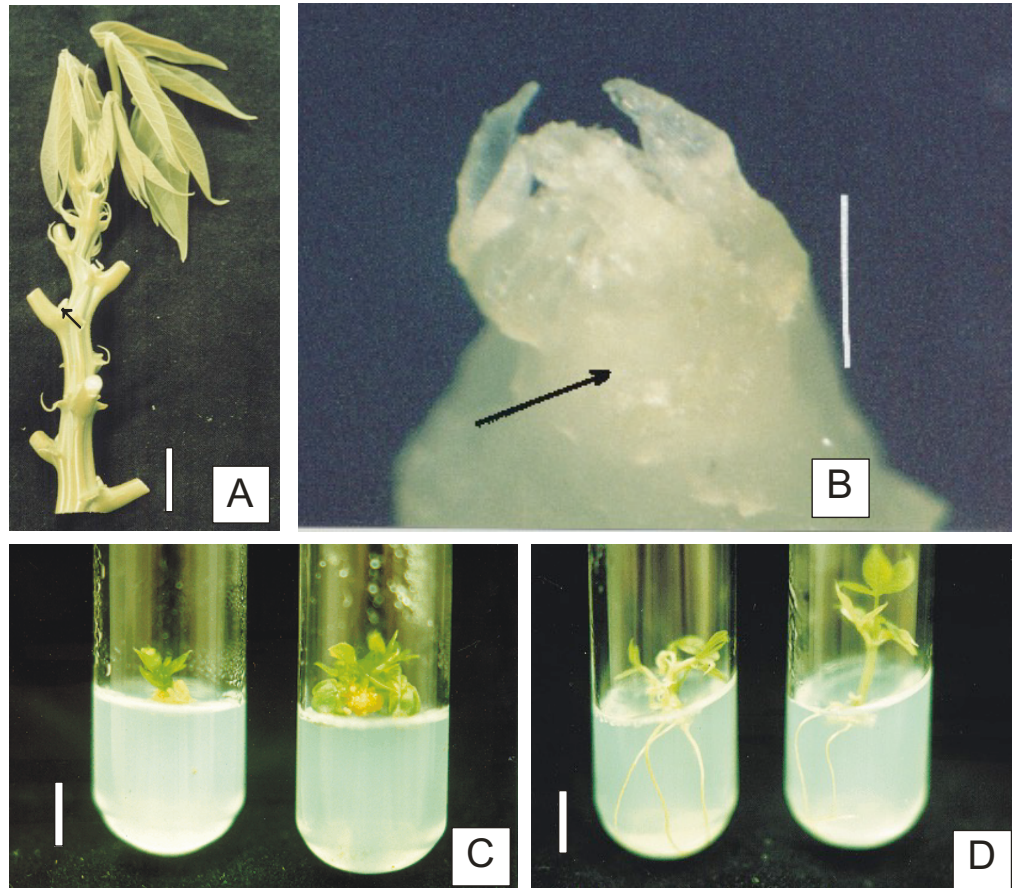


FIGURA 3 – Estabelecimento *in vitro* da cultura de mandioca. (A) Haste caulinar de plantas cultivadas no campo, onde pode-se observar as gemas axilares (→). Barra 1cm. (B) Meristema apical (→) com três primórdios foliares, após dissecação do ápice caulinar. Barra 1mm. (C) Desenvolvimento do meristema apical em meio básico MS após dez dias de incubação. Barra 1cm. (D) Enraizamento após trinta dias de incubação no meio básico.

x 2,0 cm de altura, contendo 25 mL de **meio sólido indutor de embriogênese (MIE)**, ou seja, meio MS completo (sais e vitaminas) suplementado com sacarose (2,0 %), sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 - 2\mu\text{M}$), agargel (0,6 %) e com pH ajustado para 5,8. Diferentes concentrações do regulador de crescimento Picloram (0, 1, 2, 4, 8 e 16 mg/L) foram adicionadas aos meios. Cada concentração diferente de Picloram constituía um tratamento e para cada tratamento foram feitas três repetições (placas) com 30 explantes cada, perfazendo um total de 90 explantes por tratamento. A indução ocorreu na total obscuridade, a uma temperatura de 27 ± 2 °C.

Após 3 semanas de incubação a contagem dos embriões era realizada, através da inspeção de cada placa de Petri, utilizando-se um microscópio estereoscópico (ausJena).

Os agrupamentos de embriões (estádio torpedo) obtidos no meio MIE, eram transferidos para placas de Petri (9,0 cm x 2,0 cm) contendo 25 mL de meio de maturação de embriões (MM). Esse meio consistia do meio MS completo, suplementado com sulfato de cobre (2 μM), sacarose (2,0 %), BAP (0,1 mg/L), solidificado com agargel (0,6 %) e com o pH ajustado para 5,8. O material foi incubado nas mesmas condições de indução, porém, na presença de luz.

4.3. Embriogênese Somática Secundária

Cotilédones verdes, de embriões somáticos primários germinantes, com 3 a 4 semanas de maturação, foram utilizados como fonte de explantes para a obtenção de embriogênese somática secundária (cíclica). Os cotilédones foram seccionados em áreas de aproximadamente 0,25 cm² e os fragmentos transferidos para placas de Petri (9,0 cm x 2,0 cm) contendo MIE. As diferentes concentrações de picloram foram as mesmas utilizadas na embriogênese primária. O material foi incubado nas mesmas condições descritas para a embriogênese primária. Para cada tratamento foram feitas 6 repetições (placas) de 45 explantes cada, perfazendo um total de 270 explantes. Após três

semanas de incubação o número de embriões secundários, presentes nos diferentes tratamentos, foi avaliado.

4.4. Organogênese de Partes Aéreas

Foram utilizados, para a indução de organogênese, cotilédones verdes germinantes, obtidos a partir de embriões somáticos secundários (cíclicos). Os mesmos foram seccionados em áreas de aproximadamente 0,25 cm² e inoculados em placas de Petri (9,0 cm x 2,0 cm) contendo 25 mL do **meio de organogênese de partes aéreas (MO)**, que consistia do meio MS completo, suplementado com sacarose (2,0 %), sulfato de cobre (2,0 µM), solidificado com 0,6 % de agargel e com os reguladores de crescimento AIB e BAP. O experimento foi idealizado para a formação de um fatorial 5 x 5 entre os dois reguladores, com as seguintes concentrações cada um: 0,0; 0,25; 0,5; 1,0 e 3,0 mg/L, perfazendo um total de 25 meios diferentes. Os explantes foram incubados no escuro a 27 ± 2°C. Após 4 semanas, a formação de partes aéreas foi avaliada. Para cada tratamento foram feitas três repetições (placas) com 50 explantes cada.

As partes aéreas foram separadas e inoculadas em placas de Petri contendo meio de alongamento (MA) que consistia do meio MS completo, suplementado com sacarose (2 %), sulfato de cobre (2 µM), 0,4 mg/L de BAP e 0,6 % de agargel. Após uma semana, o material foi transferido para o meio de enraizamento (MS completo, sem regulador de crescimento), suplementado com sacarose (2 %), sulfato de cobre (2 µM) e 0,6 % de agargel.

4.5. Histologia

4.5.1. Embriogênese

Para a análise histológica, fragmentos de cotilédones somáticos com 0, 3, 6, 10 e 15 dias de incubação no MIE foram fixados em uma solução de paraformaldeído 1 % e glutaraldeído 4 % em tampão fosfato 0,1 M por cerca de 24 horas (KARNOVSKY, 1965). Em seguida, para a retirada de resíduos do fixador, os fragmentos foram lavados com tampão fosfato 0,1 M, desidratados em série etílica gradual (álcool 10 % até 100 %) e incluídos em historresina-Leica (glicol metacrilato). Os materiais incluídos foram seccionados transversamente em micrótomo rotatório modelo Leica 2065. As secções com espessura de 3 μm foram distendidas em água e montadas em lâminas. Posteriormente, essas foram coradas com azul de toluidina 0,12 % em bórax 5 % por 15 minutos e fucsina básica 0,05 % por 2 segundos (JUNQUEIRA, 1990). Após as lâminas estarem secas, foram banhadas em xilol puro e montadas em resina sintética (Entellan).

4.5.2. Organogênese

Para o estudo da organogênese, fragmentos de cotilédones com 0, 4, 8 e 13 dias de incubação no MO foram fixados e lavados como descrito para embriogênese, desidratados em série butílica (JOHANSEN, 1940) e incluídos em paraplasto. Os cortes seriados transversais, com 10 μm de espessura, foram corados com safranina e azul de astra (GERLACH, 1969) e lâminas semi-permanentes foram montadas em gelatina glicerinada (JOHANSEN, 1940).

As fotomicrografias foram obtidas em fotomicroscópio Zeiss modelo Jenalumar com a utilização de filme Kodak ultra, asa 400. As escalas foram obtidas através de projeções de lâminas micrométricas nas mesmas condições ópticas utilizadas para as ilustrações.

4.6. Análise estatística

Uma vez que não houve distribuição normal dos valores das variáveis, ou seja, não houve homogeneidade de variância entre os tratamentos, não foi possível avaliar os resultados através de uma análise de variância. Os dados foram analisados através de estudos de dispersão de frequência, utilizando-se tabelas de contingência, o coeficiente de correlação de Pearson (r) e o teste qui-quadrado (χ^2). Foi escolhido o nível de significância (α) de 5,0 %, ou seja, com uma probabilidade de até 5,0 % de se rejeitar H_0 (hipótese da nulidade), quando H_0 é verdadeiro. Assim foi possível verificar se haveria independência ou aderência entre as frequências de uma mesma variável, como também a correlação entre as variáveis, usando o programa SAS (SAS Institute, Inc., 1989) (MIZE *et al.*, 1999; COMPTON & MIZE, 1999).

