

**USO DE DIFERENTES GELIFICANTES E DE UM ESTERILIZANTE EM
CULTURA DE SEGMENTOS NODAIS DE BATATA-DOCE**

JOICE YURI MINAMIGUCHI

**USO DE DIFERENTES GELIFICANTES E DE UM ESTERILIZANTE EM
CULTURA DE SEGMENTOS NODAIS DE BATATA-DOCE**

JOICE YURI MINAMIGUCHI

Dissertação apresentada a Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Agronomia.

Área de Concentração: Produção Vegetal.

Orientador: Prof. Nelson Barbosa Machado Neto, Dr.

635.22
M663c

Minamiguchi, Joice Yuri.

Uso de diferentes gelificantes e de um esterilizante em cultura de segmentos nodais de batata-doce / Joice Yuri Minamiguchi. – Presidente Prudente, 2013.
80f.: il.

Dissertação (Mestrado em Agronomia) -
Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE:
Presidente Prudente – SP, 2013.

Bibliografia

Orientador: Nelson Barbosa Machado Neto.

1. *Ipomea batatas*. 2. Fisiologia. 3. Bioquímica.
4. *In vitro*. 5. Crescimento. 6. Esterilização. I.
Título.

JOICE YURI MINAMIGUCHI

**USO DE DIFERENTES GELIFICANTES E DE UM ESTERILIZANTE EM
CULTURA DE SEGMENTOS NODAIS DE BATATA-DOCE**

Presidente Prudente, 22 de abril de
Dissertação apresentada a Pró-Reitoria de
Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do
Oeste Paulista, como parte dos requisitos
para obtenção do título de Mestre em
Agronomia.2013

Presidente Prudente, 22 de abril de 2013

BANCA EXAMINADORA

Prof. Nelson Barbosa Machado Neto Dr.
Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE
Presidente Prudente

Prof.^a Alessandra Ferreira Ribas Dr.
Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE
Presidente Prudente

Prof. Dr. Maria Auxiliadora Milaneze
Universidade Estadual de Maringá - UEM
Maringá

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais e irmãos que sempre me apoiaram e acreditaram em mim.

AGRADECIMENTOS

Ao professor orientador, Dr. Nelson Barbosa Machado Neto, que sempre me deu a oportunidade de errar, pois foi errando que tive o melhor dos ensinamentos;

A querida professora Ceci Castilho Custódio, que com a sua doçura, sempre me auxiliou quando precisei;

A todas as meninas dos laboratórios, não somente pelos serviços prestados, mas principalmente pela amizade;

A todos os professores do mestrado, pela dedicação e pela divisão de seus conhecimentos;

Ao Renato Ueda pela doação da batata-doce "roxa";

A minha grande amiga Renata Batista dos Santos, que sempre esteve pronta para ouvir minhas reclamações, mesmo estando distante.

*Agradeço todas as dificuldades que
enfrentei se não fosse por elas, eu não teria saído
do lugar. As facilidades nos impedem de caminhar.
Mesmo as críticas nos auxiliam muito.”*

Chico Xavier

LISTA DE FIGURA

1	CAPÍTULO I: UTILIZAÇÃO DE DIFERENTES GELIFICANTES PARA A CULTURA DE MICRO PROPÁGULOS DE BATATA-DOCE.	26
FIGURA 1	- Número de raízes (A), número de nós (B), com seis doses de gelificantes, em duas variedades de batata-doce.	36
FIGURA 2	- Taxa de crescimento relativo do comprimento da parte aérea (A). Teor de prolina (B), com seis doses de gelificantes; em duas variedades de batata-doce.	38
2	CAPÍTULO II: USO DE KATHON®CG PARA CULTIVO DE MICROPROPÁGULOS DE BATATA-DOCE.....	43
FIGURA 1	- Comprimento da parte aérea (CPA) (A) de explantes de três variedades de batata-doce no meio de cultura com quatro doses de Kathon®CG e a testemunha. CPA (B) de explantes que foram submetidos aos tratamentos e depois transferidos para meio de cultura sem Kathon®CG.	53
FIGURA 2	- Comprimento de raiz (CR) (A) de explantes de três variedades de batata-doce no meio de cultura com quatro doses de Kathon®CG e a testemunha. CR (B) de explantes que foram submetidos aos tratamentos e depois transferidos para meio de cultura sem Kathon®CG.....	55
FIGURA 3	- Número de raízes (NR) (A) de explantes de três variedades de batata-doce no meio de cultura com quatro doses de Kathon®CG e a testemunha. NR (B) de explantes que foram submetidos aos tratamentos e depois transferidos para meio de cultura sem Kathon®CG.....	57
FIGURA 4	- Número de nós (NN) (A) de explantes de três variedades de batata-doce no meio de cultura com quatro doses de Kathon®CG e a testemunha. NN (B) de explantes que foram submetidos aos tratamentos e depois transferidos para meio de cultura sem Kathon®CG.....	59

