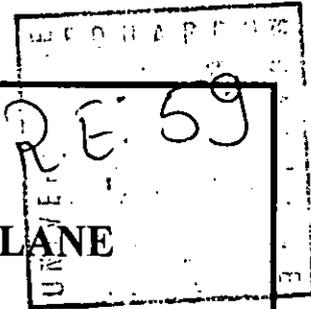


**B10-1200**

1ª versão 30/9



**UNIVERSIDADE EDUARDO MONDLANE**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS**

**DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**TRABALHO DE LICENCIATURA**

Título: Produção de plantas livres de vírus de duas variedades Moçambicanas de Mandioca (*Manihot esculenta* Craz) através da cultura de Meristemas.

Autora: Dirce Osseni Nurmahomed

R.E. 59

**UNIVERSIDADE EDUARDO MONDLANE**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS**  
**DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**TRABALHO DE LICENCIATURA**

**Título: Produção de plantas livres de vírus de duas  
Variedades Moçambicanas de Mandioca (Manihot esculenta  
Cranz) através da Cultura de Meristemas.**

**Supervisor : Doutor Henk Doddema**

**Maputo, 30 de Setembro de 1998**

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar os meus sinceros agradecimentos à todas as pessoas e Instituições que contribuíram para a realização deste trabalho, nomeadamente:

- Ao Doutor Henk Doddema, pelo apoio nas discussões mantidas na procura de melhores soluções, pelas sugestões, assim como por toda a atenção dada na supervisão geral do trabalho.
- Ao projecto DEIBI II (Desenvolvimento de Ensino e Investimento no Departamento de Biologia ) pelo financiamento do trabalho.
- Ao doutor Orlando Quilambo, pela motivação dada para a realização deste trabalho.
- Ao doutor Cornélio Ntumi, por toda a disponibilidade prestada para as análises estatísticas dos resultados.
- Ao doutor Fred de Boer, pelos esclarecimentos dos resultados estatísticos.
- Ao INIA, na pessoa do Senhor Engenheiro Pequenino, por toda ajuda prestada.
- À Estação de Pesquisas do Umbeluzi pela disponibilidade do material vegetal.
- À Faculdade de Agronomia pela permissão do uso da câmara de fluxo laminar e da autoclave.
- Ao laboratório de Fisiologia Vegetal do Departamento de Ciências Biológicas, realçando à ajuda do Senhor Sitoí e da Senhora Helena.
- Ao laboratório de Ecologia do Departamento de Ciências Biológicas
- Ao Senhor Sitoí, pela experiência laboratorial transmitida.
- Ao Senhor Manhiça, Senhora Lucrecia e Senhora Graça da Faculdade de Agronomia.
- À Eunice e a Mariamo.

Dedico este trabalho aos meus Pais ...  
e a minha filha Sarah Melena, com muito amor.

## Resumo

A mandioca constitui a maior fonte de alimentação para cerca de 500 milhões de pessoas em mais de 60 países da África, Sudoeste da Ásia, América Latina e Oceania. Existem muitos constrangimentos na sua produção como por exemplo as doenças, sendo o ataque do vírus (AVMV), um dos mais devastadores das culturas. Por forma a otimizar as culturas, produzindo plantas livres de vírus, a cultura de meristemas, é tida como uma das técnicas mais eficiente. O princípio básico, consiste em cultivar o meristema apical da mandioca, porque nesta zona a planta carrega o vírus a baixas concentrações ou em concentrações quase nulas, no meio de cultura acrescido de hormonas vegetais para desenvolvimento e crescimento do rebento a partir do meristemas.

Neste trabalho meristemas de duas variedades de mandioca (Munhaça local, variedade mais resistente, e Manica 2B uma variedade mais sensível ao vírus), crescem num meio sob diferentes concentrações hormonais, para determinação da melhor concentração hormonal para o crescimento.

Os meristemas crescem melhor à baixas concentrações de Benziladeninapurina (BA). Os meristemas das duas variedades não apresentam diferenças quanto ao crescimento sob diferentes concentrações hormonais.

Uma análise morfológica das folhas dos rebentos obtidos não há sinais de infecção pelo vírus.

## ÍNDICE

Agradecimentos	01
Resumo	03
Introdução	04
Objectivos	10
Material e métodos	11
* Cultura de meristemas	11
* Preparação do material vegetal	11
* Preparação do Stock das soluções	12
* Preparação do tecido esterilizado	15
* Dissecção do tecido esterilizado	16
* Incubação das culturas	17
* Envasamento	19
Análise dos resultados	19
Resultados	20
* Preparação do material vegetal	20
* Iniciação do crescimento	21
* Crescimento dos caules	25
* Crescimento das raízes	26
* Envasamento dos rebentos	29
Discussão	30
* Meristemas	30
* Determinação da melhor concentração para o crescimento	31
* Comparação entre as duas variedades	33
* Crescimento entre 15 e 30 dias	33
* Obtenção de plantas livres de vírus	34
Conclusão	34
Referências bibliograficas	36
Anexos	38

## I. INTRODUÇÃO

A mandioca é originária das Américas e os seus antecessores encontram-se entre as primeiras plantas usadas pelo homem na América Central e do Sul. Da América do Sul, a mandioca expandiu-se rapidamente durante a era pós-colombiana para a África e daqui para o Sudoeste da Ásia e Índia (Sharp *et al*, 1984).

A mandioca é propagada vegetativamente por estacas com cerca de 25 centímetros de comprimento e 2.0 a 3.5 centímetros de diâmetro. As estacas são plantadas de forma diferente em diferentes países: horizontal, inclinada ou vertical e é plantada à profundidades que variam entre 5 a 15 centímetros do solo (Rehm *et al*, 1991).

A mandioca é tradicionalmente cultivada por pequenos farmers sob condições agrícolas em que o clima e o solo tornam difíceis o crescimento de outras plantas sem um "input" de altos custos e constitui uma das maiores fontes básicas de alimentação nas terras baixas tropicais, tornando-se assim, na maior fonte de calorias de quase 500 milhões de pessoas em mais de 60 países da África, Sudoeste da Ásia, América Latina e Oceania (Sharp *et al*, 1984).

A mandioca é uma planta robusta, tolerante a solos pobres e resistentes à seca; mas é sujeita a pestes e doenças que reduzem a produção e os seus tubérculos apodrecem rapidamente após a colheita, limitando a sua comercialização (Orstom, 1997).

Todas as variedades cultivadas de mandioca vêm da espécie Manihot esculenta Cranz, (Manihot utilíssima Pohl) pertencentes à família Euphorbiaceae. As formas selvagens podem ser encontradas nas regiões entre a Amazónia e sul do México. As variedades apresentam diferenças marcantes na forma, no comprimento, diâmetro e cor das raízes e ainda nos conteúdos linamarin (Chen *et al.*, 1990).

Na maioria dos países que produzem mandioca, utilizam-na para consumo humano e são disponíveis nos mercados, frescos ou processados como farinha. Apesar dos seus tubérculos serem deficientes em proteínas, a mandioca é uma fonte valiosa de energia, barata em termos económicos em relação a muitos outros alimentos alternativos. As folhas de mandioca que são uma boa fonte de proteínas e vitaminas são comumente usadas como alimento em África (Sharp *et al.* 1984).

Uma produção de mandioca a baixos custos como fonte de carboidratos foi um potencial alternativo de mercado como substituto de farinha, como fonte de carboidratos nos alimentos concentrados dos animais e como matéria prima na produção de etanol (Sharp *et al.* 1984).

Os constrangimentos na produção de mandioca em África incluem doenças, ervas daninhas, factores agronómicos e sócio-económicos. Esses constrangimentos contribuem para que a produção média em África seja 6.4 toneladas por hectare, abaixo da produção média mundial que é 8.8 toneladas por hectare. Para aumentar a produção, esforços devem ser feitos no sentido de compreender esses constrangimentos por forma a elimina-

los ou contê-los (Road,1990).

Cerca de 30 doenças de mandioca foram bem descritas entre as quais as mais comuns em Moçambique são: Mosaico-africano-da-mandioca, queima-bacteriana e mancha-castanha e entre as pragas, as mais comuns em Moçambique são: Cochonilha-pulverulenta, escama-da-mandioca, ácaro-verde e gafanhoto-elegante. A cultura de mandioca, quer devido ao sistema corrente de implantação, quer devido à forma como se desenvolve, é bastante sensível à ocorrência das ervas daninhas durante os 3 a 4 meses, e enquanto a folhagem não recobre o solo (Segerem, *et al*, 1994).

Em muitas espécies pereniais propagadas assexuadamente os vírus são transmitidos vegetativamente (Chen *et al*, 1990). Muitos vírus continuam a ser descobertos causando vários danos nas plantas. African Cassava Mosaic Virus (ACMV), foi primeiro reportado no Este da África em 1894 e é uma doença muito difundida na Africa tropical e Índia . Apesar de já em 1906 ter sido postulado que o organismo casual era um vírus só em 1983 é que foi feita a confirmação etiológica do mosaico da mandioca (Road, 1990).

O ACMV é um geminivírus (partículas virais pareadas ou bandeadas) com uma média de 20 x 30 nanómetros. É transmitido de uma planta de mandioca para outra por meio de um insecto, *Bemissa tabaci*. pode também ser difundida de uma região para outra através do uso de material infectado (Road, 1990).

Muito recentemente a 30 de Agosto de 1997, foi reportado que duas espécies de vírus que atacavam mandiocas, juntaram-se para formar um novo vírus mais virulento. As duas espécies são distintas, são transmitidas através de insectos e são encontradas na África: Vírus do Mosaico da mandioca da África Ocidental e Vírus do mosaico da mandioca do Este da Africa (McGrath,1997).

Diferente dos fungos e doenças bacterias, as doenças virais não podem ser prevenidas e controladas por bactericidas ou fungicidas químicos. Embora existam investigações para inibidores de vírus a replicação e multiplicação do vírus é fechada e associada ao metabolismo da planta e os inibidores virais conhecidos são tóxicos para as plantas. Os pesticidas podem matar o insecto transmissor reduzindo a propagação viral, porém, alguns vírus são disseminados mecanicamente e estes não podem ser eliminados através de insecticidas. Além disso, as plantas não possuem um sistema geral imune (Chen *et al*, 1990).

A termoterapia foi usada durante muito tempo para obter plantas livres de vírus de diversas espécies de plantas. O princípio básico é submeter a planta a temperaturas mais elevadas do que o normal, tornando o vírus inactivo (Bhojwani *et al*. 1983).