5. RESULTADOS E **DISCUSSÃO**

5.1. Embriogênese Somática Primária

Os resultados brutos dos experimentos de indução de embriogênese somática primária para as cultivares Tapicínea e Bujá Preta estão apresentados na TABELA 4. Pode-se observar que o regulador de crescimento Picloram foi efetivo na indução de embriogênese em ápices caulinares das 2 cultivares, e que a variação crescente de concentração do regulador, foi acompanhada por um aumento na frequência de indução, como também na produtividade (Nº de embriões/ explante).

As TABELAS 5 e 6, mostram a distribuição de frequência dos resultados dos diferentes tratamentos (níveis de Picloram) para as cultivares Tapicínea e Bujá Preta, respectivamente.

O valor calculado do χ^2 , com um nível de significância de 5%, foi altamente significativo em ambas as cultivares, indicando que realmente existe diferença entre as frequências de indução dos diferentes tratamentos. Porém, esse teste não nos diz entre quais tratamentos há diferença.

A maneira que encontramos de resolver esse problema foi especificar entre quais 2 valores, separadamente, deveríamos testar a aderência (ou não) entre os resultados.

No caso da cultivar Tapicínea o teste do χ^2 foi feito entre os níveis de Picloram 4:8 mg; 8:16 mg; 4:16 mg, apresentando diferença significativa apenas entre 4:16 mg. Daí a indicação do nível 8 mg de Picloram como o mais adequado à indução de ESP nessa cultivar

Para a cultivar Bujá Preta avaliou-se apenas o resultado entre os níveis 8:16 mg de Picloram, cujo resultado foi não significativo, indicando-se, também, o nível 8 mg com o mais apropriado.

TABELA 4 - Efeito do Picloram na indução de embriões somáticos primários a partir de ápices caulinares de plantas das variedades Tapicínea e Bujá Preta, cultivadas *in vitro*.

Picloram (mg/L)	Tapicínea		Bujá Preta	
	Frequência (%)	Nº Emb./Explante	Frequência (%)	Nº Emb./Explante
0	0,0	-	0,0	-
1	0,0	-	6,7	0,6
2	21,5	3,0	16,0	3,0
4	35,8	5,0	26,6	5,0
8	46,3	10,0	60,0	12,0
16	51,7	15,0	70,0	10,0

Avaliação após 21 dias de incubação no meio indutor.

TABELA 5 - Distribuição de frequência dos resultados de indução de embriões somáticos primários em ápices caulinares de plantas da cultivar Tapicínea, cultivadas *in vitro*.

Picloram (mg/L)	Embriogênese		Total	% de Sucesso
	Negativo	Positivo		
0	90	0	90	0,00
1	90	0	90	0,00
2	77	13	90	14,44
4	58	32	90	35,56
8	49	41	90	45,56
16	44	46	90	51,11

$\chi^2 = 125,4947$ (altamente significativo, $P < 0,0001$)

TABELA 6 - Distribuição de freqüência dos resultados de indução de embriões somáticos primários em ápices caulinares de plantas da cultivar Bujá Preta, cultivadas *in vitro*.

Picloram (mg/L)	Embriogênese		Total	% de Sucesso
	Negativo	Positivo		
0	90	0	90	0,00
1	88	2	90	2,22
2	82	8	90	8,89
4	75	15	90	16,67
8	38	52	90	57,78
16	33	57	90	63,33

$\chi^2 = 193,7505$ (altamente significativo, $P < 0,0001$)

Na maioria dos trabalhos sobre a indução de embriogênese somática na mandioca (LI *et al.*, 1998; RAEMAKERS *et al.*, 1993a), o regulador de crescimento mais utilizado com a finalidade de induzir embriões somáticos primários é o 2,4-D. SOFIARI *et al.* (1997), fizeram uma comparação sobre a capacidade das auxinas 2,4-D e ANA de induzirem embriogênese somática primária em lobos foliares de mandioca e concluíram que apenas o 2,4-D era capaz de induzir embriogênese somática primária, muito embora embriogênese somática secundária possa ser induzida tanto por 2,4-D quanto por ANA. Por outro lado, o regulador de crescimento picloram (1-12 mg/L) é uma auxina também usada na indução de embriões somáticos primários, onde a eficácia depende do explante e do genótipo usado (ZHANG *et al.*, 2001).

Ao dados obtidos na TABELA 7 permitem uma comparação com os resultados obtidos por diversos autores.

TABELA 7 – Frequência de indução de embriões somáticos primários

Cultivar	Regulador de crescimento (mg/L)	Frequência (%)	Explante	Citação
Tapicínea	Picloram (16,0)	51,7	Ápice caulinar	BASTOS, tese
Bujá Preta	Picloram (16,0)	70,0	Ápice caulinar	BASTOS, tese
Água morna	Picloram (12,0)	55,5	Ápice caulinar	FEITOSA, *dnp
Rosinha	Picloram (12,0)	80,0	Ápice caulinar	FEITOSA, *dnp
Rosa	Picloram (2,0)	56,6	Ápice caulinar	PONTE, 2002
Amansa-burro	Picloram (16,0)	50,0	Ápice caulinar	PONTE, 2002
Nanzhi 188	2,4-D (10,0)	89,6	Folhas imaturas	MA, 1998
Nanzhi 188	Picloram (4,0)	87,7	Folhas imaturas	MA, 1998
Mcol 22	2,4-D (8,0)	4,8	Folhas imaturas	SOFIARI <i>et al.</i> , 1997
Mcol 22	2,4-D (8,0)	47,0	Folhas imaturas	LI <i>et al.</i> , 1998
Tjurug	2,4-D (1,0)	29,0	Folhas imaturas	RAEMARKER S <i>et al.</i> , 1993a

*Dados não publicados

5.2. Embriogênese Somática Secundária

Os resultados brutos dos experimentos de indução de embriogênese somática secundária para as cultivares Tapicínea e Bujá Preta estão apresentados na TABELA 8. Pode-se observar que o padrão de distribuição dos valores dos resultados foi semelhante à embriogênese primária, porém, com o regulador de crescimento Picloram sendo mais efetivo em concentrações mais baixas, o que está de acordo com literatura (RAEMAKERS *et al.*, 1993a) que afirma haver uma maior competência dos cotilédones somáticos, em relação aos ápices caulinares ou lobos foliares imaturos, para a indução de embriões.

Os dados das TABELAS 9 e 10, mostram a distribuição de freqüência dos resultados diferentes dos diferentes tratamentos (níveis de Picloram).

O valor calculado do χ^2 foi altamente significativo em ambas as cultivares, indicando que há diferença entre as freqüências de indução dos diferentes tratamentos.

Procedeu-se, novamente, mesma maneira como na embriogênese primária e foram estabelecidos os níveis de Picloram entre os quais se deveria fazer a comparação. Para a cultivar Tapicínea foram escolhidos os níveis 2 e 4 mg, cujo resultado foi altamente significativo, recomendando-se o nível 4 mg.

Para a cultivar Bujá Preta foram definidos os níveis 4 e 8 mg, sendo o resultado altamente significativo, também, ou seja, o regulador de crescimento Picloram deve ser adicionado ao meio de indução de embriogênese secundária, no caso da Bujá Preta, numa concentração de 8 mg/L para uma freqüência de indução mais efetiva, diferindo do resultado para a Tapicínea, cujo valor foi metade daquele, indicando um resultado genótipo dependente também, como descrito por vários autores (KONAN *et al.*, 1994; STAMP & HENSHAW, 1986; ZHANG *et al.*, 2001; LI *et al.*, 1998).

TABELA 8 - Efeito do Picloram na indução de embriões somáticos secundários a partir de cotilédones de embriões somáticos primários.

Picloram (mg/L)	Tapicínea		Bujá Preta	
	Freqüência (%)	Nº Emb./Explante	Freqüência (%)	Nº Emb./Explante
0	0,0	-	0,0	-
1	18,7	2,4	16,6	3,7
2	26,8	3,1	20,0	7,0
4	43,2	6,0	32,0	8,0
8	41,3	9,0	50,0	10,1
16	41,3	12,0	28,0	12,0

Avaliação após 21 dias de incubação no meio indutor.

TABELA 9 - Distribuição de freqüência dos resultados de indução de embriões somáticos secundários em cotilédones de embriões somáticos primários da cultivar Tapicínea.

Picloram (mg/L)	Embriogênese		Total	% de Sucesso
	Negativo	Positivo		
0	270	0	270	0,00
1	222	48	270	17,78
2	198	72	270	26,67
4	147	123	270	45,56
8	159	111	270	41,11
16	159	111	270	41,11

$\chi^2 = 203,0871$ (altamente significativo, $P < 0,0001$)

TABELA 10 - Distribuição de freqüência dos resultados de indução de embriões somáticos secundários em cotilédones de embriões somáticos primários da cultivar Bujá Preta.

Picloram (mg/L)	Embriogênese		Total	% de Sucesso
	Negativo	Positivo		
0	270	0	270	0,00
1	207	63	270	23,33
2	192	78	270	28,89
4	183	87	270	32,22
8	132	138	270	51,11
16	216	54	270	20,00

$\chi^2 = 196,3671$ (altamente significativo, $P < 0,0001$)

Estes resultados estão de acordo com os obtidos por RAEMAKERS *et al.*, (1993b), onde observaram que embriões somáticos utilizados como explantes para a indução de novos embriões, produzem mais embriões de que explantes foliares.

A TABELA 11 apresenta uma comparação entre os resultados obtidos na embriogênese somática secundária de algumas cultivares.

A FIGURA 4 mostra os embriões somáticos (tanto primários quanto secundários) em diversos estádios de desenvolvimento e esses mesmos embriões após 20 dias no meio de maturação (MM). Pode-se observar (FIGURA 4E) que a indução de embriões não é sincronizada, ou seja, existem no mesmo explante embriões em diferentes estádios de desenvolvimento, caracterizando o gradiente de absorção do regulador de crescimento, que se forma no explante em função do contato parcial com o meio (RAEMAKERS *et al.*, 1993a e 1993b).

TABELA 11 – Frequência de indução de embriões somáticos secundários.