- FIGURA 5 - Massa seca da parte aérea (MSPA) (A) de explantes de três variedades de batata-doce no meio de cultura com quatro doses de Kathon®CG e a testemunha. MSPA (B) de explantes que foram submetidos aos tratamentos e depois transferidos para meio de cultura sem Kathon®CG.61
- FIGURA 6 - Massa seca de raiz (MSR) (A) de explantes de três variedades de batata-doce no meio de cultura com quatro doses de Kathon®CG e a testemunha. MSR (B) de explantes que foram submetidos aos tratamentos e depois transferidos para meio de cultura sem Kathon®CG.63
- FIGURA 7 - Taxa de crescimento relativo de comprimento da parte aérea (TCRCPA) (A), de explantes de três variedades de batata-doce no meio de cultura com quatro doses de Kathon®CG e a testemunha. TCRPA (B) TCRCR (D) de explantes que foram submetidos aos tratamentos e depois transferidos para meio de cultura sem Kathon®CG.65
- FIGURA 8 - Taxa de crescimento relativo de massa seca da parte aérea (TCRMSPA) (A), taxa de crescimento relativo de massa seca de raiz (TCRMSR) (C) de explantes de três variedades de batata-doce no meio de cultura com quatro doses de Kathon®CG e a testemunha. TCRMSPA (B) TCRMSR (D) de explantes que foram submetidos aos tratamentos e depois transferidos para meio de cultura sem Kathon®CG.66
- FIGURA 9 - Teor de prolina (A) de explantes de três variedades de batata-doce no meio de cultura com quatro doses de Kathon®CG e a testemunha. Teor de prolina (B) de explantes que foram submetidos aos tratamentos e depois transferidos para meio de cultura sem Kathon®CG.68
- FIGURA 10 - Atividade de SOD (A) de explantes de três variedades de batata-doce no meio de cultura com quatro doses de Kathon®CG e a testemunha. Atividade de SOD (B) de explantes que foram

submetidos aos tratamentos e depois transferidos para meio de cultura sem Kathon®CG.70

FIGURA 11 - Teor de proteína (A) de explantes de três variedades de batata-doce no meio de cultura com quatro doses de Kathon®CG e a testemunha. Teor de proteína (B) de explantes que foram submetidos aos tratamentos e depois transferidos para meio de cultura sem Kathon®CG.....71

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	14
1.1 BATATA-DOCE.....	14
1.2 CULTURA DE TECIDOS.....	15
1.3 AUTOCLAVAGEM NA CULTURA DE TECIDOS.....	16
1.4 GELIFICANTES	17
1.5 ISOTIAZOLINONA	18
1.6 ESTRESSE DE PLANTAS IN VITRO	20
REFERÊNCIAS	22
2 CAPÍTULO I: UTILIZAÇÃO DE DIFERENTES GELIFICANTES PARA A CULTURA DE MICRO PROPÁGULOS DE BATATA-DOCE	28
2.1 RESUMO.....	29
2.2 ABSTRACT	30
2.3 INTRODUÇÃO	31
2.4 MATERIAL E MÉTODOS.....	33
2.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
2.6 CONCLUSÕES	42
REFERÊNCIAS	43
3 CAPÍTULO II: USO DE KATHON®CG PARA CULTIVO DE MICROPROPÁGULOS DE BATATA-DOCE	45
3.1 RESUMO.....	46
3.2 ABSTRACT	47
3.3 INTRODUÇÃO	48
3.4 MATERIAL E MÉTODOS.....	51
3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	54
3.6 CONCLUSÃO.....	74
REFERÊNCIAS	75