Um outro método eficaz para erradicação do vírus é através da cultura de tecidos. A cultura de tecidos tem uma longa história iniciando com os trabalhos de Gottlieb Haberlandt entre outros nos finais do século XIX mas, os conceitos e técnicas associadas e a utilidade das suas aplicações

não foram ainda totalmente alcançadas. A aplicação da técnica abriu uma nova luz nos aspectos fundamentais da diferenciação e desenvolvimento das plantas abrindo os caminhos para identificação de estratégias para manipulação genética das plantas ( Lindsay, 1991).

Monel e Martim (1952), citado por (Walkey,1991), desenvolveram a técnica de cultura de meristemas para erradicação *in vitro* do vírus.

A cultura de meristemas é eficiente devido a diferenças na distribuição do vírus pela planta. A concentração do vírus é alta em tecidos e órgãos maduros e é baixa em tecidos e órgãos imaturos, isto porque a infecção provocada pelo vírus move-se devagar, enquanto que células meristemáticas multiplicam-se rapidamente (Chen *et al*, 1990).

✎ Embora a cultura de meristemas seja usada para eliminação do vírus, ela é também usada para obtenção de plantas livres de outros patógenos incluindo micoplasmas, bactérias e fungos (Bhojwani *et al*. 1983).

Quando a planta livre de vírus é obtida é importante prevenir a re-infecção e existem uma quantidade de métodos usados. Um deles é a esterilização do solo. Em áreas de plantações de pequena escala os novos rebentos demoram mais tempo a serem reinfectadas e em áreas de plantações de larga escala e plantações repetidas as plantas podem ser reinfectadas rapidamente. Se a planta for reinfectada novamente ela deve ser substituída por uma planta livre de vírus (Chen *et al*, 1990).

Sintomas de doenças de mosaico da mandioca incluem características de um verde luminoso com parte amarelas ou brancas distribuídas irregularmente. As áreas cloróticas podem ser pequenas manchas ou podem cobrir a folha inteira da mandioca. As manchas são acompanhadas às vezes pela deformação da folha e a planta fica impedida de desenvolver. Nas plantas de mandioca cujo crescimento foi impedido, as folhas doentes são pequenas e se desenvolvem assimetricamente (Road,1990)

Em Moçambique, segundo dados do INIA de 1996/1997, são mantidos no centro de pesquisa de Umbelúzi na província de Maputo 29 diferentes variedades de mandioca. Algumas variedades são locais e outras foram introduzidas a partir de outros países mas cultivados como clones locais.

Das duas variedades em estudo, a Munhaça local, é originária da província de Inhambane e a Manica 2B, é originária da província de Manica (INIA,1996/1997).

Segundo a classificação do IITA, a munhaça local, é classificada como uma variedade resistente ao vírus do mosaico da mandioca apresentando 1.8 quanto à presença do vírus na planta, numa escala crescente de 1 - 5, e a manica 2B pela mesma classificação apresenta 4.0, sendo considerada uma variedade muito sensível ao vírus (INIA, 1996/1997).

A erradicação do vírus e outros patógenos é importante para otimizar as culturas (Bhojwani et al. 1983).

## II. OBJECTIVOS

### 1. Objectivo geral

- Através da cultura de meristemas obter uma variedade moçambicana de mandioca (*Manihot esculenta* Cranz) que normalmente, em condições de propagação vegetativa, é afectada pelo *Cassava Mosaic Virus Disease* (CMVD), livre deste vírus.

### 2. Objectivo específico

Comparar o crescimento dos meristemas sob diferentes concentrações de auxinas e citoquininas de duas variedades moçambicanas de mandioca: Munhaça Local uma variedade resistente ao vírus e Manica 2B, uma variedade mais sensível ao vírus do mosaico da mandioca africana.

## III. MATERIAL E MÉTODOS

Usaram-se duas variedades de mandioqueiras moçambicanas : Munhaça local, uma variedade resistente ao vírus e Manica 2B, uma variedade atacada pelo vírus do mosaico da mandioca africana (ACM).

### A cultura de meristemas " in vitro " envolveu :

- A. Preparação do material vegetal
- B. Preparação do "stock" de soluções
- C. Preparação do tecido esterilizado

D. Dissecção do rebento e isolamento do explant

E. Incubação da cultura

F. Envazamento dos rebentos

#### **A. Preparação do material vegetal**

No centro de pesquisas da estação de Umbeluzi da província de Maputo, mas concretamente no banco de germoplasma de mandioca, na segunda semana do mês de Fevereiro de 1997, foram identificadas as variedades em estudo e a partir delas, obtiveram-se as estacas que mediam entre 10 a 15 centímetros de comprimento. As estacas de Munhaça local tinham um diâmetro de 4 centímetros e as de Manica 2B mediam de diâmetro 1,5 centímetros. A colheita das estacas foi feita pela manhã.

As estacas foram desinfectadas por um fungicida-insecticida, vendido comercialmente com o nome de Mancozeb (é uma combinação de fungicidas para o controlo de várias doenças nas culturas de batata reno e tomate), e secadas ao ar livre por duas horas. Depois, selou-se a parte superior da estaca com parafina derretida para evitar a contaminação por insectos e microrganismos. Finalmente as estacas foram plantadas em vasos com 5 Kg de solo e colocados na estufa onde a temperatura variava entre 25-30° C. Os vasos foram irrigados imediatamente após o plantio e durante os dois dias seguintes com uma solução de nutrientes (solução de Knop). Foram irrigados com 1,5 litros de solução diluída 10 vezes em cada vaso e em cada rega.

Plantou-se uma estaca em cada vaso para um total de 20 vasos sendo 10

vasos para cada variedade de mandioqueira.

**B. Foram preparadas todas as soluções necessárias em "stock", nomeadamente:**

1. Preparação do "stock" de solução de fertilizantes ( solução de Knop )
2. Preparação da água
3. Preparação do "stock" de soluções de hormonas .
4. Meio de cultura

**1. Preparação do stock de solução de nutrientes ( solução de Knop )**

Em 1 litro de água foram dissolvidos num agitador :

10 gramas de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$

2.5 gramas de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

2.5 gramas de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

2.5 gramas de  $\text{KNO}_3$

0.05 gramas de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

A solução foi armazenada à 26 graus centígrados num lugar escuro.

**2. Preparação da água**

Toda água usada para preparação do stock das soluções de hormonas e para preparação dos meios de cultura foi destilada para desmineralização e depois foi esterilizada numa autoclave a uma temperatura de 120°C durante 20 minutos.

**3. Preparação do "stock" de soluções hormonais**

Foram usadas as seguintes hormonas:

Auxina : - Ácido naphthaleneacético ( NAA )

Citoquininas : - Benziladeninapurina (BAP)

Giberilinas : - Ácido giberilínico ( GA )

- Foram dissolvidas 25 mg do ácido naphthaleneacético (NAA) em 5ml de etanol fazendo um volume total de 25 ml com água destilada estéril. O pH foi ajustado para 5 com as soluções de ácido e base: NaOH a 1 molar e KCL a 1 normal previamente preparadas ( Lindsey,1991 ).

- Foram dissolvidos 25 mg de benziladeninapurina (BA) em 5 ml de HCL a 0.5 N fazendo um volume total com água destilada estéril de 25 ml. O pH foi ajustado para 5 com as soluções de ácido e base: NaOH a 1 molar e KCL a 1 normal previamente preparadas ( Lindsey,1991 ).

- Foram dissolvidos 25 mg de ácido giberilínico em 5ml KOH a 0.2 M, fazendo um volume total de 25 ml com água destilada estéril. O pH foi ajustado para 5 com as soluções de ácido e base: NaOH a 1 molar e KCL a 1 normal previamente preparadas ( Lindsey,1991 ).

#### 4. Preparação do meio de cultura

Foi usado o meio Murashige-Skoog (MS), (1962), (tabela 6 em anexo) que segundo Lindsen (1991), é o meio frequentemente usado em culturas de tecidos. O meio contém elementos inorgânicos requeridos para qualquer crescimento vegetal e contém também sacarose como fonte de energia, vitaminas, reguladores de crescimento e quaisquer outros suplementos orgânicos.

De uma aquisição comercial do meio MS em pó com todos os elementos padrão da sua composição excepto o açúcar e hormonas de crescimento foram dissolvidos 4,708 gramas do pó em 1 litro de água destilada e esterilizada. O recipiente foi colocado num agitador eléctrico para misturar o conteúdo a uma temperatura de 100°C.

Foram adicionadas ao meio 0,058 molares de sacarose e 6 gramas de agar-agar para gelificar o meio continuando sempre a agitar no agitador a mesma temperatura. O agar-agar usado foi agar-agar purificado e livre de inibidores comercializado com o nome de Merck. O PH do meio foi ajustado para 5.8 segundo Dodds (1995), com uma solução de ácido (HCL a 1 Molar) e uma solução base (NAOH a 1 Molar).

Depois de o meio estar completamente dissolvido foram adicionadas as hormonas ( auxinas, citoquininas e giberilinas ) formando 16 diferentes combinações hormonais de NAA e BA (tabela 1), e GA a 0.1  $\mu$ M, distribuídos em 16 frascos de vidro devidamente marcados.

Os 16 frascos foram levados a autoclavar a uma temperatura de 120 °C durante 20 minutos. Depois de autoclavados os frascos foram levados para uma câmara de fluxo laminar. Distribuíram-se os meios estéreis em placa de Petri estéreis tendo em conta as diferentes concentrações hormonais. As placas de petri foram devidamente marcadas com um marcador. Depois de arrefecidas as placas de Petri contendo o meio de cultura foram seladas com parafilme e armazenadas num refrigerador a temperaturas abaixo de 4 graus centígrados.

### **C. Preparação do tecido esterilizado**

Deixaram-se as estacas nos vasos durante quatro semanas até os rebentos terem crescido suficientemente para se remover a parte terminal juntamente com uma secção do caule. Para evitar contaminantes provenientes da parte externa do broto procedeu-se a uma desinfectação através de uma lavagem durante 10 minutos em hipoclorito de sódio a 3% a que se misturou 2 gotas de detergente de louça, seguida de uma lavagem rápida de 2 minutos em etanol a 70% e novamente uma lavagem durante 10 minutos em hipoclorito de sódio a 3% a que se misturou 2 gotas de detergente de louça, e finalmente lavou-se o rebento sob condições de esterilização 4 vezes com água destilada e esterilizada.

### **D. Dissecção do rebento e isolamento do explant**

- Para evitar-se a contaminação durante o trabalho todos os instrumentos laboratoriais (pinças, bisturis e agulhas), foram mantidos assépticos por imersão em álcool a 70% e rápido flamenjamento numa lamparina de álcool.