Cultivar	Regulador de crescimento (mg/L)	Frequência (%)	Explante	Citação
Tapicínea	Picloram (4,0)	43,2	cotilédone	BASTOS, 2003
Bujá Preta	Picloram (8,0)	50,0	cotilédone	BASTOS, 2003
Água morna	Picloram (15,0)	84,9	cotilédone	FEITOSA, *dnp
Rosinha	Picloram (6,0)	78,3	cotilédone	FEITOSA, *dnp
Rosa	Picloram (2,0)	87,0	cotilédone	PONTE, 2002
Amansa-burro	Picloram (8,0)	75,0	cotilédone	PONTE, 2002
Mcol 1505	ANA (10,0)	50,0	cotilédone	TAKAHASHI <i>et al.</i> , 2000
Nanzhi 188	2,4-D (9,0)	89,6	cotilédone	MA, 1998
<i>M. glaziovii</i>	2,4-D (18,0)	85,0	cotilédone	JOSEPH <i>et al.</i> , 2000
Mcol 22	2,4-D (6,0)	83,0	cotilédone	LI <i>et al.</i> , 1998

*Dados não publicados

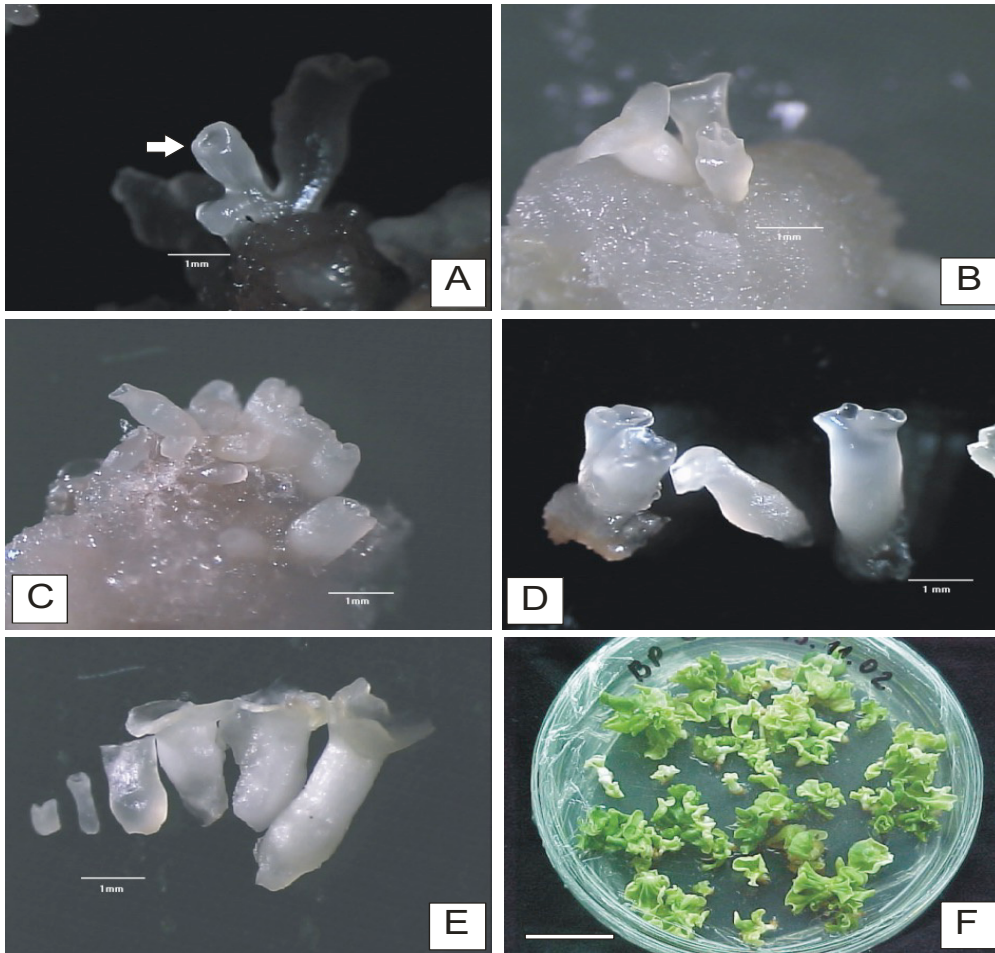


FIGURA 4 – Indução e maturação de embriões somáticos de mandioca, cultivar Bujá Preta. (A) Embriões somáticos primários no estágio de torpedo (→), induzidos a partir de ápices caulinares em meio MS suplementado com Picloram. Barra 1mm. (B) Embriões somáticos secundários em estágio de torpedo e cotiledonar, induzidos a partir de fragmentos de cotilédones somáticos primários. Barra 1mm. (C) Agrupamentos de embriões somáticos secundários, formados diretamente nos explante. Barra 1mm. (D) Observação da estrutura bipolar do embrião. Barra 1mm. (E) obtenção de embriões somáticos em diferentes estádios de desenvolvimento, mostrando ausência de sincronismo na indução direta. Barra 1mm. (F) Embriões somáticos após vinte dias de incubação no meio de maturação. Barra 2cm.

5.3. Organogênese de Partes Aéreas

Os dados das TABELAS 12 e 13 contêm a distribuição de frequência dos resultados das diferentes combinações entre os reguladores de crescimento AIB e BAP. O valor do χ^2 foi altamente significativo, indicando diferenças nos tratamentos.

Pode-se observar no caso da Tapicínea, que as melhores combinações se situavam entre 0,25 mg/L e 1,0 mg/L para ambos os reguladores, fato esse que corresponde ao citado na literatura (LI *et al.*, 1996; ZHANG *et al.*, 2001).

A combinação AIB/BAP (3,0/0,5) apesar de apresentar uma alta frequência, não deve ser utilizada devido à intensa oxidação que provocou no explante, diminuindo a produtividade.

Outro fato que chama a atenção é a indução de partes aéreas nos níveis AIB/BAP (0,0/0,0), embora com pequena frequência.

A TABELA 14 apresenta a correlação entre as diferentes variáveis observadas no experimento de indução de organogênese de partes aéreas para cultivar Tapicínea. Se a probabilidade (valor inferior) for maior que o módulo de r (coeficiente de Pearson), não há correlação.

Da sua análise pode-se deduzir que existe uma altíssima correlação negativa entre frequência de formação de raiz e frequência de formação de calos, ou seja, a formação de calos inibe fortemente a organogênese de raiz. Há também uma inibição na produtividade de partes aéreas, pelo mesmo motivo.

Porém, não houve correlação (nem positiva nem negativa) entre a formação de calos e a frequência de formação de partes aéreas.

ZHANG *et al.* (2001) indicam o uso de nitrato de prata na otimização da frequência de partes aéreas devido a inibição de formação de calos promovida pelo reagente e, com isso, aumentando a frequência de partes aéreas, uma

TABELA 12 - Distribuição de frequência dos resultados de indução de organogênese de partes aéreas em cotilédones de embriões somáticos secundários da cultivar Tapicínea.

AIB / BAP (mg/L)	Organogênese		Total	% de Sucesso
	Positivo	Negativo		
0,00 / 0,00	11	139	150	7,33
0,00 / 0,25	18	132	150	12,00
0,00 / 0,50	21	129	150	14,00
0,00 / 1,00	12	138	150	8,00
0,00 / 3,00	15	135	150	10,00
0,25 / 0,00	4	146	150	2,67
0,25 / 0,25	15	135	150	10,00
0,25 / 0,50	13	137	150	8,67
0,25 / 1,00	13	137	150	8,67
0,25 / 3,00	9	141	150	6,00
0,50 / 0,00	13	137	150	8,67
0,50 / 0,25	30	120	150	20,00
0,50 / 0,50	30	120	150	20,00
0,50 / 1,00	20	130	150	13,33
0,50 / 3,00	12	138	150	8,00
1,00 / 0,00	7	143	150	4,67
1,00 / 0,25	10	140	150	6,67
1,00 / 0,50	34	116	150	22,67
1,00 / 1,00	20	130	150	13,33
1,00 / 3,00	8	142	150	5,33
3,00 / 0,00	27	123	150	18,00
3,00 / 0,25	12	138	150	8,00
3,00 / 0,50	35	115	150	23,33
3,00 / 1,00	20	130	150	13,33
3,00 / 3,00	4	146	150	2,67

$\chi^2 = 128,4465$ (altamente significativo, $P < 0,0001$)

TABELA 13 - Distribuição de frequência dos resultados de indução de organogênese de partes aéreas em cotilédones de embriões somáticos secundários da cultivar Bujá Preta.

AIB / BAP (mg/L)	Organogênese		Total	% de Sucesso
	Positivo	Negativo		
0,00 / 0,00	2	148	150	1,33
0,00 / 0,25	9	141	150	6,00
0,00 / 0,50	18	132	150	12,00
0,00 / 1,00	27	123	150	18,00
0,00 / 3,00	1	149	150	0,67
0,25 / 0,00	3	147	150	2,00
0,25 / 0,25	8	142	150	5,33
0,25 / 0,50	4	146	150	2,67
0,25 / 1,00	1	149	150	0,67
0,25 / 3,00	0	150	150	0,00
0,50 / 0,00	1	149	150	0,67
0,50 / 0,25	2	148	150	1,33
0,50 / 0,50	6	144	150	4,00
0,50 / 1,00	1	149	150	0,67
0,50 / 3,00	3	147	150	2,00
1,00 / 0,00	17	133	150	11,33
1,00 / 0,25	21	129	150	14,00
1,00 / 0,50	4	146	150	2,67
1,00 / 1,00	8	142	150	5,33
1,00 / 3,00	6	144	150	4,00
3,00 / 0,00	28	122	150	18,67
3,00 / 0,25	8	142	150	5,33
3,00 / 0,50	28	122	150	18,67
3,00 / 1,00	27	123	150	18,00
3,00 / 3,00	3	147	150	2,00

$\chi^2 = 256,4078$ (altamente significativo, $P < 0,0001$)

TABELA 14 - Correlação entre as variáveis medidas no experimento de organogênese para a cultivar Tapicínea.