RESUMO

A cultura da *Ipomoea batatas* (L.) é de imenso potencial alimentar, tanto para seres humanos quanto para animais. É uma raiz de alto rendimento e rico em nutrientes, que ainda ocupa áreas marginais da agricultura. A propagação é vegetativa utilizando-se ramos ou brotações de raízes para plantio. Porém, estes métodos podem afetar a propagação desta espécie, uma vez que pode disseminar doenças. O objetivo deste trabalho foi avaliar gelificantes e um desinfetante sistêmico na cultura de tecido de batata-doce. Para isso dois experimentos foram montados, um comparando três doses de cada um dos gelificantes (agar e Phytigel[®]) e outro uma curva de doses de isotiazolinonas (Kathon[®]CG). Foram avaliados parâmetros de desenvolvimento como altura e massa seca dos explantes, e as taxas de desenvolvimento de cada um, além parâmetros bioquímicos, como acúmulo de prolina e atividade da superóxido dismutase. A batata-doce não respondeu positivamente aos diferentes gelificantes, recomendando-se então o de menor custo. O Kathon[®]CG provocou redução no crescimento dos explantes em qualquer dose. O retorno ao meio sem o Kathon[®]CG promoveu incremento no crescimento das plantas sob condições experimentais oferecidas. Batata-doce não se comporta como espécie acumuladora de prolina.

Palavras-chave: *Ipomoea batatas*, Phytigel[®], agar, isotiazolinonas, *in vitro*.

ABSTRACT

Sweet potato culture has a high potential for human and animal feeding; and for this last purpose the branches can be used as hay. Is a high yield root, rich in nutrients which occupy marginal crop lands. The propagation is highly vegetative using branches or shoots from roots, what can affect it by disseminating pathogens. The main objective of this work was to evaluate the effect of gelling agents and a systemic disinfectant in sweet potato tissue culture. Two experiments were done; one with different doses of gelling agents (Agar and Phytigel[®]) and another with a response curve of isothiazolinones (Kathon[®]CG). Shoots and roots Length and dry weight, their development rates; biochemical parameters as proline accumulation and Superoxide Dismutase were evaluated. Sweet potato did not respond to different gelling agents, and the recommendation is to use the low cost effective. Kathon[®]CG reduced the growth in the different concentrations. The return to the medium without Kathon[®]CG improved the plantlet growth.

Keywords: *Ipomea batatas*, physiology, biochemistry, *in vitro*.

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 BATATA-DOCE

A batata-doce [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.] é uma espécie da família Convolvulaceae, herbácea e perene, porém cultivada como anual. Seu hábito de crescimento é predominantemente decumbente, crescendo rápido e horizontalmente sobre o solo, embora existam cultivares de porte ereto e semi-ereto (HUAMAN, 1992). É a quarta hortaliça não folhosa mais consumida no Brasil, superada apenas pela batata inglesa, tomate e abóbora. É uma cultura rústica, de fácil manutenção e ampla adaptação. Esta espécie apresenta a característica de armazenar reservas nutritivas em suas raízes, possuindo imenso potencial alimentício e industrial (SILVA; LOPES; MAGALHÃES, 2004), contendo ferro, cálcio e fósforo, além de ser rica em vitaminas A, B e C (OLIVEIRA et al., 2005). Apresenta, ainda dentre outras características, um germoplasma com grande diversidade genotípica e fenotípica (PEIXOTO; MIRANDA, 1984).

Raízes de batata-doce podem ser utilizadas na alimentação humana e animal, tanto na forma *in natura* quanto industrializada, para a produção de etanol (TORRES; TEIXEIRA, 1996), em indústrias têxteis, de cola e corantes naturais, principalmente os cultivares com polpa alaranjada e "roxa" (FIGUEIREDO, 1995).

São agronomicamente precoces e constituem importante fonte de energia e proteínas (SILVA; LOPES; MAGALHÃES 2002). É cultivada em todo território nacional, apresentando uma infinidade de formas em suas raízes. Praticamente todos os estados brasileiros possuem cultivares peculiares. Porém, muito do que se conhece é mera duplicata, visto ocorrerem diversos cultivares iguais com nomes diferentes (MURILO, 1990).