Com um par de pinças, suportou-se o broto desinfectado. A uma ampliação de 2 vezes na lupa desinfectada com álcool a 70% e removeram-se os apêndices externos (folhas e estípulas) do broto usando um bisturi. Quando as estruturas internas do broto ficaram visíveis a ponta do rebento foi cortada.

A folha primordial interna foi dissecada e removida ficando visível o meristema acompanhado de uma ou duas folhas jovens primordiais

medindo entre 0.6-1.0 milímetros que foi então removido através de uma agulha.

O meristema medindo entre 0.6-1.0 milímetros, ainda ligado à ponta da agulha foi então colocado na placa de petri contendo o meio de cultura. Em cada placa foram colocados 4 meristemas de cada variedade em cada uma das 16 combinações hormonais de NAA e BA para iniciação do crescimento, perfazendo um total de 64 meristemas para cada variedade.

#### **E. Incubação da cultura**

A fase de incubação envolveu 2 estágios :

##### **Estágio 1 : - Iniciação do crescimento**

Um rebento com 1-2 cm de comprimento com uma pequena base do callus sem raízes desenvolveu-se do meristema no meio de cultura para iniciação dos rebentos. O meio de cultura base era o MS, ao qual adicionaram-se as hormonas NAA, BA e GA, a diferentes concentrações, variando a concentração de NAA e BA segundo a tabela 1 mantendo fixa a concentração de GA a 0.1  $\mu$ M. Foi adicionado a este meio 0.058 Molares de sacarose e 6 gramas de agar-agar. As placas contendo os meristemas para iniciação dos rebentos foram incubadas à uma temperatura de 25-26 graus centígrados e expostas à luz durante 16 horas diariamente. O tempo para este estágio foi aproximadamente 4 semanas.

Tabela 1: As concentrações de auxina (NAA) e citoquininas (BA) e as várias combinações para a iniciação dos rebentos a partir dos meristemas das mandioqueiras.

BA/NAA	0.05 $\mu$ M	0.1 $\mu$ M	0.2 $\mu$ M	0.3 $\mu$ M
0.05 $\mu$ M	conc1	conc2	conc3	conc4
0.1 $\mu$ M	conc5	conc6	conc7	conc8
0.5 $\mu$ M	conc9	conc10	conc11	conc12
1.0 $\mu$ M	conc13	conc14	conc15	conc16

### **Estágio 2 : - Crescimento e enraizamento**

Os rebentos que se desenvolveram durante o estágio 1 foram removidos e plantados em tubos de culturas que foram previamente esterilizados envolvidos em papel de alumínio numa autoclave à 120 graus durante 20 minutos com meio de enraizamento onde o rebento com uma base do callus pode desenvolver raízes. O meio de cultura para este estágio foi o MS ao qual se adicionou uma única hormona a auxina NAA a uma concentração de 0.5  $\mu$ M, 0.058 molares de sacarose e 8 gramas de agar-agar.

Os tubos contendo os meios de cultura foram incubados nas mesmas condições observadas no estágio 1.

### **F. Envazamento**

Moveu-se o tubo de cultura contendo as culturas para um banco limpo mas não estéril, do laboratório. Destaparam-se os tubos e removeram-se as plântulas com a ajuda de uma pinça. Reteve-se a plântula numa mão para molharem-se as raízes com água limpa corrente.

Usando um substrato compreendido de uma parte de solo e 3 partes de vermiculite, colocaram-se as raízes mais uma base do callus do rebento num buraco feito no centro do substrato. Depois firmou-se o substrato à volta da planta. Usou-se um vaso de plástico de 500 mililitros e cobriu-se com um saco de plástico transparente para evitar a evaporação.

Colocaram-se os vasos numa bandeja com água permitindo assim um ambiente húmido. Finalmente, regou-se com 5 mililitros da solução de nutrientes (solução de Knop).

#### Análise dos resultados

Para comparação do crescimento entre as duas variedades foi medido o comprimento dos rebentos, dos caules e das raízes. Segundo Noggle e Fritz (1983), o crescimento é geralmente igual a um aumento de tamanho e pode ser avaliado pela medição da massa, comprimento ou peso, superfície da área ou volume.

Foram feitos testes estatísticos segundo ANOVA para determinação dos desvios padrões e variância.

Para análise da ausência do vírus nos rebentos obtidos foram feitas observações morfológicas das folhas dos rebentos das mandioqueiras.

## **IV. RESULTADOS**

### **1. Preparação do material vegetal**

Foi observado no banco de germoplasma de Umbeluzi, que a variedade Manica 2B não atingia mais do que 30 - 40 centímetros de comprimento, apresentando sinais visíveis de contaminação pelo vírus (ACM) : folhas cloróticas e pouco desenvolvidas. As estacas obtidas eram finas e pouco desenvolvidas comparativamente com as da variedade Munhaça local que apresentavam um desenvolvimento normal de cerca de 100 - 150 centímetros de comprimento.

Nos vasos onde as estacas foram plantadas, a variedade Manica 2B não se desenvolveu muito, e os rebentos apresentavam também sinais de infecção pelo vírus (ACM ), principalmente nas folhas que se apresentavam pouco desenvolvidas.

As duas variedades crescendo na estufa sofreram acção de pragas como a cochonilha pulverenta, provocando a morte de alguns rebentos.

### **2. Iniciação do crescimento**

O melhor crescimento verificou-se à concentrações baixas de BA (0.05 $\mu$ M) e a concentrações altas de BA (1.0 $\mu$ M), do que em valores intermediários (gráfico 1 e 2).

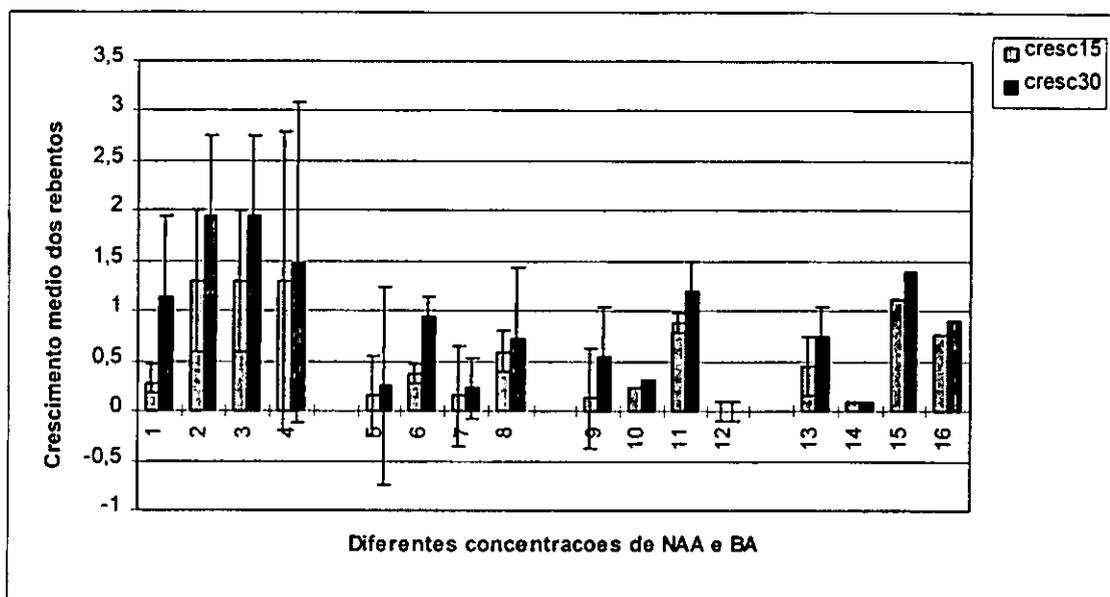


Gráfico 1: Crescimento médio dos rebentos da variedade Munhaça local após 15 e 30 de inoculação dos meristemas no meio de iniciação.

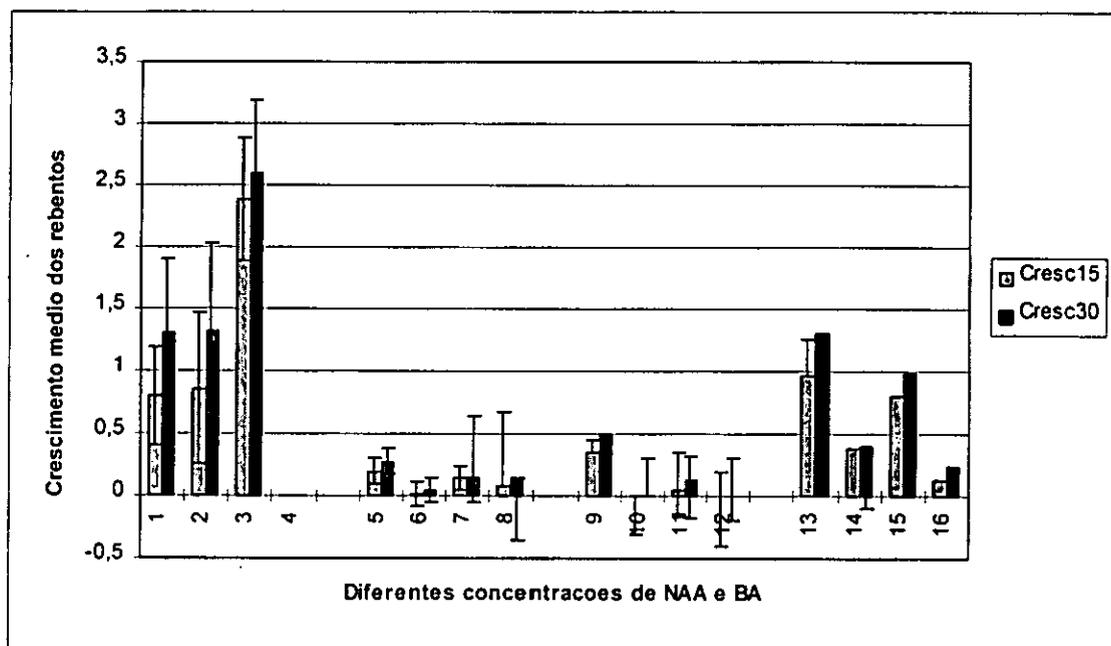


Gráfico 2 : Crescimento médio dos rebentos da variedade Manica 2B após 15 e 30 dias de inoculação dos meristemas no meio de iniciação.