	Frequência PA	*NºPA/ Explante	Frequência de Calos	Diâmetro dos Calos	Frequência de Raiz
Freq. PA	-	0,01264 ¹	-0,07426 ¹	0,02481 ¹	0,13748 ¹
	-	0,9143 ²	0,5266 ²	0,8326 ²	0,2395 ²
Nº PA/Exp	0,01264 ¹		-0,12710 ¹	-0,21642 ¹	0,15039 ¹
	0,9143 ²		0,2772 ²	0,0622 ²	0,1978 ²
Freq. calos	-0,07426 ¹	-0,12710 ¹		0,72753 ¹	-0,69750 ¹
	0,5266 ²	0,2772 ²		<0,0001 ²	<0,0001 ²
Diâm. Calos	0,02481 ¹	-0,21642 ¹	0,72753 ¹		-0,70077 ¹
	0,8326 ²	0,0622 ²	<0,0001 ²		<0,0001 ²
Freq. Raiz	0,13748 ¹	0,15039 ¹	-0,69750 ¹	-0,70077 ¹	
	0,2395 ²	0,1978 ²	<0,0001 ²	<0,0001 ²	

1 – Valor do coeficiente de correlação de Pearson (r). Variação: $-1 \leq r \leq +1$.

2 – Probabilidade (P)

Se $P > |r|$, aceita-se H_0 , ou seja, não há correlação entre as variáveis

Nível de significância (α) 5%.

*PA – Parte aérea

vez que os calos inibem a sua formação. Nos nossos resultados (TABELA 14) não ficou evidenciada essa correlação.

A TABELA 15 mostra as frequências de indução de partes aéreas em diferentes cultivares.

A FIGURA 5 mostra os aspectos gerais da organogênese. Na FIGURA 5C observa-se com bastante clareza o aspecto característico da estrutura que se forma em função da organogênese, que não deve ser confundida com embrião somático, formado eventualmente, como consequência da presença de auxina e citocinina no meio.

A FIGURA 5D mostra as partes aéreas alongadas, após uma semana no meio de alongamento e a FIGURA 5E mostra a estrutura enraizada em meio básico.

A FIGURA 5F mostra a intensa formação de raízes e a ausência de calos no meio AIB x BAP (3,0 x 0,0).

A FIGURA 6 apresenta o fluxograma das etapas envolvidas na regeneração *de novo* de plantas de mandioca cultivadas *in vitro*.

TABELA 15 – Frequência de indução da organogênese de partes aéreas, em diferentes cultivares de mandioca.

Cultivar	Regulador de crescimento (mg/L)	Frequência (%)	Explante	Citação
Tapicínea	AIB/BAP (1,0/0,5)	23,0	cotilédone	BASTOS, tese
Bujá Preta	AIB/BAP (1,0/0,25)	14,0	cotilédone	BASTOS, tese
Água morna	AIB/BAP (0,5/1,0)	11,7	cotilédone	FEITOSA, *dnp
Rosinha	AIB/BAP (0,5/1,0)	22,0	cotilédone	FEITOSA, *dnp
Rosa	AIB/BAP (0,5/1,0)	56,0	cotilédone	PONTE, 2002
Amansa-burro	AIB/BAP (0,5/1,0)	20,0	cotilédone	PONTE, 2002
Mcol 22	AIB/BAP (0,5/1,0)	59,0	cotilédone	LI <i>et al.</i> , 1998
Nanzhi 188	BAP (1,0)	46,4	cotilédone	MA, 1998

*Dados não publicados

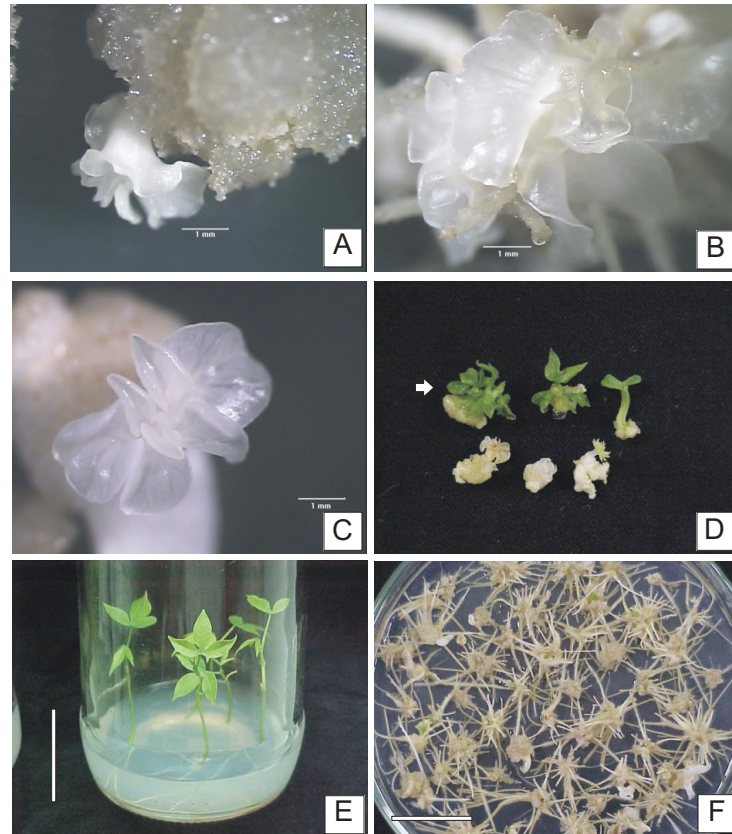


FIGURA 5 – Organogênese de partes aéreas de mandioca – cultivar Tapicínea. (A) Indução após vinte dias de incubação de fragmentos de cotilédones somáticos secundários em meio MS suplementado com AIB e IBA. Barra 1mm. (B) e (C) Aspecto geral do desenvolvimento de estruturas caulinares, com a presença de folhas características, que auxiliam na distinção entre parte aérea e embrião. Barra 1mm. (D) Alongamento de partes aéreas (→) após sete dias de incubação. Barra 1mm. (E) Partes aéreas enraizadas após trinta dias no meio básico MS. Barra 2,5cm. (F) Resultado da incubação de fragmentos de cotilédones somáticos em meio MS suplementado com 3,0 mg/L de AIB, após vinte e um dias. Nota-se a intensa formação de raízes e ausência de calos. Barra 2cm.

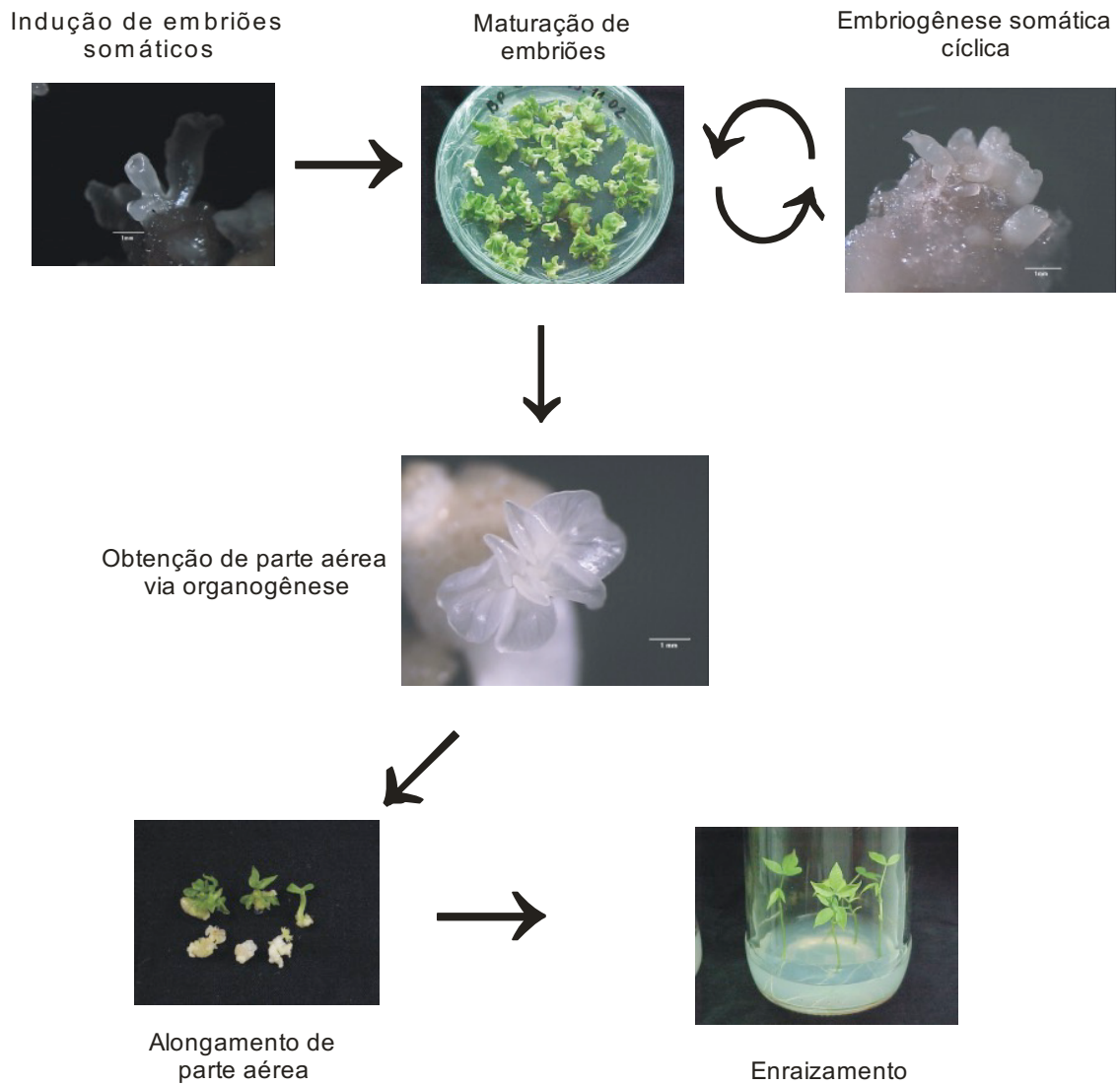


FIGURA 6 – Fluxograma da indução de embriões somáticos e da regeneração de plantas via organogênese de partes aéreas.