Na região Nordeste, onde as condições edafoclimáticas favorecem sua produção, destaca-se como a principal hortaliça, com um consumo *per capita* de 6,8 kg/ano (MIRANDA; FRANÇA; CARRIJO, 1989).

O rendimento médio nacional é menor que 10 toneladas por hectare, (500 caixas por ha), enquanto que se pode obter produtividades superiores a 22 toneladas por hectare, quando se utilizam tecnologias relacionadas com a escolha

do cultivar adequado, época de plantio e, principalmente, irrigação (SILVA; LOPES; MAGALHÃES, 2002).

A produção de batata-doce encontra-se deprimida, fundamentalmente, pela falta de disponibilidade de propágulos de alta qualidade (LEWTHWAITE, et al., 2011). As técnicas biotecnológicas são alternativas para o resgate do potencial produtivo, cuja perda de produtividade se deve ao envelhecimento fisiológico (MORALES et al., 1998), como por exemplo a batata-doce *in vitro* tornaram possível a micropropagação desta espécie através de explantes foliares (pecíolo e limbos), nós, entrenós, pedaços de raízes, ápices, brotos, pedaços de ramos e meristemas. Esta última fonte de propágulo é empregado quando se busca a “limpeza” de vírus e outros patógenos (SILVA; SOUZA; PAZ, 1991), além de possibilitar o intercâmbio internacional de germoplasma (MAGALHÃES et al., 2006).

1.2 CULTURA DE TECIDOS

A cultura de tecidos pode ser definida como o cultivo de todos os tipos de células, tecidos e órgãos vegetais, sob condições assépticas (SMITH; DREW, 1990). É um processo que se utiliza de pequenos fragmentos de tecidos vivo, isolados de um organismo e cultivados asépticamente, por períodos indefinidos, em um meio nutritivo (MANTELL; MATTHEWS; MCKEE, 1994).

O processo está baseado na totipotencialidade dos explantes. é como a conservação da capacidade genética para o desenvolvimento de uma planta completa. Por meio desta técnica, fragmentos de tecidos vegetais vivos, denominados explantes, são retirados de plantas de interesse e cultivados em meio nutritivo definido, sob condições assépticas. Estes fragmentos podem ser compostos por células individuais, tecidos ou órgãos (SERAFINI; BARROS; AZEVEDO, 2001).

A técnica de propagação comercial de plantas, em laboratório, teve início na década de 70 (GONZÁLEZ, 1998). Naquela época, a quantidade de plantas produzidas comercialmente, em laboratório, totalizava cerca de 500.000.000 ao ano, em todo o mundo (PÉREZ, 1998).

Para a utilização das técnicas de cultura de tecidos foram desenvolvidos meios nutritivos de composições determinados para que as plantas se desenvolvam no cultivo *in vitro*, com formulações que satisfaçam as necessidades de cada vegetal. De forma geral, os meios de cultura apresentam em sua composição, basicamente: macronutrientes, micronutrientes, suplemento de ferro,

vitaminas, água, fontes de carboidratos, mio-inositol e, quando necessário, reguladores de crescimento vegetal (DODDS; ROBERTS, 1995). Desta forma, aproximam-se as condições *in vitro* daquelas necessárias para que as plantas se desenvolvem no ambiente, como energia proveniente da luz, água, elementos minerais, entre outros (TAIZ; ZEIGER, 2004). A micropropagação é, sem dúvida, a técnica de cultura de tecidos mais difundida e com maior utilização no âmbito comercial (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

A maior parte das empresas nacionais de biotecnologia atua no segmento denominado agrobiotecnologia, e desenvolve produtos e serviços voltados a agricultura e agropecuária. Estas empresas são predominantemente microempresas ou centros de desenvolvimento tecnológico que desenvolvem insumos agrícolas (dentre eles mudas de vegetais) ou produtos e serviços para o setor de alimentos (SALLES-FILHO et al., 2001).

1.3 AUTOCLAVAGEM NA CULTURA DE TECIDOS

A autoclavagem é uma técnica comumente utilizada para a esterilização de vidrarias, meios de cultura e materiais cirúrgicos em laboratório (BURGER, 1988), é uma operação que demanda tempo, além de provocar a degradação de alguns componentes do meio, como carboidratos (STREET; LOWE, 1950; BALL, 1953), reguladores de crescimento e substâncias orgânicas termo lábeis além de alterar o pH da formulação.