As duas variedades não apresentaram diferenças significativas durante a iniciação de crescimento nas diferentes concentrações de NAA e BA,

apresentando padrões de crescimento semelhantes: Maiores crescimentos à baixas e altas concentrações de BA, do que em valores intermédios (gráfico 3 e 4).

Variedade1 - Munhaça local

Variedade2 - Manica 2B

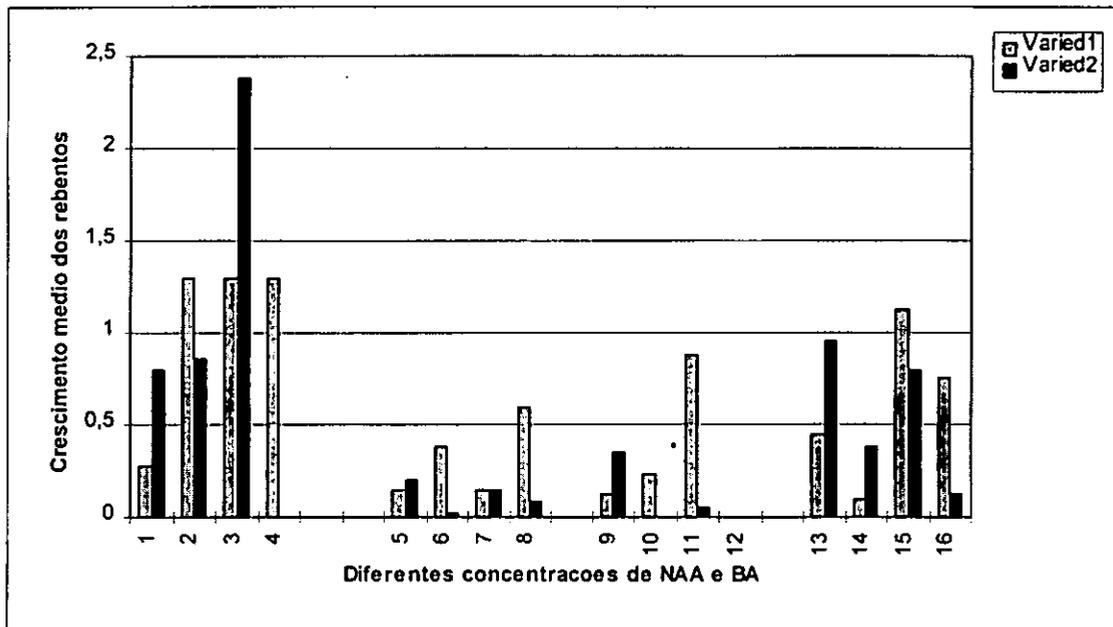
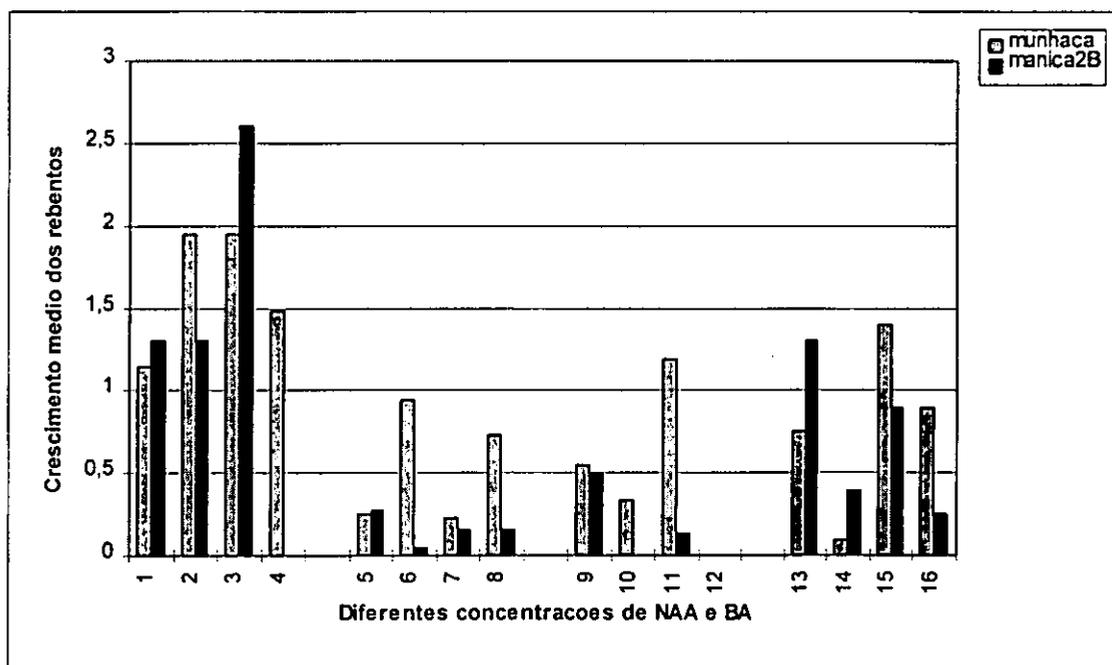


Gráfico 3: Comparação dos crescimento médios dos rebentos das duas variedades (Munhaça local e Manica 2B) após 15 dias de inoculação do meristema no meio de iniciação.



**Gráfico 4:** Comparação do crescimento médio dos rebentos das duas variedades (Munhaca local e Manica 2B) após 30 dias de inoculação do meristema no meio de iniciação.

As duas variedades crescem rapidamente em 15 dias e o aumento de crescimento em 30 dias é relativamente mais lento e pouco acentuado.

### 3. Crescimento dos caules

O mesmo padrão de crescimento foi observado no desenvolvimento dos caules dos rebentos. Verificou-se maior crescimento dos caules nos rebentos que iniciaram o crescimento à baixas concentrações de BA ( 0.05  $\mu\text{M}$ ) e à concentrações altas de BA (1.0  $\mu\text{M}$ ) do que em valores intermediários, quando foram transferidos para um meio de crescimento e enraizamento em que a única hormona adicionada foi a NAA à 0.5  $\mu\text{M}$  (gráfico 5 e 6).

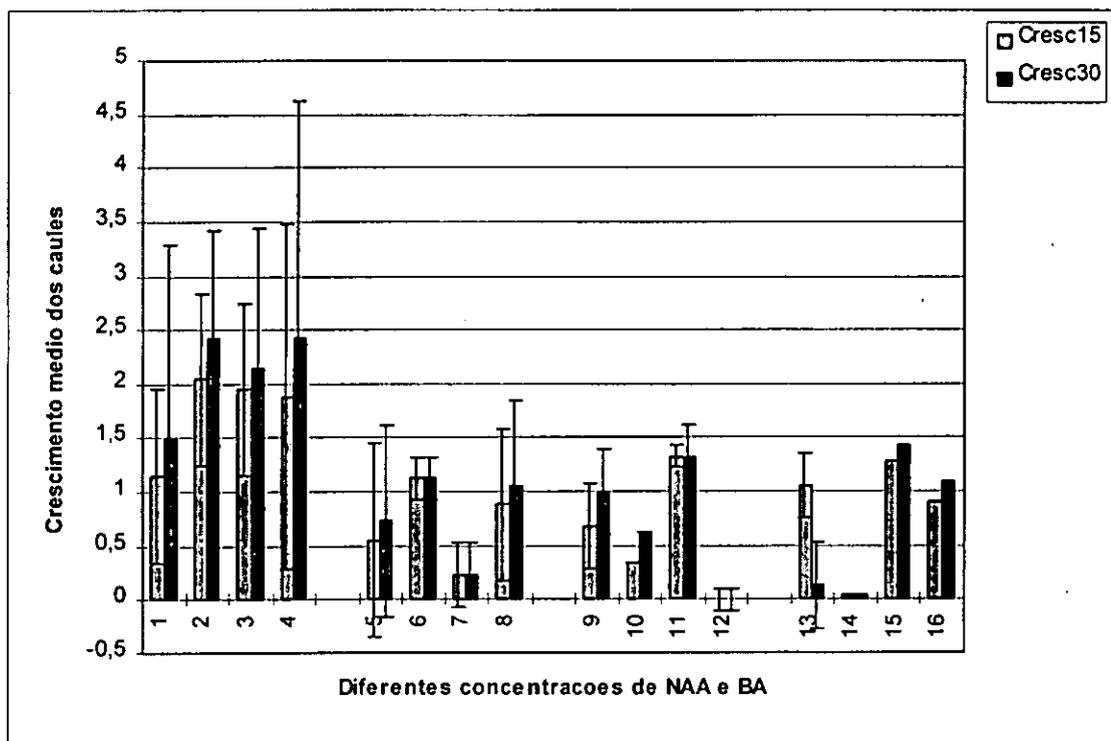


Gráfico 5: Crescimento médio dos caules dos rebentos da variedades Munhaça local após 15 e 30 dias no meio de crescimento e enraizamento.

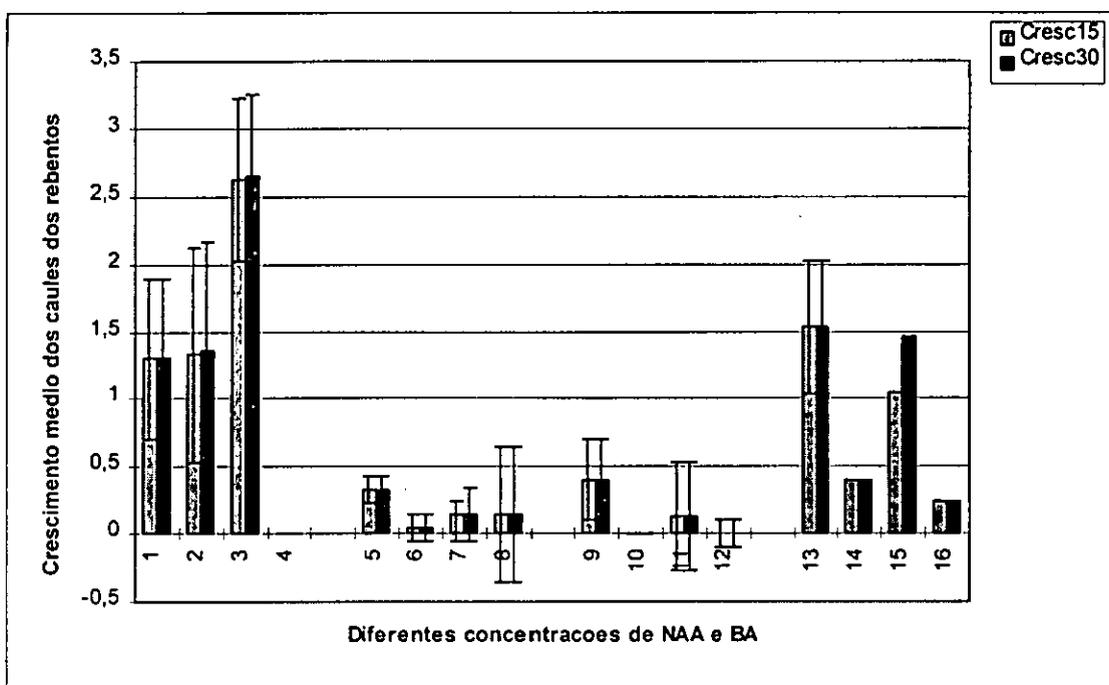


Gráfico 6: Crescimento médio dos caules dos rebentos da variedade Manica 2B após 15 e 30 dias no meio de crescimento e enraizamento.