5.4. Histologia

A FIGURA 7 mostra os resultados da análise histológica sobre a embriogênese secundária em Bujá Preta. O explante (FIGURA 7A) apresenta um mesofilo com células parenquimáticas ricas em cloroplastos, epidermes bem definidas e algumas regiões com feixes vasculares em formação.

Na FIGURA 7B (explante após 6 dias de incubação) é possível identificar algumas áreas onde se inicia a formação de célula embriogênicas. Essas ocorrem próximas aos feixes vasculares em diferenciação, o que indica ser de origem da bainha de feixe. Essas áreas caracterizam-se pelas células de citoplasma denso e núcleo conspícuo.

De acordo com TSUKAHARA & KOMAMINE (1997) em dicotiledôneas as células embriogênicas se iniciam nas regiões vasculares. Em *Cocos nucifera* L. BUFFARD-MOREL *et al.* (1992) observaram que as formações embriogênicas resultam de divisões mitóticas perivasculares, havendo a diferenciação de uma camada semelhante ao periciclo da raiz. Os resultados obtidos com Bujá Preta corroboram com os obtidos por esses autores.

Aos 10 dias (FIGURA 7C) observa-se a formação de uma faixa central contínua de células isodiamétricas de citoplasma denso e núcleo evidente, vacúolos pequenos e, por vezes, nota-se células em divisão. Essas características são similares àquelas observadas em células meristemáticas. Segundo MICHAUX-FERRIÈRE & SCHWENDIMAN (1992), células embriogênicas lembram células meristemáticas. De acordo com EMONS (1994) essas características são comuns entre espécies estudadas para embriogênese somática.

Em café a formação de embriões inicia-se a partir de células com planos de divisão predominantemente periclinais (QUIROZ-FIGUEROA *et al.* 2002). Em amendoim, em explantes com sete dias, as divisões periclinais também

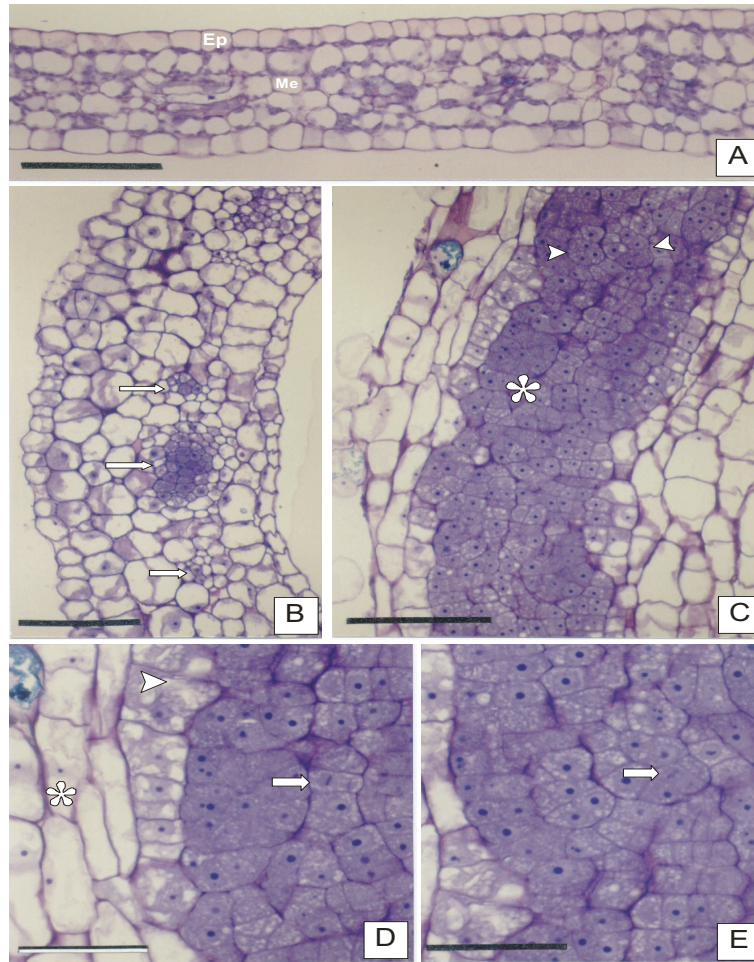


FIGURA 7 – Embriogênese somática secundária em mandioca – cultivar Bujá Preta. (A) Aspecto geral da estrutura interna do explante. Epidermes definidas (ep), mesofilo esponjoso (me) e células ricas em cloroplasto. Barra 60 μ m. (B) Início da formação de células embriogênicas em áreas internas do mesofilo, após seis dias de incubação. Barra 100 μ m. (C) Faixa central de células embriogênicas em divisão, após dez dias (*), mostrando algumas estruturas globulares em início de formação (▶). Barra 250 μ m. (D) Aspecto das células do mesofilo (*), separadas das células embriogênicas por uma camada de células com muitos vacúolos (▶). Nota-se células em divisão periclinal na faixa embriogênica (→). Barra 60 μ m. (E) Detalhe das estruturas globulares indicadas em C. Barra 60 μ m.

foram predominantes, mas a partir do 15º dia ocorreram divisões anticlinais (CHENGALRAYAN *et al.* 2001). Nas FIGURAS 7D E 7E é possível visualizar em detalhe, células em divisão periclinal (anáfase). Algumas estruturas globulares em formação, oriundas de divisões periclinais e anticlinais, se destacam da massa de células embriogênicas. A auxina é entendida como responsável pelas divisões periclinais que culminam com a formação de estruturas embriogênicas.

Circunvizinhas às células embriogênicas ocorre uma camada de células com vacúolos conspícuos e o núcleo evidente, que isola as células embriogênicas daquelas que constituem o parênquima restante do explante.

Em ervilha os embriões somáticos são de origem multicelular e as células que circundam as estruturas embriogênicas contêm amido. Em Bujá Preta, embora não tenha sido realizado o teste para amido, a camada de células circundante das células embriogênicas é facilmente detectada.

A FIGURA 8 apresenta os resultados da análise histológica sobre a organogênese onde é possível observar em 8A o início da diferenciação celular, em camadas sub-epidérmicas. A FIGURA 8B mostra em detalhe essa região onde se pode observar que as células são menores que aquelas do restante do explante e apresentam núcleo (nucléolo) bem evidente, indicando intensa atividade celular.

Aos 8 dias de incubação no meio indutor de organogênese de partes aéreas (FIGURA 8C) é possível observar o aparecimento de protuberância ao nível da epiderme, provavelmente provocado por divisões anticlinais das células sub-epidérmicas.

Estruturas semelhantes a ápices meristemáticos caulinares, com organização túnica-corpo e primórdios foliares podem ser identificadas aos 13 dias de incubação (FIGURA 8D). Note-se a presença de procâmbio que se estende até a parte adulta do explante, indicando uma conexão vascular entre ambas as estruturas, fato que não pode ser observado na embriogênese.

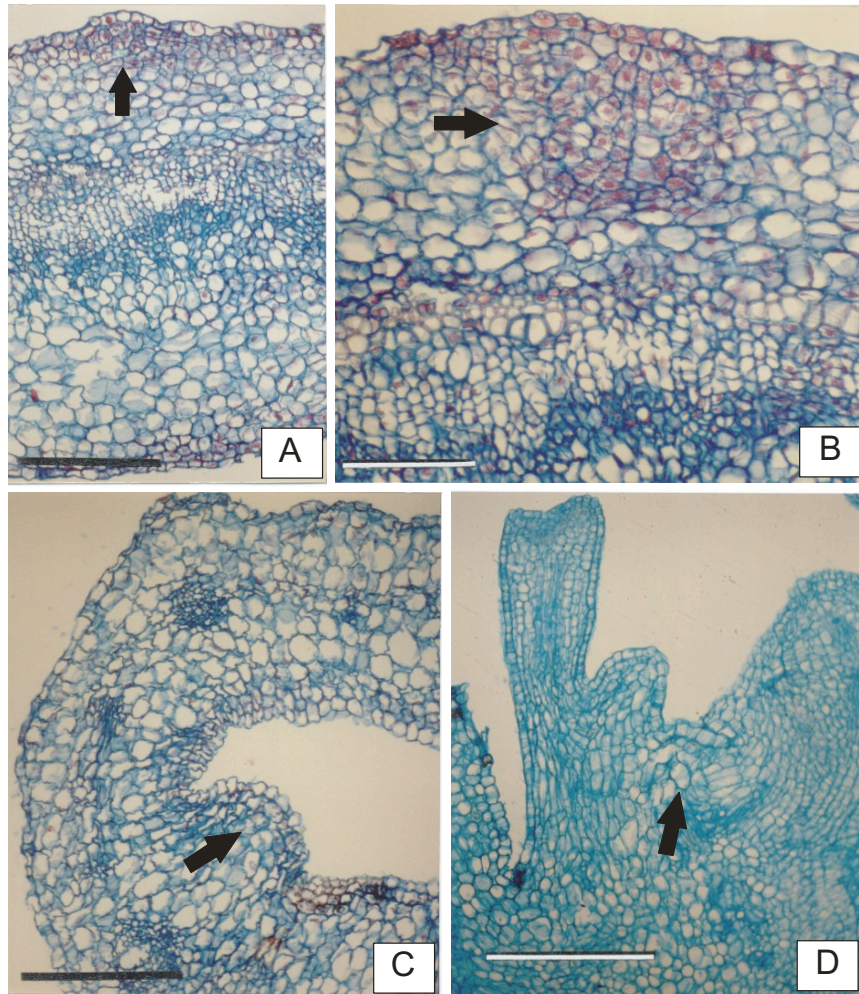


Figura 8 - Organogênese de partes aéreas em mandioca – cultivar Bujá Preta. (A) Aspecto geral da estrutura interna do explante, após 4 dias de incubação no meio indutor mostrando o início da dediferenciação de células da região sub-epidérmica (→). Barra 200 μm . (B) Detalhe da região indicada em A, mostrando células com núcleos bem evidentes. Barra 100 μm . (C) Formação de gema adventícia após 8 dias de incubação. Barra 250 μm . (D) Estruturação da parte aérea, mostrando o ápice com uma organização túnica-corpo característica e primórdios foliares, aos 13 dias de incubação. Barra 250 μm .