É um procedimento que utiliza altas temperaturas (121°C) e pressão (1 kgf cm⁻²) por períodos variáveis, para eliminação de microrganismos no meio de cultura e no recipiente de cultivo das plantas (TORRES; CALDAS; BUSO, 1998). Além de elevar os custos de produção das mudas micropropagadas pelo alto consumo energético das autoclaves (TEIXEIRA; SOUZA; TEIXEIRA, 2005a), a autoclavagem também reduz o rendimento de produção de meios de cultura no laboratório, em razão do tempo demandado para esse procedimento.

O processo de esterilização por autoclavagem pode acarretar problemas com os carboidratos, contidos no meio de cultura, devido as altas temperaturas, os quais são fundamentais para o crescimento do explante, resultando, inclusive, na formação de compostos que podem ser tóxicos aos tecidos vegetais, como o furfural. Entre as transformações químicas envolvendo os

carboidratos, merece destaque a chamada “reação de Maillard”, devido a frequência com que ocorre e aos efeitos danosos que provoca no desenvolvimento da planta (CHEFTEL.; CHEFTEL, 1992).

A reação de Maillard ocorre, basicamente, na presença de aminoácidos e açúcares redutores através da interação entre a carbonila e os grupos amina livres. A interação do grupo amina do aminoácido com o grupo carbonila do açúcar redutor ocorre através do ataque nucleofílico do par de elétrons do nitrogênio do grupo amina ao grupo carbonila, tendo como produto substâncias denominadas melanoidinas, que são substâncias provenientes da mistura de produtos de vários pesos moleculares. São complexantes de metais e sua cor varia de marrom claro até preto, conforme seu peso molecular (CHEFTEL; CHEFTEL, 1992).

Técnicas alternativas têm sido testadas para a dispensa da autoclavagem do meio em diferentes trabalhos, utilizando diferentes processos, como o micro-ondas (TEIXEIRA; SOUZA; TEIXEIRA, 2005a, TEIXEIRA et al., 2005b), ou uso do hipoclorito de sódio (TEIXEIRA; RIBEIRO; TEIXEIRA, 2006, 2008) e do peróxido de hidrogênio (YANAGAWA et al., 1995). Essas alternativas têm tido sucesso na desinfestação de meios de cultura, porém têm causado problemas de fitotoxicidade, em geral pelos produtos químicos utilizados na esterilização ou por dificuldades durante a realização dos procedimentos.

Desta forma, uma vertente das pesquisas na área de cultura de tecidos tem visado a automação dos laboratórios, o aumento do rendimento das operações e a redução dos custos (AITKEN, KOZAI, TAKAYAMA, 1995; CHU, 1995) que ainda são elevados nos laboratórios comerciais atuais, por se tratarem de instalações pouco diferentes daquelas utilizadas para a realização de pesquisas, nas quais o aspecto econômico é pouco considerado.

1.4 GELIFICANTES

A seleção do agente gelificante é fundamental no cultivo *in vitro* sobre meios nutritivos semi-sólidos, pois estes devem ser firme o suficiente para suportar as plantas sem ser rígido demais para inibir a difusão de água e nutrientes (CID, 2001). A alteração do estado físico do meio de cultura modifica a resistência física e de contato dos explantes com o meio, podendo influenciar no desenvolvimento de plantas *in vitro* (CHEN; ZIV, 2001). Altas concentrações de Agar (resultando em

meios muito consistentes) podem limitar a difusão de nutrientes até o explante (SZABADOS et al., 1991).

A otimização desta fase passa a ser um fator fundamental do processo de produção de material propagativo de alta qualidade fitossanitária e de baixos custos (GUERRA et al., 1999; PINHO, 2003).

O agar é um tipo de agente gelificante para cultura de tecidos produzido por algas, cuja proporção em polissacarídeos pode variar de 50% a 90%, por isso, sua procedência é de grande importância.

A maioria dos trabalhos conduzidos *in vitro* utiliza o Agar como agente gelificante. Apesar de muitas vezes ser considerado biologicamente inerte, o Agar comercial varia de pureza e de poder de gelificação, além do que, como é utilizado em grande quantidade, é normalmente o componente mais caro dos meios de cultura (RIBEIRO et al., 1996). Assim, a função do agar é ser o agente de suporte e regulador osmótico, variando de qualidade e pureza, características diretamente relacionadas com o custo do produto (PIZARRO et al., 1998).