Não há diferenças significativas no crescimento em 15 dias e crescimento em 30 dias dos caules no meio de crescimento e enraizamento. Na variedade Munhaça local, os rebentos que iniciaram o crescimento à concentrações de 0.05  $\mu\text{M}$  de BA mostram um aument de crescimento relativamente aos primeiros 15 dias. À concentração 13 esta variedade mostra um crescimento menor em 30 dias devido à morte dos rebentos e um reinício de desenvolvimento a partir do callus.

O mesmo comportamento ( maior crescimento nos rebentos que desenvolveram nas concentrações iniciais de 0.05  $\mu\text{M}$  de BA) referido acima é observado nas duas variedades. Os caules de Manica 2B apresentam maiores crescimentos naqueles rebentos que se desenvolveram a concentrações iniciais 1,3,13 e 14 em relação aos caules dos rebentos de Munhaça local (gráfico 7 e 8).

A variedade Munhaça Local mostra melhores crescimentos médios dos caules também nas concentrações intermédias em relação à variedade Manica 2B (gráfico 7 e 8).

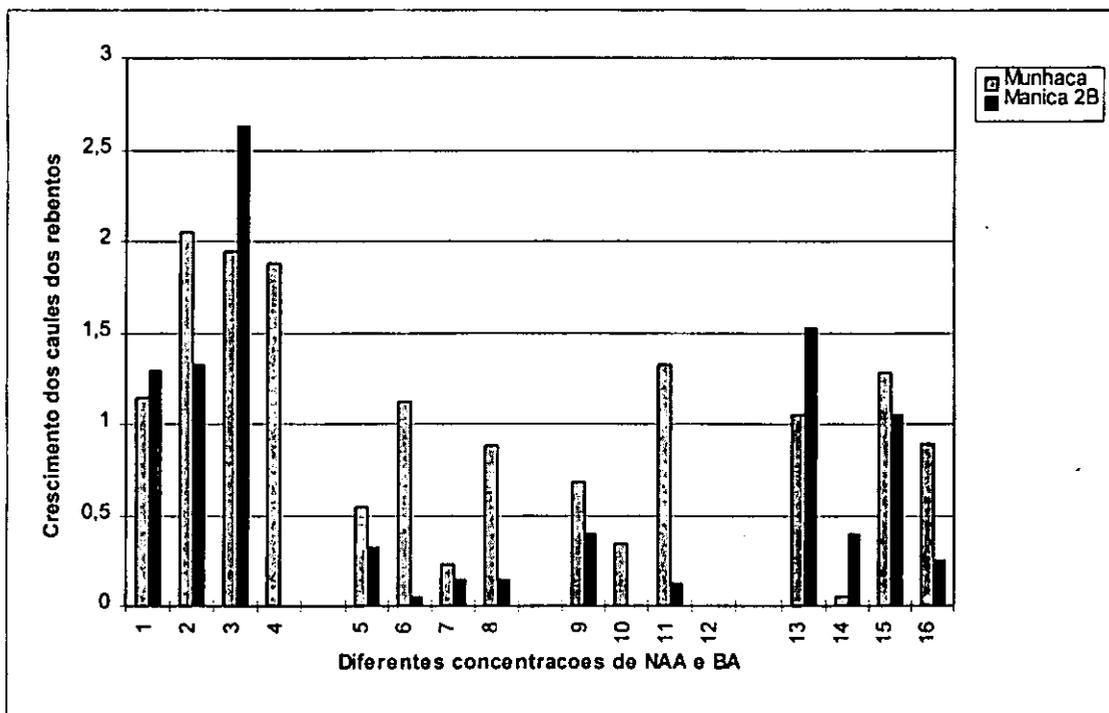


Gráfico 7: Comparação do crescimento médio dos caules dos rebentos das duas variedades após 15 dias no meio de crescimento e enraizamento.

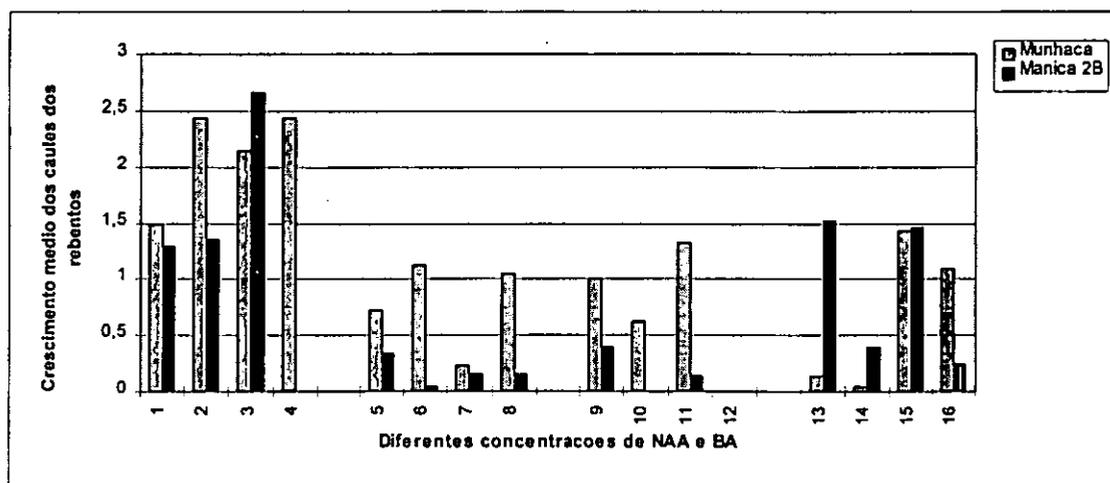


Gráfico 8: Comparação do crescimento médio dos caules dos rebentos das duas variedades após 30 dias no meio de crescimento e enraizamento.

#### 4. Crescimento das raízes

O crescimento das raízes dos rebentos, segue o mesmo padrão observado no desenvolvimento dos rebentos e no crescimento dos caules. Melhor crescimento das raízes foi observado nos rebentos que iniciaram o crescimento à baixas concentrações de BA ( $0,05 \mu\text{M}$ ) (gráficos 9 e 10).

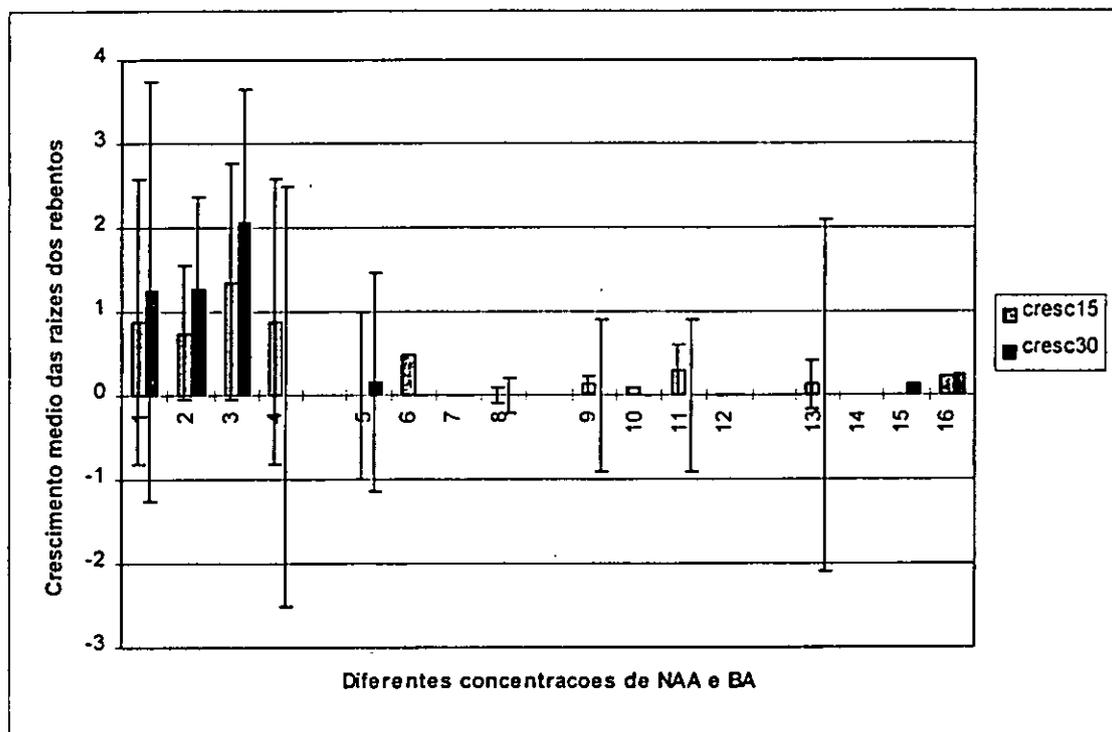
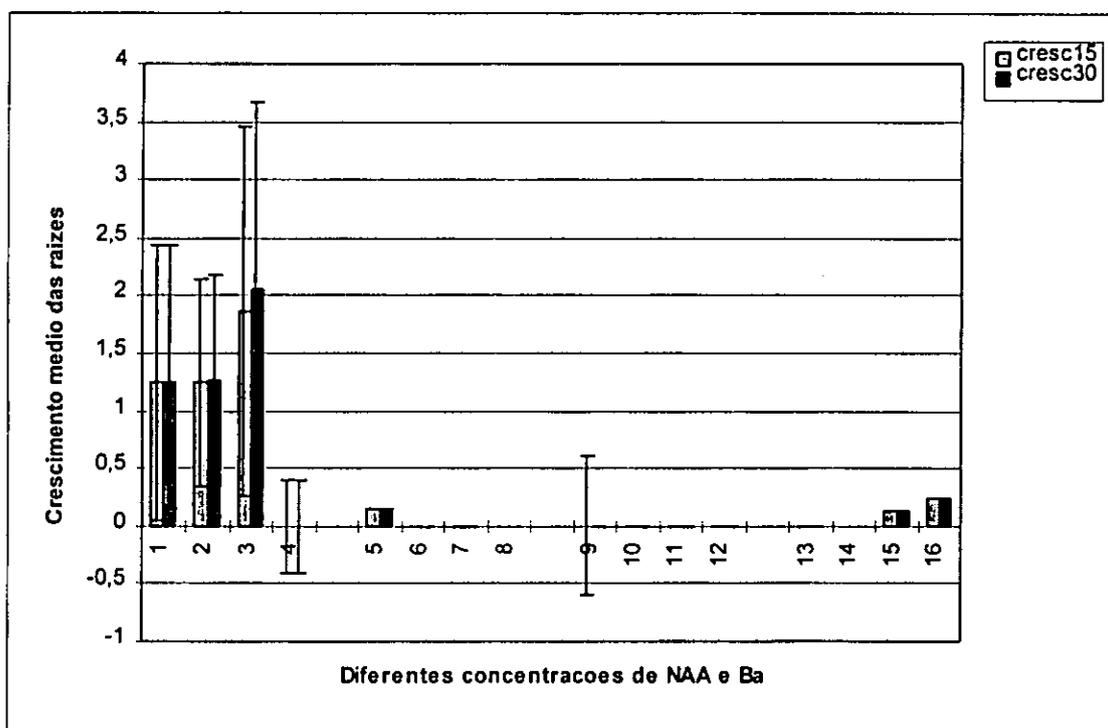