LI *et al.* (1998) obtiveram sucesso na regeneração de plantas via organogênese de partes aéreas utilizando como explante, cotilédones de embriões somáticos da cultivar MCol22, após a cultura em meio de organogênese contendo BAP 1 mg/L e IBA 0,5 mg/L durante 20 dias. Após passagem para meio de alongamento (meio MS suplementado com BAP 0,4 mg/L), as partes aéreas regeneradas foram enraizadas em meio livre de reguladores e foram transplantadas para o solo. Esse protocolo foi aplicado com sucesso em outras cultivares.

MA (1998), desenvolveu protocolos de organogênese de partes aéreas, em cotilédones somáticos, para a cultivar Nanzhi 188, utilizando diferentes combinações de citocininas e auxinas, com uma alta frequência de indução sendo obtida com TDZ (4,4 μ M) e ANA (1,1 μ M).

Segundo ZHANG *et al.* (2001), o nitrato de prata inibe a formação de calos, que são os responsáveis pela inibição da organogênese de partes aéreas. Segundo esse autor, um coeficiente de correlação negativo de $-0,82$ foi encontrado entre concentração de nitrato de prata e formação de calos

No caso da cultivar Tapicínea, não encontramos correlação entre formação de calos e indução de partes aéreas, porém uma forte correlação entre formação de calos e formação de raízes.

5.5. Regeneração das Plantas

A TABELA 16 apresenta os resultados do experimento da regeneração de plantas da cultivar Tapicínea após alongamento em meio com diferentes concentrações de BAP.

Os resultados sugerem que a concentração de 0,4 mg/L de BAP foi a melhor para o alongamento e posterior enraizamento das partes aéreas, o que coincide com a literatura (LI *et al.*, 1996; ZHANG *et al.*, 2001)

Na ausência de BAP não há alongamento e as partes aéreas degeneram. Já com um alto nível de BAP (0,8 mg/L) ocorre a oxidação do material vegetal.

TABELA 16 - Regeneração de plantas a partir do desenvolvimento de partes aéreas obtidas via organogênese para a cultivar Tapicínea.

*BAP (mg/L)	Nº PA	**Comprimento PA (cm)	Nº PA Normais	Nº PA com Raiz
0,0	40	0,0	-	
0,2	40	0,8	27	27
0,4	40	1,0	32	32
0,8	40	0,3	20	20

*Meio de alongamento de Partes Aéreas: MS + BAP

PA – Partes Aéreas

** Comprimento médio após 7 dias

Os resultados dos experimentos com a Tapicínea e a Bujá Preta, mostraram um comportamento dessas cultivares, semelhante ao de outras cultivares de mandioca citadas, com ambas se adequando aos protocolos desenvolvidos, porém, como era esperado, com uma forte correlação entre resposta e genótipo.

A análise histológica evidenciou, tanto na embriogênese somática quanto na organogênese, aspectos característicos àqueles mencionados na literatura, com as nossas cultivares apresentando um padrão de desenvolvimento das estruturas observadas, semelhante ao encontrado na maioria das dicotiledôneas.

As plantas regeneradas apresentaram aspecto fenotípico normal, semelhante ao das plantas parentais

6. PERSPECTIVAS

FUTURAS

Pretende-se, a partir deste trabalho, avaliar a influência de outros reguladores de crescimento nos processos de embriogênese somática e organogênese, como, também, desenvolver protocolos de indução de embriogênese somática cíclica em meio líquido.

Segundo RAEMAKERS *et al*, (1993b), a utilização do meio líquido, para a embriogênese somática secundária facilita o isolamento dos embriões, remove mecanicamente os calos que se formam nos explantes além de apresentar uma produção superior e mais sincronizada. Constitui-se, também, num excelente material para os experimentos de transformação genética, que se pretende iniciar com os genótipos estudados.

7. CONCLUSÕES

Este trabalho propiciou o desenvolvimento de protocolos para a regeneração de plantas de mandioca, via organogênese de partes aéreas, utilizando como explante, cotilédones de embriões somáticos mantidos em cultura, cujos protocolos de indução (embriões primários e secundários) haviam sido desenvolvidos inicialmente.

Foi possível observar a diferença marcante entre os padrões de embriogênese e organogênese através da análise histológica. A embriogênese somática, provavelmente é de origem pluricelular, tendo início próximo aos feixes vasculares e a organogênese inicia-se nas camadas sub-epidérmicas.

Sem regulador de crescimento não há embriogênese, porém pode haver organogênese.

O sistema de multiplicação *in vitro* em meio básico foi adequado para a manutenção das culturas, obtendo-se a cada trinta dias 5 ou 6 novas plantas, através da inoculação de ápices e regiões nodais em meio fresco.

Novas pesquisas devem ser desenvolvidas no sentido de otimizar os protocolos através da utilização de novos explantes ou diferentes reguladores de crescimento e adaptar esses protocolos aos sistemas de transformação genética disponíveis para a mandioca, visando o melhoramento da cultura.

8. REFERÊNCIAS

BIBLIOGRÁFICAS

1. ADRIAN, J. and PEYROT, F. Possible use of the cassava leaf (*Manihot utilissima*) in human nutrition. **PI.Fds.Hum.Nutr.**, v. 2, p. 61-65, 1971
2. ANTHONY, P., DAVEY, M. R., POWER, J. B., and LOWE, K. C. An improved protocol for the culture of cassava leaf protoplasts. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 42, p. 299-302, 1995.
3. BHAGWAT, B., VIEIRA, L. G. E., and ERICKSON, L. R. Stimulation of *in vitro* shoot proliferation from nodal explants of cassava by thidiazuron, benzyladenine and gibberelic acid. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 46, p. 1-7, 1996.
4. BUENO, A. Cassava cultivars selected in Reconcavo Baiano. **Comunicado-Tecnico,-Centro-Nacional-de-Pesquisa-de-Mandioca-e-Fruticultura**, n. 7, p. 1-8, 1985.
5. BUFFARD-MOREL, J., VERDEIL, J.-L., and PANNETIER, C. Embryogénese somatique du cocotier (*Cocos nucifera* L.) à partir d'explants foliaires: étude histologique. **Can.J.Bot.**, v. 70, p. 735-741, 1992.
6. CAVALCANTI, J. Perspectivas da mandioca na região semi-árida do Nordeste. **Artigos Embrapa - Coletânea Rumos e Debates**, p. 1-2, 2002. Disponível em: <<http://www.embrapa.br:8080/aplic/rumos.nsf/b1bbbc852ee1057183256800005ca0ab/>>. Acesso em 14 jan. 2003, Embrapa.
7. CHENGALRAYAN, K., HAZRA, S., and GALLO-MEAGHER, M. Histological analysis of somatic embryogenesis and organogenesis induced from mature zygotic embryo-derived leaflets of peanut (*Arachis hypogaea* L.). **Plant Science**, v. 161, p. 415-421, 2001.
8. COCK, J. H. Cassava: A basic energy source in the tropics. **Science**, v. 218, p. 755-762, 1982.

9. COCK, J. H. Cassava production. **Global Workshop on Root and Tuber Crops Propagation**, p. 17-22, 1986. Cali, Colombia, CIAT.
10. COMPTON, M. E. and MIZE, C. W. Statistical considerations for *in vitro* research: I-Birth of an idea to collecting data. **In Vitro Cell, Dev.Biol.-Plant**, v. 35, p. 115-121, 1999.
11. CONNOR, D. J. and COCK, J. H. Response of cassava to water shortage. II. Canopy dynamics. **Field-Crops-Research**, v. 4, p. 285-296, 1979.
12. DANSO, K. and FORD-LLOYD, B. V. Induction of high-frequency somatic embryos in cassava for cryopreservation. **Plant Cell Reports**, v. 21, p. 226-232, 2002.
13. DODEMAN, V. L., DUCREUX, G., and KREIS, M. Zygotic embryogenesis *versus* somatic embryogenesis. **Journal of Experimental Botany**, v. 48 n. 313, p. 1493-1509, 1997.
14. EMONS, A. M. C. Somatic embryogenesis: cell biological aspects. **Acta Bot.Neerl.**, v.43, n.1, p. 1-14, 1994.
15. FAO. Manihot esculenta - Crop plant.-Food for all. Coordenação de Ne Bambi Lutaudio. p. 1-12, 2002. Disponível em: <[http://www.ecoport.org/EP.exe\\$EntFull?ID=1420&Cat=PLCR**](http://www.ecoport.org/EP.exe$EntFull?ID=1420&Cat=PLCR**)>. Acesso em 14 nov. 2002, FAO - Food and Agriculture Organization of The United Nations.
16. GERLACH, G. **Botanische mikrotechnik, ein linurhung**. Stutgard, Georg Thieme, 1969.
17. GONZÁLEZ, A. E., SCHOPKE, C., TAYLOR, N. J., BEACHY, R. N., and FAUQUET, C. Regeneration of transgenic cassava plants (*Manihot esculenta* Crantz) through *Agrobacterium*-mediated transformation of embryogenic suspension cultures. **Plant Cell Reports**, v. 17 n. 11, p. 827-831, 1998.