A concentração de agentes gelificantes pode afetar substancialmente a cultura de vários tipos de tecidos, micropropagações, indução de raízes, cultivo de protoplastos e cultivo de anteras (SZABADOS et al., 1991). Caso seja esterilizado em um pH abaixo de 4,5, ocorre a hidrólise do Agar que o impede de polimerizar-se ao esfriar (TORRES; CALDAS; BUSO, 1998). Dependendo da marca, o agente gelificante pode apresentar impurezas, como, bário, sulfato, etc, que podem afetar o crescimento dos explantes (CID, 2001).

Um agente gelificante alternativo do agar utilizado é o Phytigel[®], um heteropolissacarídeo produzido pela bactéria *Pseudomonas elodea*. Quando comparado com o agar, seu custo por litro de meio é menor, em virtude da menor quantidade utilizada, além de ser mais puro (GEORGE, 1993). É um polissacarídeo linear composto de ácido glucurônico, glucose, ramnose, necessitando de cátions monovalentes e bivalentes para gelificação (VERAMENDI et al., 1997). Uma vez que o Phytigel[®] é isolado a partir de um único organismo, ele é altamente purificado e não contém contaminantes (CHEVREAU et al., 1997).

1.5 ISOTIAZOLINONA

A contaminação microbiana é a principal causa de perdas de plantas em laboratórios de cultura de tecidos de plantas (NIEDZ; BAUSHIER, 2002).

Entre os microorganismos mais comuns, os fungos são frequentemente detectados e são altamente prejudiciais, pois crescem vigorosamente no meio nutricional, competindo com as plantas pelos nutrientes do meio, além de produzir metabólitos fitotóxicos (LEIFERT; MORRIS; WAITES, 1994).

Por sua vez bactérias endofíticas podem causar a morte das culturas, retardo de crescimento, necrose e alterações no potencial morfogenético, bem como a redução na taxa de multiplicação *in vitro* e enraizamento (LEVIN et al., 1996). Estas contaminações endógenas mantem as plantas com uma produtividade comercial de baixo potencial, uma vez estabelecidas *in vitro* (SANTOS, 1999; DIAS; RODRIGUES, 2001).

Uma solução possível para este problema seria a adição de substâncias antibióticas no meio de cultura (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Além disso, quando utilizado em concentrações eficazes contra a contaminação, podem ser fitotóxicas e também induzir resistência nos organismos contaminantes (NANNETTI, 1994).

As isotiazolinonas (tanto a clorometil-isotiazolinona como a metil-isotiazolinona) são compostos muito efetivos para a utilização como conservantes. para cosméticos de xampus, condicionadores, géis de cabelo, soluções de tinturas, cremes e loções corporais.

O Kathon[®]CG é o nome comercial da primeira isotiazolinona mista. Foi sintetizada pela indústria química nos meados dos anos 60 e suas principais características são o baixo preço e alta eficiência em baixas concentrações contra bactérias (Gram-positivos e negativos), fungos e algas, características difíceis de encontrar em outros produtos químicos similares, além de ser eficaz em ampla faixa de pH. Sua composição é o resultado da mistura, solúvel em água, dos seguintes ingredientes: 1,5% de ingrediente ativo, 1,13% IM (2-metil-3, 4-isothiazolin-one), 0,37% da MCI (5-cloro-2-metil-4 isotiazolin-3-one), 23% de estabilizadores (nitrato e cloreto de magnésio), 75,5% de água (MARKS et al, 1990). Lemus e Hernández (2007) testaram vários produtos comerciais em atividade bacteriana *in vitro* sendo que o Kathon[®]CG foi eficiente com todas as espécies testadas.

Outro composto que vem sendo usado na cultura de tecidos é o PPM[™] ("Plant Preservative Mixture"), os ingredientes ativos são 5-cloro-2-metil-3-2H-

isotiazolona e 2-metil-3-2H-isotiazolona. É um conservante de amplo espectro e biocida, que mata as bactérias e células de fungos, impede a germinação de esporos, e em concentrações mais elevadas, pode eliminar explantes de contaminação endógena (NIEDZ, 1998).