Gráfico 9: Crescimento médio das raízes dos rebentos de Munhaça local após 15 e 30 dias no meio de crescimento e enraizamento.



**Gráfico 10: Crescimento médios das raízes dos rebentos de Manica 2B após 15 e 30 dias no meio de crescimento e enraizamento.**

Nas concentrações iniciais 7,8,14 e 15 não foi observado o desenvolvimento das raízes nos rebentos da variedade Munhaça local devido a morte dos rebentos por contaminação por fungos causando o apodrecimento dos rebentos. Os rebentos de Manica 2B não desenvolveram raízes nas concentrações iniciais 4,6,7,8,9,10,11,13,14 devido a morte dos rebentos causada pela contaminação por fungos o que levou os rebentos ao apodrecimento. Na concentração inicial 12, não foi observado desde o início, crescimento do meristema nas duas variedades.

Nos rebentos de Munhaça local, foi observado um aumento de crescimento depois de 30 dias relativamente aos primeiros 15 dias. Nos rebentos de Manica 2B não houve um grande aumento no comprimento

das raízes depois de 30 dias relativamente aos primeiros 15 dias (gráfico 11 e 12).

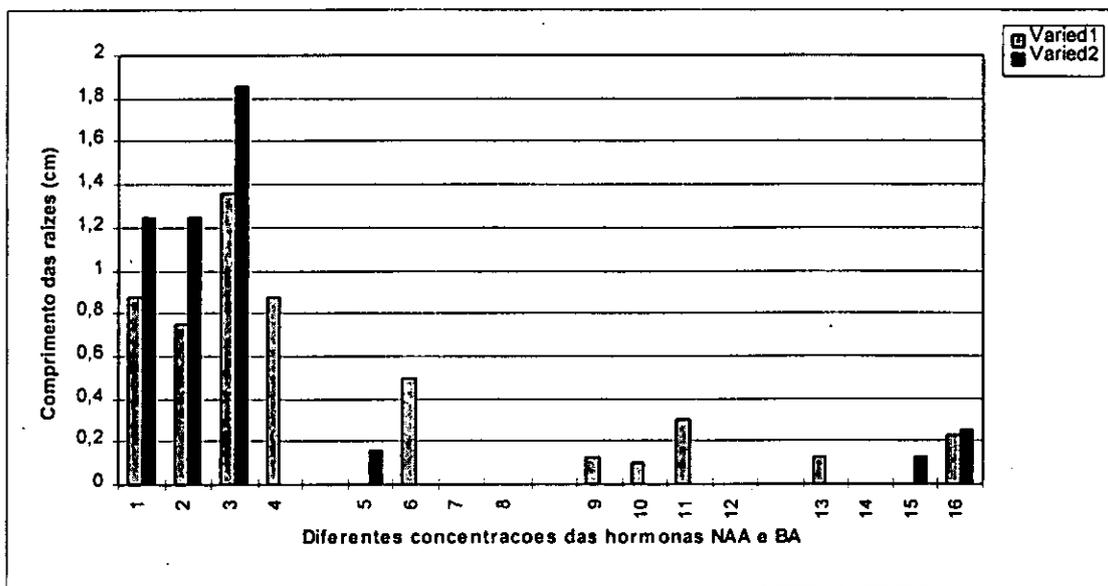


Gráfico 11: Comparação do crescimento médio das raízes de Munhaça local e Manica 2B após 15 dias no meio de crescimento e enraizamento.

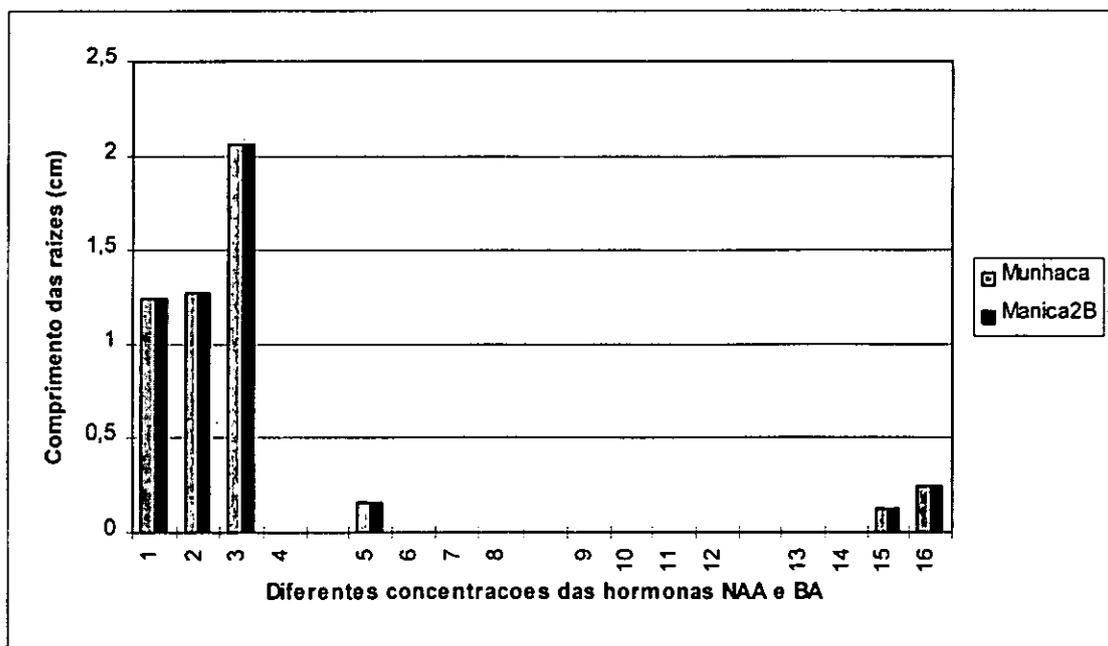


Gráfico 12: Comparação do crescimento médio das raízes de Munhaça local e Manica 2B após 30 dias no meio de crescimento e enraizamento.

### **5. Envasamento dos rebentos com raízes nos vasos**

Os rebentos das duas variedades que desenvolveram raízes com 1 centímetro ou mais, foram transplantados para os vasos de cultura mediam entre 2 a 2.5 centímetros de comprimento. Os vasos usados suportavam ao todo 500 gramas de solo. Os rebentos apresentavam 2 a 3 ramos com folhas verdes, inteiras, e não apresentavam sinais de clorose.

## **V. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS**

### **1. Meristemas**

Durante o estágio de iniciação de crescimento, muitos meristemas sofreram infecção por fungos e oxidação dos compostos fenólicos o que reduziu o tamanho da amostra e diminuiu a eficiência da cultura.

A contaminação por fungos foi observada entre 3 a 10 dias após a inoculação. Segundo Chen *et al* (1990), A contaminação por fungos é caracterizada por micélios de diferentes cores crescendo no ponto inicial da contaminação e os factores que causam a contaminação são comuns em ambientes não estéreis, quebra da câmara de fluxo laminar e abertura dos vasos de cultura.

Segundo Chen *et al* (1990), depois dos compostos fenólicos oxidarem, são produzidos compostos quinónicos que são castanhos. Estes difundem rapidamente pelo meio, inibindo a actividade de outras enzimas e assim, causando danos em toda a cultura.

A contaminação por fungos foi observada também nos estágios subsequentes das culturas: estágio de crescimento e enraizamento causando a perda de muitos rebentos das mandioqueiras e reduzindo a sua eficiência em desenvolver até ao estágio de envasamento. Segundo Chen *et al* (1990), é comum ocorrer a contaminação na cultura e existem muitas causas de contaminação, tais como explants infectados, esterilização insuficiente do meio e dos instrumentos e carência de técnicas.

O tamanho dos meristemas que foram usados, contribuíram para o resultado obtido. Devido às condições em que a experiência foi realizada (falta de controlo de assépcia) optou-se por meristemas maiores que os 2 mm de comprimento requeridos para cultura de meristemas para limpeza do vírus de *Manihot esculenta* (Chen *et al*, 1990), para obtenção rápida de rebentos.

Na estufa onde as estacas cresceram para obtenção do rebento terminal das quais foram retirado os meristemas, não reunia as condições de assépcia requeridas. (Chen *et al*, 1990), recomenda que as estacas depois de lavadas e limpas com água, sejam pré-cultivadas numa solução de nutrientes livre de açucars ou água corrente, e colocadas numa sala limpa, para induzir a formação de novos rebentos que serão usados como explants diminuindo a contaminação.

## 2.Determinação da melhor concentração para o crescimento dos meristemas

Comparando as variâncias dos valores médios de crescimento dos meristemas das duas variedades observam-se diferenças estatisticamente significativas:  $F= 7.51$  e  $P<0.05$  no crescimento sob diferentes tratamentos ( concentrações diferentes de NAA e BA ).