18. GROLL, J., MYCOCK, D. J., GRAY, V. M., and LAMINSKI, S. Secondary somatic embryogenesis of cassava on picloram supplemented media. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 65, p. 201-210, 2001.
19. GROLL, J., MYCOCK, D. J., and GRAY, V. M. Effect of medium salt concentration on differentiation and maturation of somatic embryos of Cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Annals of Botany**, v. 89, p. 645-648, 2002a.
20. GROLL, J., GRAY, V. M., and MYCOCK, D. J. Development of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) somatic embryos during culture with abscisic acid and activated charcoal. **J.Plant Physiol.**, v. 159, p. 437-443, 2002b.
21. JOHANSEN, D. A. **Plant Microtechnique**. New York, McGraw-Hill Book Company, 1940.
22. JOSEPH, T., YEOH, H. H., and LOH, C. S. Somatic embryogenesis, plant regeneration and cyanogenesis in *Manihot glaziovii* Muell. Arg. (ceara rubber). **Plant Cell Reports**, v. 19, p. 535-538, 2000.
23. JOSEPH, T., YEOH, H. H., and LOH, C. S. Linamarin content and genetic stability of cassava plants derived by somatic embryogenesis. **Euphytica**, v. 120, p. 7-13, 2001.
24. JUNQUEIRA, C. U. O uso de cortes finos de tecidos na Medicina e Biologia. **Meios e Métodos**, v. 66, p. 10-12, 1990.
25. KARNOVSKY, M. J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **J.Cell.Biol**, v. 27, p. 137-138, 1965.
26. KARTHA, K. K. and GAMBORG, L. Elimination of cassava mosaic disease by meristem culture. **Phytopathology**, v. 65, p. 826-828, 1975.

27. KONAN, N. K., SANGWAN, R. S., and SANGWAN-NORREEL, B. S. Micropropagation du manihoc et perspectives d'application a la transformation genetique. Du gene a l'entreprise. **BIOTECHNOLOGIES'92 - RENCONTRES EN PICARDIE**, p. 98-102, 1992. Amiens - France, Biopole Vegetal - Université de Picardie.
28. KONAN, N. K., SANGWAN, R. S., and SANGWAN-NORREEL, B. S. Efficient *in vitro* shoot-regeneration systems in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Plant Breeding**, v. 113, p. 227-236, 1994.
29. KONAN, N. K., SCHOPKE, C., CÁRCAMO, R., and BEACHY, R. N. An efficient mass propagation system for cassava (*Manihot esculenta* Crantz) based on nodal explants and auxillary bud-derived meristems. **Plant Cell Reports**, v. 16, p. 444-449, 1997.
30. LI, H.-Q., SAUTTER, C., POTRYCUS, I., and PUONTI-KAERLAS, J. Genetic transformation of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Nature Biotechnology**, v. 14, p. 736-740, 1996.
31. LI, H.-Q., GUO, J.-Y., HUANG, Y.-W., LIANG, C.-Y., LIU, H.-X., POTRYCUS, I., and PUONTI-KAERLAS, J. Regeneration of cassava plants via shoot organogenesis. **Plant Cell Reports**, v. 17, p. 410-414, 1998.
32. LITZ, R. E. and GRAY, D. J. Organogenesis and somatic embryogenesis. In: Hammerschlag, F. A. and Litz, R. E. **Biotechnology of Perennial Fruit Crops**. Cambridge, University Press, 1992. p. 3-34.
33. LOISEAU, J., MICHAUX-FERRIÈRE, N., and LE DEUNFF, Y. Histology of somatic embryogenesis in pea. **Plant Physiol.Biochem.**, v. 36 n. 9, p. 683-687, 1998.
34. MA, GH. Effects of cytokinins and auxins on cassava shoot organogenesis and somatic embryogenesis from somatic embryo explants. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 54, n. 1, p. 1-7, 1998.

35. MA, GH. and XU, QS. Induction of somatic embryogenesis and adventitious shoots from immature leaves of cassava. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 70, p. 281-288, 2002.
36. MATHEWS, H., SCHOPKE, C., CARCAMO, R., CHAVARRIAGA, P., FAUQUET, C., and BEACHY, R. N. Improvement of somatic embryogenesis and plant recovery in cassava. **Plant Cell Reports**, v. 12, p. 328-333, 1993.
37. MICHAUX-FERRIÈRE, N. and SCHWENDIMAN, J. Histology of somatic embryogenesis. **Reproductive Biology and Plant Breeding**. Berlin, Springer-Verlag, 1992. p. 247-258.
38. MIZE, C. W., KOEHLER, K. J., and COMPTON, M. E. Statistical considerations for *in vitro* research: II - Data to presentation. **In Vitro Cell, Dev.Biol.-Plant**, v. 35, p. 122-126, 1999.
39. MURASHIGE, T. and SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-479, 1962.
40. MUSSIO, I., CHAPUT, M. H., SERRAF, I., DUCREUX, G., and SIHACHAKR, D. Adventitious shoot regeneration from leaf explants of an African clone of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) and analysis of the conformity of regenerated plants. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 53 n. 3, p. 205-211, 1998.
41. NYE, M. M. The mis-measure of manioc (*Manihot esculenta*, Euphorbiaceae). **Economic Botany**, v. 459 n. 1, p. 47-57, 1991.
42. OLIVEIRA, R. P., GOMES, T. S., and VILARINHOS, A. D. Avaliação de um sistema de micropropagação massal de variedades de mandioca. **Pesq.Agropec.Bras.**, v. 35, n.12, p. 2329-2334, 2000.

43. OLSEN, K. M. and SCHAAL, B. A. Evidence on the origin of cassava: Phylogeography of *Manihot esculenta*. **Proc.Natl.Acad.Sci.USA**, v. 96, p. 5586-5591, 1999.
44. PEDROSO, M. C. and PAIS, M. S. Factors controlling somatic embryogenesis. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 43, p. 147-154, 1995.
45. PERES, L. E. P. and KERBAUY, G. B. High cytokinin accumulation following root tip excision changes the endogenous auxin-to-cytokinin ratio during root-to-shoot conversion in *Catasetum fimbriatum* Lindl. (Orchidaceae). **Plant Cell Reports**, v. 18, p. 1002-1006, 1999.
46. PERES, L. E. P., AMAR, S., KERBAUY, G. B., SALATINO, A., ZAFFARI, G. R., and MERCIER, H. Effects of auxin, cytokinin and ethylene treatments on the endogenous ethylene and auxin-to-cytokinin ratio related to direct root tip conversion of *Catasetum fimbriatum* Lindl. (Orchidaceae) into buds. **J.Plant Physiol.**, v. 155, p. 551-555, 1999.
47. PERES, L. E. P. Bases fisiológicas e genéticas da regeneração de plantas *in vitro*. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n. 25, p. 44-48, 2002.
48. PONTE, L. F. A. **Estudos sobre a embriogênese somática em variedades da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) cultivadas no estado do Ceará**. 2002, 57p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2002.
49. PUONTI-KAERLAS, J. Cassava biotechnology. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 15, p. 329-364, 1998.
50. QUIROZ-FIGUEROA, F. R., FUENTES-CERDA, C. F. J., ROJAS-HERRERA, R., and LOYOLA-VARGAS, V. M. Histological studies on the developmental stages and differentiation of two different somatic

- embryogenesis systems of *Coffea arabica*. **Plant Cell Reports**, v. 20, p. 1141-1149, 2002.
51. RAEMAKERS, C. J. J. M., SCHAVEMAKER, C. M., JACOBSEN, E., and VISSER, R. G. F. Improvements of cyclic somatic embryogenesis of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Plant Cell Reports**, v. 12 n. 4, p. 226-229, 1993a.
 52. RAEMAKERS, C. J. J. M., AMATI, M., STARITSKY, G., JACOBSEN, E., and VISSER, R. G. F. Cyclic somatic embryogenesis and plant regeneration in cassava. **Annals of Botany**, v. 71, p. 289-294, 1993b.
 53. RAEMAKERS, C. J. J. M., BESSEMBINDER, J. J. E., STARITSKY, G., JACOBSEN, E., and VISSER, R. G. F. Induction, germination and shoot development of somatic embryos in cassava. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 33, p. 151-156, 1993c.
 54. RAEMAKERS, C. J. J. M., JACOBSEN, E., and VISSER, R. G. F. Secondary somatic embryogenesis and applications in plant breeding. **Euphytica**, v. 81, p. 93-107, 1995.
 55. RAEMAKERS, C. J. J. M., SOFIARI, E., JACOBSEN, E., and VISSER, R. G. F. Regeneration and transformation of cassava. **Euphytica**, v. 96 n. 1, p. 153-161, 1997.
 56. ROCA, W. M. Cassava production and utilization problems and their biotechnological solutions. **Workshop Resource Papers**, p. 215-219, 1990.
 57. SARRIA, R., TORRES, E., ANGEL, F., CHAVARRIAGA, P., and ROCA, W. M. Transgenic plants of cassava (*Manihot esculenta*) with resistance to Basta obtained by *Agrobacterium*- mediated transformation. **Plant Cell Reports**, v. 19, p. 339-344, 2000.

58. SCHOPKE, C., TAYLOR, N. J., CÁRCAMO, R., KONAN, N. K., MARMEY, P., HENSHAW, G. G., BEACHY, R. N., and FAUQUET, C. Regeneration of transgenic cassava plants (*Manihot esculenta* Crantz) from microbombarded embryogenic suspension cultures. **Nature Biotechnology**, v. 14, p. 731-735, 1996.
59. SCHREUDER, M., RAEMAKERS, C. J. J. M., JACOBSEN, E., and VISSER, R. G. F. Efficient production of transgenic plants by *Agrobacterium*-mediated transformation of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Euphytica**, v. 120, p. 35-42, 2001.
60. SHEWRY, P. R., CLOWES, A., TATHAM, A. S., and BEECHING, J. R. Opportunities for manipulating the amount and composition of proteins in cassava tuberous roots. **CBN**, p. 250-254, 1992.
61. SMITH, M. K., BIGGS, B. J., and SCOTT, K. J. In vitro propagation of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 6, p. 221-228, 1986.
62. SOFIARI, E., RAEMAKERS, C. J. J. M., KANJU, E., DANSO, K., LAMMEREN, A. M., JACOBSEN, E., and VISSER, R. G. F. Comparison of NAA and 2,4-D induced somatic embryogenesis in cassava. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 50, p. 45-56, 1997.
63. SOFIARI, E., RAEMAKERS, C. J. J. M., BERGERVOET, J. E. M., JACOBSEN, E., and VISSER, R. G. F. Plant regeneration from protoplasts isolated from friable embryogenic callus of cassava. **Plant Cell Reports**, v. 18, p. 159-165, 1998.
64. STAMP, J. A. and HENSHAW, G. G. Adventitious regeneration in cassava. In: Withers, L. A. and Alderson, P. G. **Plant Tissue Culture and its Agriculture Applications**. London, 1986. p. 149-157.