A complexidade da parede celular das plantas, aparentemente previne as moléculas de PPMTM de ter o mesmo efeito nos tecidos da planta (PLANT CELL TECHNOLOGY, 1998). No entanto, o efeito do PPMTM sobre o metabolismo, aparentemente, pode afetar a capacidade dos explantes de certas espécies a formar brotos adventícios como demonstrado pela a redução significativa na capacidade de regeneração de explantes de crisântemo (GEORGE; TRIPEPI, 2001).

Crompton e Koch (2001) testaram os efeitos de PPMTM na regeneração adventícia em petúnia, embriogênese somática em melão e enbriôgenese em tabaco, e informaram que a eficácia da PPMTM foi em grande parte dependente das espécies de planta analisadas.

1.6 ESTRESSE DE PLANTAS IN VITRO

A micropropagação é uma técnica usada na industria em grande escala para obter plantas axenicadas, mas esta técnica causa estresse as plantas por varias condições em que a planta se encontra, como por exemplo: alta umidade do ar, baixa irradiância, baixa concentração de CO₂, meios de cultura suplementados com açúcares e reguladores de crescimento, uma maneira de observar este estresse é pela determinação da superóxido dismutase (SOD) destas plantas *in vitro* (BAŤKOVÁ, POSPÍŠILOVÁ, SYNKOVA, 2008).

A evolução dos organismos aeróbios que podem sobreviver em ambientes com oxigênio requer um sistema de defesa eficaz contra espécies reativas de oxigênio (ZELKO; MARIANI; FOLZ, 2002).

A superóxido dismutase (SOD) é considerada a primeira linha de defesa contra espécies reativas de oxigênio, por quebrar as moléculas de superóxido e formar moléculas de peróxido, podendo estar relacionada com uma maior produção de fenóis e ligninas nos tecidos vegetais (VOET et al., 2000). Uma resposta padrão ao estresse, biótico ou abiótico, é um aumento na atividade de SOD ou das outras enzimas relacionadas a degradação de espécies reativas ao oxigênio

(GOEL; GOEL, SHEORAN, 2003; FOYER; NOCTOR, 2005; CAKMAK; ATICI; SUNAR, 2010; SAIRAM et al., 2011).

Plantas *in vitro* submetidas a meios contendo reagente que causam estresse, acumulam maior quantidade de prolina (HONG et al. 200)

A prolina é um aminoácido sintetizado a partir do glutamato e da arginina sob condições fisiológicas normais, sendo o glutamato o caminho preferencial sob condições de estresse (CHEN; KAO, 1993). A prolina é acumulada no citoplasma ocorrendo em folhas, colmos e raízes, sendo a capacidade de acúmulo e concentração do aminoácido decrescente com idade da folha (SAWAZAKI; TEIXEIRA; ALMEIDA, 1981).

O acúmulo deste aminoácido está relacionado com uma série de estresses biótico e abióticos (MACHADO NETO et al., 2004; MORAGA; ESCOBAR; VALENZUELA, 2006) sendo utilizado como fonte de carbono e energia ao final do estresse (HOAI et al. 2003).

Também sob a influência do estresse, a síntese de proteínas é inibida e a degradação de proteínas é acelerada, o que leva a um acúmulo de aminoácidos e aminas livres. Uma característica marcante de um distúrbio no metabolismo das proteínas é a mudança nas proporções dos aminoácidos e, frequentemente, um aumento elevado na concentração de prolina (LARCHER, 2000).