Verifica-se melhores crescimentos à baixas concentrações de BA ( $0.05 \mu\text{M}$ ) e auxina, NAA a concentração  $0.2 \mu\text{M}$ . Segundo Pollard *et al* (1990), quando BA é mantido a baixas concentrações e os níveis de auxina decresce resulta na formação de rebentos. Segundo o mesmo autor, altos níveis de auxina: ácido naphthaleneácetico (NAA) e de citoquininas Benzilaminopurina (BA), resultam na produção contínua de callus.

Segundo Road (1990), o crescimento do rebento a partir dos meristemas de mandioca, decresce com o aumento da concentração de BA e o crescimento dos ramos auxiliares ocorrem preferencialmente quando as concentrações de BA forem reduzidas, menores do que  $0.25 \mu\text{M}$  na presença de  $0.1 \mu\text{M}$  de GA e a  $0.1 \mu\text{M}$  de NAA.

Para a formação de raízes, foi observado que os meristemas que tiveram uma iniciação a baixas concentrações de BA ( $0.05\mu\text{M}$ ) tiveram um maior desenvolvimento de raízes. Segundo (Pollard,1990) a formação de raízes é rapidamente obtida quando NAA é usada como auxina. Quando BA e

NAA são mantidos a baixas concentrações, rebentos e raízes podem ser formados.

Segundo Road (1990), para algumas variedades de cassava, o meio suplementado com NAA, BA e GA, a 1.0, 0.5, e 1.0  $\mu\text{M}$  respectivamente pode ser o mais adequado para regeneração a partir de meristemas. Dentre as citoquininas foi reportado que BA é a mais adequada para a regeneração da planta na presença de NAA e GA e que GA estimula o efeito de crescimento dos rebentos a partir da cultura de meristema.

### 3. Comparação entre as duas variedades

Comparando as variâncias dos valores médios de crescimento inicial dos meristemas das duas variedades concluí-se que não há diferenças estatisticamente significativas:  $F = 1$  e  $P > 0.05$ . As duas variedades apresentam comportamentos indênticos nos diferentes tratamentos apesar de os meristemas da variedade Manica 2B provirem de uma planta infectada pelo vírus e com um fraco desenvolvimento. Isto porque a concentração do vírus na planta é muito baixa ou quase zero nas células meristemáticas do que em tecidos e órgãos maduros porque a infecção provocada pelo vírus move-se devagar, enquanto que células meristemáticas multiplicam-se rapidamente (Chen *et al*, 1990).

Os maiores crescimentos dos caules dos rebentos da variedade Manica 2B, uma variedade atacada pelo vírus, nas concentrações iniciais 1, 3, 13 e 14,

em relação ao caules dos rebentos da variedade Munhaça local, mostram a eficiência de crescimento dos meristemas da variedade Manica 2B.

#### **4. Crescimento entre 15 e 30 dias**

O crescimento em 30 dias dos meristemas caracterizaram-se num crescimento lento nas primeiras semanas, seguindo-se um rápido crescimento até aos 15 dias e, o crescimento entre 15 e 30 dias se verificou mais lento. Depois de 30 dias, o crescimento tende a decrescer. Este padrão de crescimento corresponde a uma curva de crescimento hipotética de um vegetal em que existe um períodos inicial em que o crescimento é lento, seguido de uma fase de rápido aumento de tamanho e, finalmente, um decréscimo na altura da planta (Ferri, 1995).

#### **5. Obtenção de plantas livres de vírus**

Os rebentos obtidos não atingiram os tamanhos desejados para a realização do testes final de ausência do vírus devido à infecções provocadas pelos fungos mesmo depois de envasados porque as condições de assépcia não foram rigorosamente cumpridas. No entanto, observações morfológicas feitas às folhas dos rebentos de Manica 2B, não houve evidências de que as rebentos estivessem infectados pelo vírus. Durante a fase de crescimento, Manica 2B apresenta melhores crescimentos na concentração optima determinada (conc3), do que a variedade Munhaça local, o que pode ser uma indicação da ausência do vírus nos rebentos da variedade Manica 2B.

## VI. Conclusão

⇒ As duas variedades de mandioca ( *Manihot esculenta* Cranz ) apresentam comportamentos semelhantes em resposta aos diferentes tratamentos hormonais.

⇒ Os tecidos meristemáticos carregam o vírus a muito baixas concentrações ou concentrações nulas.

⇒ O melhor desenvolvimento dos rebentos a partir de células meristemáticas ocorreu a concentrações baixas de BA (0.05  $\mu\text{M}$ ) e a concentração 0.2  $\mu\text{M}$  de NAA e 0.1  $\mu\text{M}$  de GA.

⇒ Através da cultura de meristemas pode-se produzir plantas livres de vírus.

## VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ◇ Bhojwani S.S. and Razdan M.K. (1983). Plant Tissue Culture. 502 pp. Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, The Netherland.
- ◇ Chen Z. Evans D.A. Sharp W.R. Ammirato Sondall M.R. (1983). Handbook of plant Cell Culture. Perennial Crops. Vol. 6. 506 pp. MacGraw-Hill Publishing Company. EUA.
- ◇ Davies, P.J. Plant Hormones.(1995). Physiology, Biochemistry and molecular Biology. 2ª edição. 833 pp. Kluwer Academic Publishers.The Netherland.
- ◇ Dodds, J.H.,Roberts, L. W..(1995). Experiments in Plant Tissue Culture. 256 pp. 3ª edição. Cambridge University Press, Cambridge. U.K.
- ◇ Ferri, M. G. (1985) Fisiologia Vegetal. 2ª edição. 362 pp. Editora Pedagógica e Universitária São Paulo. Brazil.
- ◇ Lindsey, K. (1991) Plant tissue Culture Manual. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht/Boston/London.
- ◇ Magrath, P. (1997). Lethal Hybrid Decimates Harvest. New Scientist. Volume 155.Nº 2097. England.

- ◇ Murashige, T. and Skoog, F. (1962). A revised Medium for Rapid Growth and Biossays with Tobacco Tissue Cultures. Physiologia Plantarum. Vol. 15. 437-497. Copenhagen. Denmark.
  
- ◇ Noggle G. R. Fritz, G. J. (1983). Introductory Plant Physiology. 2<sup>a</sup> ed. 627 pp. Prentice-Hall, Inc.
  
- ◇ Road O. (1990). Cassava in Tropical África. A reference Manual. 176 pp. International Institute of Tropical Agriculture (IITA). Ibadan, Nigéria.
  
- ◇ Segeren, P. Oever, R. Compton, J.(1994).Pragas, Doenças e ervas daninhas nas culturas alimentares em Moçambique. INIA-Ministério de Agricultura. Moçambique.
  
- ◇ Sharp, W.R. Evans, D. Ammirato,P.V. Yamada,Y. (1984). Handbook of Plant Cell Culture. vol.2, 644 pp. Macmilliam Publishing Company. New York.
  
- ◇ Sigmund, R. Espig,G. (1991). The cultivated Plants of the Tropics and Subtropics. 552 pp. Priese GmbH, Berlin. Germany.
  
- ◇ Walkey D.G.A. (1991). Applied Plant Virology. 2<sup>a</sup> Ed. 338 pp. Chapman and Hall. London.

## RECOMENDAÇÕES

Recomenda-se que em próximos trabalhos seja criado um laboratório para cultura de tecidos com limitações na sua utilização para permitir as condições de assépcia requeridas durante a cultura de tecidos.

A cultura de tecidos é uma técnica ecológicamente sustentável para obtenção de melhores produções sem o uso de pesticidas. Através da cultura de tecidos, é possível manipulações genéticas para o melhoramento das culturas minimizando a fome principalmente nos países pobres.

# ANEXOS

**Tabela 1 : Comprimento dos rebentos durante a iniciação de crescimento das duas variedades.**

Conc.	Munhaça L cresc. 15 dias	Manica 2B cresc.15 dias	Munhaç L cresc. 30 dias	Manica 2B cresc. 30 dias
1	1.15	1.30	1.50	1.30
2	2.05	1.33	2.43	1.36
3	1.95	2.63	2.15	2.66
4	1.88	0.00	2.43	0.00
1	0.55	0.33	0.73	0.33
2	1.13	0.05	1.13	0.05
3	0.23	0.15	0.23	0.15
4	0.88	0.15	1.05	0.15
1	0.68	0.40	1	0.40
2	0.35	0.00	0.63	0.00
3	1.33	0.13	1.33	0.13
4	0.00	0.00	0.00	0.00
1	1.05	1.53	0.13	1.53
2	0.05	0.40	0.05	0.40
3	1.28	1.05	1.43	1.46
4	0.9	0.25	1.10	0.25

**Tabela 2: Crescimento médio dos caules dos rebentos no meio de crescimento e enraizamento das duas variedades**

conc	Munhaca l cresc. 15 dias	Manica 2B cresc.15 dias	Munhaca l cresc. 30 dias	Manica2B cresc. 30 dias
1	1.15	1.300	1.500	1.300
2	2.05	1.325	2.425	1.375
3	1.95	2.625	2.150	2.675
4	1.875	0.000	2.425	0.000
1	0.55	0.325	0.725	0.325
2	1.125	0.050	1.125	0.050
3	0.225	0.150	0.225	0.150
4	0.875	0.150	1.050	0.150
1	0.675	0.400	1.000	0.400
2	0.350	0.000	0.625	0.000
3	1.325	0.125	1.325	0.125
4	0.000	0.000	0.00	0.000
1	1.050	1.525	0.125	1.525
2	0.050	0.400	0.050	0.400
3	0.127	1.050	1.425	1.475
4	0.90	0.250	1.100	0.250

**Tabela 3: Crescimento médio das raízes dos rebentos no meio de crescimento e enraizamento das duas variedades**

Conc.	Munhaça L comp. 15 dias	Manica2B comp.15 dias	Munhaça L comp. 30 dias	Manica2B comp. 30 dias
1	0.88	1.25	1.25	1.25
2	0.75	1.25	1.00	1.28
3	1.36	1.86	1.90	2.06
4	0.88	0.00	1.25	0.00
1	0.00	0.16	0.00	0.16
2	0.50	0.00	0.00	0.00
3	0.00	0.00	0.00	0.00
4	0.00	0.00	0.00	0.00
1	0.13	0.00	0.13	0.00
2	0.10	0.00	0.10	0.00
3	0.30	0.00	0.30	0.00
4	0.00	0.00	0.00	0.00
1	0.13	0.00	0.13	0.00
2	0.00	0.00	0.00	0.00
3	0.00	0.13	0.00	0.13
4	0.23	0.25	0.23	0.25