65. STAMP, J. A. Somatic embryogenesis in cassava: The anatomy and morphology of the regeneration process. **Annals of Botany Company**, p. 451-459, 1987.
66. SZABADOS, L., HOYOS, R., and ROCA, W. M. In vitro somatic embryogenesis and plant regeneration of cassava. **Plant Cell Reports**, v. 6, p. 248-251, 1987.
67. TAKAHASHI, E. K., KOBAYASHI, A. K., and VIEIRA, L. G. E. Induction of cassava somatic embryogenesis in liquid medium associated to floating membrane rafts. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 43, p. 35-39, 2000.
68. TAYLOR, N. J., EDWARDS, M., KIERNAN, R. J., DAVEY, C. D. M., BLAKESLEY, D., and HENSHAW, G. G. Development of friable embryogenic callus and embryogenic suspension culture systems in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Nature Biotechnology**, v. 14, p. 726-730, 1996.
69. TAYLOR, N. J., MASONA, M. V., CARCAMO, R., HO, T., SCHOPKE, C., and FAUQUET, C. Production of embryogenic tissues and regeneration of transgenic plants in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Euphytica**, v. 120, p. 25-34, 2001.
70. THRO, A. M., ROCA, W. M., RESTREPO, J., CABALLERO, H., POATS, S., ESCOBAR, R., MAFLA, G., and HERNANDEZ, C. Can *in vitro* biology have farm-level impact for small-scale cassava farmers in Latin America? **In Vitro Cell, Dev.Biol.-Plant**, v. 35, p. 382-387, 1999.
71. TORRES, A. C., CALDAS, L. S., and BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, Embrapa, 1998.
72. TSUKAHARA, M. and KOMAMINE, A. Separation and analysis of cell types involved in early stages of carrot somatic embryogenesis. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 47, p. 145-151, 1997.

73. WOODWARD, B. and PUONTI-KAERLAS, J. Somatic embryogenesis from floral tissue of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Euphytica**, v. 120, p. 1-6, 2001.
74. ZHANG, P., POTRYCUS, I., and PUONTI-KAERLAS, J. Efficient production of transgenic cassava using negative and positive selection. **Transgenic Research**, v. 9, p. 405-415, 2000.
75. ZHANG, P. and PUONTI-KAERLAS, J. PIG-mediated cassava transformation using positive and negative selection. **Plant Cell Reports**, v. 19, p. 1041-1048, 2000a.
76. ZHANG, P., LEGRIS, G., COULIN, P., and PUONTI-KAERLAS, J. Production of stably transformed cassava plants via particle bombardment. **Plant Cell Reports**, v. 19, p. 939-945, 2000b.
77. ZHANG, P., PHANSIRI, S., and PUONTI-KAERLAS, J. Improvement of cassava shoot organogenesis by the use of silver nitrate *in vitro*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 67, p. 47-54, 2001.
78. ZIMMERMAN, J. L. Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plants. **The Plant Cell**, v. 5, p. 1411-1423, 1993.

9. APÊNDICE

A lenda da mandioca

O morubixaba tinha-se entregue ao descanso conferido aos velhos. A mulher tratava da cozinha, escalava o peixe, enfileirava-o nos emboiras do fumeiro, moqueava a caça e punha-a de reserva na gamela, para que não faltasse alimento nos maus dias de chuva ou de prolongada estiagem.

A filha, de ânimo sossegado, levava e existência singela das outras jovens da tribo. De manhã e de tarde, atravessava a nado o ribeirão, sob os ramos inclinados dos ingazeiros. De volta trazia os frutos e flores, não raro uma cabaça de mel colhido no oco de um pau.

Em casa, tirava as fibras do tucum, fiava e mediante uma agulha feita de taquara, tecia redes para a pesca. Tratava da arara, cumulava-a de blandícias e de coquinhos verde. Confeccionava belas redes de repouso, vistosos cocares de penas para os moços da taba, e quando não tinha mesmo nada que fazer, repetia cantigas de guerra ou de amor que lhe haviam chegado através das gerações.

Nada mais singelo, nem mais puro. No entanto, de um dia para outro sentiu-se grávida. Correu a contar a novidade ao pai, o velho morubixaba. Este não aceitou, absolutamente, a estória que a pobre moça lhe contava, com lágrimas nos grandes olhos pretos, doces como jabuticabas. O velho índio sentiu-se enganado e, por todos os meios ao seu alcance, tratou de investigar quem seria o pai de seu futuro neto.

Quando chegou o dia do parto, num ambiente carregado, apareceu certo homem branco, daqueles que pela austeridade e pelas atitudes, impunham desde logo confiança. Procurou o velho chefe e lhe disse que, realmente, sua filha se tornara mãe em pleno estado de virgindade. Assim a jovem índia e sua filhinha encheram o rancho de alegria.

Mas ao cabo de um ano, sem qualquer doença, a pequena Mani (assim se chamava ela) fechou os olhinhos negros e morreu, sendo enterrada nas proximidades do rancho. E, segundo o costume da tribo, sua sepultura era regada todas as manhãs.

Certo dia porém, para surpresa de todos, brotou naquele local uma planta muito bonita a que a mãezinha saudosa, em lembrança da pequenina Mani, deu o nome de maniva. Desenvolveu-se, deu grossas raízes de leitoso suco. Dela, os índios passaram a tirar o cauim, bebida que antes era fabricada com outros elementos. E a farinha!

A aldeia passou a chamar a planta de Mandioca, em cujo som se encontra Mani, a criança morta, e Oca, a casa do índio, onde a maniveira é aproveitada das folhas às raízes, como símbolo de alegria e abastança.

http://www.ifolclore.com.br/lendas/gerais/g_mandioca.htm

FONTE : (LESSA, Barbosa - Estórias e Lenda do Rio Grande do Sul)

TABELA t1 - indução de organogênese (parte aérea e raiz) e calogênese em cotilédones somáticos de mandioca - cultivar Tapicínea.

AIB / BAP (mg/L)	Freq. *PA (%)	N ° *PA / Explante	Freq. Calos (%)	Ø Calos (mm)	Freq. Raiz (%)
(A) 0,00 / 0,00	7,3	1,9	0,6	0,6	22,6
(B) 0,00 / 0,25	12,0	1,9	38,6	2,5	24,6
(C) 0,00 / 0,50	14,0	3,1	62,6	2,8	23,3
(D) 0,00 / 1,00	12,0	1,3	65,3	4,0	4,0
(E) 0,00 / 3,00	10,0	1,5	63,3	5,3	0,0
(F) 0,25 / 0,00	2,6	3,5	0,0	0,0	88,0
(G) 0,25 / 0,25	10,0	2,4	47,3	4,0	34,0
(H) 0,25 / 0,50	8,6	1,8	77,3	3,8	20,6
(I) 0,25 / 1,00	8,6	2,4	55,3	3,7	6,6
(J) 0,25 / 3,00	6,0	1,5	72,6	3,6	8,6
(K) 0,50 / 0,00	8,6	3,1	0,0	0,0	100,0
(L) 0,50 / 0,25	20,0	2,1	51,3	1,6	42,6
(M) 0,50 / 0,50	20,0	1,7	46,6	3,5	23,3
(N) 0,50 / 1,00	13,3	1,7	67,3	4,1	24,0
(O) 0,50 / 3,00	8,0	1,6	86,0	3,1	4,0
(P) 1,00 / 0,00	4,6	1,2	1,3	0,8	90,0
(Q) 1,00 / 0,25	20,0	1,5	26,6	1,7	66,6
(R) 1,00 / 0,50	22,6	2,0	38,6	2,3	45,3
(S) 1,00 / 1,00	13,3	2,3	48,6	2,2	47,3
(T) 1,00 / 3,00	5,3	2,0	76,0	4,1	2,6
(U) 3,00 / 0,00	18,0	1,3	11,3	2,2	100,0
(V) 3,00 / 0,25	8,0	2,2	67,3	3,1	68,6
(X) 3,00 / 0,50	23,3	2,4	51,3	2,5	51,3
(Y) 3,00 / 1,00	13,3	2,7	75,3	2,8	48,6
(Z) 3,00 / 3,00	2,6	1,5	83,3	3,5	12,0

Avaliação após 4 semanas - 150 explantes / tratamento

*PA – parte aérea

TABELA t2 - Fatorial entre as diferentes concentrações de AIB e BAP para a indução de organogênese em mandioca - cultivar Tapicínea.

AIB \ BAP (mg/L)	0,00	0,25	0,50	1,00	3,00
0,00	A	B	C	D	E
0,25	F	G	H	I	J
0,50	K	L	M	N	O
1,00	P	Q	R	S	T
3,00	U	V	X	Y	Z

Observações:

- ✓ Maior freqüência de formação de Parte Aérea: **L, M, R e X**.
- ✓ Maior freqüência de formação de calos: **H, J, O, T, Y e Z**.
- ✓ Maior diâmetro dos calos: E, J, N, T e Z.
- ✓ Não formam calos: **A, F, K e P**.
- ✓ Maior freqüência de enraizamento: **F, K, P e U**.
- ✓ Meios que não enraizaram: **E**, ou enraízam muito pouco: O e T
- ✓ O meio A formou PA, mesmo sem regulador de crescimento adicionado, sendo a sua freqüência maior que a do meio Z.