**Tabela 6: Crescimento dos rebentos, dos caules e das raízes da variedade Munhaça local**

Variedade: Munhaca local

conc.	rebento	m.cresc NAA,BA,GA		m.de enraizamento 0,5 microl. de NAA				Potting
		cresc1	cresc 2	C-cresc1	C-cresc2	R-cresc1	R-cresc2	
A	1	0,5	1,5	1,5	1,5	0	0	3
	2	0,2	2	2	3	3,5	5	
	3	0,1	0,1	0,1	0,5	0	0	
	4	0,3	1,5	0,5	0,5	0	0	
B	1	2	2,5	2,5	2,7	1,5	2	
	2	1,5	2	2,5	2	1,5	2	
	3	1,5	1,7	2	3,5	0	0	
	4	0	0	0	0	0	0	
C	1	2	3	3	3,7	3,5	4	
	2	1,5	2	2	2,1	1	1,8	
	3	1,5	1,8	1,8	1,8	1	1,8	
	4	0,2	1	1	1	0	0	
D	1	3,5	3,8	4,3	5,8	3,5	5	5,8
	2	0,2	0,6	1	1,2	0	0	
	3	0,5	0,5	1,2	1,2	0	0	
	4	1	1	1	1,5	0	0	
E	1	0,5	1	1	1	0	0	
	2	0,1	0,7	0,7	1,4	0	0,7	
	3	0	0,3	0,5		0		
	4	0	0	0	0	0	0	
F	1	0,2	0,6	0,6	0,6	2	2,5	0,6
	2	0,2	0,4	0,4	0,4	0	0	
	3	1	2,5	2,5	2,5	2,5	0	
	4	0,1	0,3	1	1	0	0	
G	1	0,3	0,4	0,4	0,4	0	0	
	2	0,2	0,3	0,3	0,3	0	0	
	3	0,1	0,2	0,2	0,2	0	0	
	4	0	0	0	0	0	0	
H	1	1	1	1	1,5			
	2	1	1	1	1			
	3	0,2	0,5	1	1			
	4	0,2	0,4	0,5	0,7			
I	1	0,3	0,5	0,5	1			
	2	0,2	0,2	0,5	1			
	3	0	1,5	1,7	2			
	4	0	0	0	0			
J	1	0,3	0,3	0,3	0,5	0	0	
	2	0,3	0,5	1	1	0	0	
	3	0,3	0,5	1	1	0	0	
	4	0	0	0	0	0	0	
K	1	1,5	1,8	1,8	1,8	0	2	1,8
	2	1	1,5	1,5	1,5	0		

L	3	0,5	0,6	1	1	0		
	4	0,5	0,9	1	0,9	1,2		
	1	0	0	0	0	0	0	
	2	0	0	0	0	0	0	
	3	0	0	0	0	0	0	
	4	0	0	0	0	0	0	
M	1	0,5	1	1	1	0	0	
	2	0,5	0,5	0,5	1,2	0,5	1	
	3	0,3	0,5	0,5	1	0	0	
	4	0,5	1	1	1	0	2	1
N	1	0,2	0,2	0,2	0,2	0	0	
	2	0	0	0	0	0	0	
	3	0	0	0	0	0	0	
	4	0	0	0	0	0	0	
O	1	1,5	1,8	1,8	1,9	0		
	2	1	1,1	1,1	1,1	0	0	
	3	1	1,2	1,2	1,5	0		
	4	1	1	1	1,2	0		
P	1	0,5	0,6	0,6	0,6	0	0	
	2	0,5	0,7	0,7	1,5	0,4	4,5	1,5
	3	1	1,2	1,2	1,2	0	0	1,2
	4	1	1,1	0	0	0	0	

**Tabela 5: Crescimento dos rebento, dos caules e das raízes da variedade Manica 2B**

Variedade : Manica 2B

conc.	rebento	m.inic.NAA BA GA		m.de enraizamento 0,5 microlitros de NAA				Potting
		cresc1	cresc2	C-cresc1	C-cresc2	R-cresc1	R-cresc2	
A	1	1	2	2	2	0	0	
	2	1	1,5	1,5	1,5	0		
	3	0,2	0,5	0,5	0,5	0		
	4	0	0	0	0	0		
B	1	1	1,2	1,2	1,2	2,5	2,5	2,5
	2	1,5	2	2	2,2	2	2	2
	3	1	1,7	1,7	1,7	0,5	0,6	
	4	0	0,4	0	0	0	0	
C	1	2,5	3,5	3,5	3,5	2,5	2,5	
	2	3	2,4	2,4	2,4	1,5	1,8	1,8
	3	2	2,5	2,5	2,7	3,5	4	2,5
	4	2						
D	1	0	0	0	0	0	0	
	2	0	0	0	0	0	0	
	3	0	0	0	0	0	0	
	4	0	0	0	0	0	0	
E	1	0,1	0,3	0,3	0,3	0,7		
	2	0	0,1	0,3		0		
	3	0,5	0,5	0,5				

F	4	0,2	0,2	0,2	
	1	0,1	0,1	0,1	0
	2	0	0,1	0,1	
	3	0	0	0	
G	4	0	0	0	
	1	0,1	0,1	0,1	
	2	0,1	0,1	0,1	
	3	0,3	0,3	0,3	
H	4	0,1	0,1	0,1	
	1	0,1	0,1	0,1	
	2	0	0,1	0,1	
	3	0,2	0,4	0,4	
I	4	0	0	0	
	1	1	1	1,2	
	2	0,3	0,3	0,3	
	3	0,1	0,1	0,1	
J	4	0	0	0	
	1	0	0	0	
	2	0	0	0	
	3	0	0	0	
K	4	0	0	0	
	1	0,2	0,5	0,5	
	2	0	0	0	
	3	0	0	0	
L	4	0	0	0	
	1	0	0	0	0
	2	0	0	0	0
	3	0	0	0	0
M	4	0	0	0	0
	1	1	1,2	1,6	
	2	1	1,2	1,7	
	3	0,5	1		
N	4	1,2	1,8		
	1	0,5	0,5	0,5	
	2	0,5	0,5	0,5	
	3	0,3	0,3		
O	4	0,2	0,3		
	1	1	1		
	2	1	1,2	1,5	0
	3	1	1,2	1,2	0
P	4	0,2	0,5		
	1	0,5	1		
	2	0	0		
	3	0	0		
	4	0	0		

**Tabela 6 : Tabela das combinações hormonais usadas para o crescimento inicial**

conc1: 0.05  $\mu\text{M}$  de BA + 0.05  $\mu\text{M}$  de NAA + 0.1  $\mu\text{M}$  de GA

conc2: 0.05  $\mu\text{M}$  de BA + 0.1  $\mu\text{M}$  de NAA + 0.1  $\mu\text{M}$  de GA

conc3: 0.05  $\mu\text{M}$  de BA + 0.2  $\mu\text{M}$  de NAA + 0.1  $\mu\text{M}$  de GA

conc4: 0.05  $\mu\text{M}$  de BA + 0.3  $\mu\text{M}$  de NAA + 0.1  $\mu\text{M}$  de GA

conc5: 0.1 $\mu\text{M}$  de BA + 0.05  $\mu\text{M}$  de NAA +0.1  $\mu\text{M}$  de GA

conc6: 0.1 $\mu\text{M}$  de BA + 0.1  $\mu\text{M}$  de NAA +0.1  $\mu\text{M}$  de GA

conc7: 0.1 $\mu\text{M}$  de BA + 0.2  $\mu\text{M}$  de NAA + 0.1  $\mu\text{M}$  de GA

conc8: 0.1 $\mu\text{M}$  de BA + 0.3  $\mu\text{M}$  de NAA + 0.1  $\mu\text{M}$  de GA

conc9: 0.5  $\mu\text{M}$  de BA + 0.05  $\mu\text{M}$  de NAA +0.1  $\mu\text{M}$  de GA

conc10: 0.5  $\mu\text{M}$  de BA + 0.1  $\mu\text{M}$  de NAA +0.1  $\mu\text{M}$  de GA

conc11: 0.5  $\mu\text{M}$  de BA + 0.2  $\mu\text{M}$  de NAA + 0.1  $\mu\text{M}$  de GA

conc12: 0.5  $\mu\text{M}$  de BA + 0.3  $\mu\text{M}$  de NAA + 0.1  $\mu\text{M}$  de GA

conc13: 1.0  $\mu\text{M}$  de BA + 0.05  $\mu\text{M}$  de NAA +0.1  $\mu\text{M}$  de GA

conc14: 1.0  $\mu\text{M}$  de BA + 0.1  $\mu\text{M}$  de NAA + 0.1  $\mu\text{M}$  de GA

conc15: 1.0  $\mu\text{M}$  de BA + 0.2  $\mu\text{M}$  de NAA + 0.1  $\mu\text{M}$  de GA

conc16: 1.0  $\mu\text{M}$  de BA + 0.3  $\mu\text{M}$  de NAA + 0.1  $\mu\text{M}$  de GA

**Tabela 7 : Meio de cultura para cultura de tecidos MS Musashige and Skoog (1962).**

Stock solutions for Murashige and Skoog's medium (MS)<sup>a</sup>

Constituents	Amount (mg l <sup>-1</sup> )
<i>Stock solution I</i>	
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	33 000
KNO <sub>3</sub>	38 000
CaCl <sub>2</sub> .2 H <sub>2</sub> O	8800
MgSO <sub>4</sub> .7 H <sub>2</sub> O	7400
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3400
<i>Stock solution II</i>	
KI	166
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1240
MnSO <sub>4</sub> .4 H <sub>2</sub> O	4460
ZnSO <sub>4</sub> .7 H <sub>2</sub> O	1720
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2 H <sub>2</sub> O	50
CuSO <sub>4</sub> .5 H <sub>2</sub> O	5
CoCl <sub>2</sub> .6 H <sub>2</sub> O	5
<i>Stock solution III<sup>b</sup></i>	
FeSO <sub>4</sub> .7 H <sub>2</sub> O	5560
Na <sub>2</sub> .EDTA.2 H <sub>2</sub> O	7460
<i>Stock solution IV</i>	
Inositol	20 000
Nicotinic acid	100
Pyridoxine HCl	100
Thiamine HCl	100
Glycine	400

<sup>a</sup> To prepare 1 l of medium take 50 ml of stock I, 5 ml of stock II, 5 ml of stock III, and 5 ml of stock IV.

<sup>b</sup> Dissolve FeSO<sub>4</sub>.7 H<sub>2</sub>O and Na<sub>2</sub>.EDTA.2 H<sub>2</sub>O separately in 450 ml distilled water by heating and constant stirring. Mix the two solutions, adjust the pH to 5.5, and add distilled water to make up the final volume to 1 l.