REFERÊNCIAS

- AITKEN, C. J.; KOZAI, T.; TAKAYAMA, S. Automation in plant tissue culture general introduction and overview. In: AITKEN, C.J.; KOZAI, T.; SMITH, M.A. L. **Automation and environmental control in plant tissue culture**. London, Kluwer Academic Publishers, p. 1-18, 1995.
- BALL, E. Hydrolysis of sucrose by autoclaving media a neglected aspect in the technique of culture of plant tissues. **Bulletin of the Torrey Botanical Club**, Lancaster, v. 80, n.5, p. 409-411, 1953.
- BAŤKOVÁ, P.; POSPÍŠILOVÁ, J.; SYNKOVA, H. Production of reactive oxygen species and development of antioxidative systems during in vitro growth and ex vitro transfer. **Biologia Plantarum**, v. 52, n. 3, p. 413-422, 2008.
- BURGER, D. W. Guidelines for autoclaving liquid media used in plant tissue culture. **Hort Science**, Alexandria-VA, v. 23, p. 1066-1068, 1988.
- CAKMAK, T.; ATICI, O.; SUNAR, S. Natural aging related biochemical changes in alfafa (*Medicago sativa* L.) seeds stored for 42 years. **International Research Journal of Plant Science**, Turkey, v.1, n.1, p.1-6, 2010.
- CHEFTEL, J.; CHEFTEL, H. **Introduccion a la bioquímica y tecnologia de losalimentos**. 2.ed. Zaragoza: Editora Acribia, p. 339, 1992.
- CHEN, C.; KAO, C. H. Osmotic estress and water estress have opposite effects on putrescine and proline production in excised rice leaves. **Plant Growth Regulation**, Taiwan, v. 13, n.2, p.197-202, 1993.
- CHEN, J.; ZIV, M. The effect of ancymidol on hyperhydricity, regeneration, starch and antioxidant enzymatic activities in liquid-culture Narcissus. **Plant Cell Reports**, Israel, v. 20, n.1, p. 22-27, 2001.
- CHEVREAU, E, et al. Effect of gelling agents and antibiotics on adventitious bud regeneration from in vitro leaves of pear. **In Vitro Cell and Developmental Biology of Plants**, Agers, v.33, n.3, p.173-179, 1997.
- CHU, I. Economic analysis of automated micropropagation. In: AITKEN-CHRISTIE, J.; KOZAI, T.; SMITH, M. A. L. (eds.) **Automation and environmental control in plant tissue culture**. London: Kluwer Academic Publishers, p. 19-28, 1995.
- CID, L. P. B. A propagação in vitro de plantas. O que é isso? Cultura de tecidos vegetais – uma ferramenta fundamental no estudo da biologia moderna de plantas. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v. 3, n. 19, p. 17-21, 2001.
- CROMPTON, M.E.; KOCH, J.M. Influence of plant preservative mixture (PPM™) on adventitious organogenesis in melon, petunia and tobacco. **In Vitro Cellular and Developmental Biology–Plant**, Platteville, v.37, n.2, p.259-261, 2001.

DIAS, M.; RODRIGUES P. H. V. Fontes de explantes e contaminantes isolados em cultivo *in vitro* de helicônia. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v.7, n.2, p.165-168, 2001.

DODDS, J.H.; ROBERTS, L.W. **Experiment in plant tissue culture**. 3 ed. New York: Cambridge University Press, 256 p., 1995.

FIGUEIREDO, S. A. **Influência de reguladores de crescimento e fotoperíodo no crescimento secundário de raízes de *Ipomoea batatas* (L.) Lam. cv. Brazilândia em "branca" em condições *in vitro***. Lavras, Dissertação de mestrado (Mestrado em Agronomia) Universidade Federal de Lavras. 1995.

FOYER, C.H.; NOCTOR, G. Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. **The Plant Cell**, Orsay cedex, v.17, n.7, p.1866–1875, 2005.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture: the technology**. 2. ed. Amsterdam: Exegetics, 574 p, 1993.

GEORGE, M. W.; TRIPEPI, R. R. Plant Preservative Mixture™ can affect shoot regeneration from leaf explants of *Chrysanthemum*, European Birch, and *Rhododendron*. **HortScience**, Moscow, v36, n.4, p.768–769, 2001.

GOEL, A.; GOEL, A.K.; SHEORAN, I.S. Changes in oxidative stress enzymes during artificial ageing in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) seeds. **Journal of Plant Physiology**, Gwalior, v.160, n.9, p.1093-1100, 2003.

GONZÁLEZ, E. A. J. Generalidades del Cultivo *in vitro*. In: Ponce, J. N. P. (ed.) **Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología**. Villa Clara: p. 13-24, 1998.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A Micropropagação In: **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília: Embrapa–CNPq, 864p., 1998.

GUERRA, M. P. et al. Estabelecimento de um protocolo regenerativo para a micropropagação do abacaxizeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Florianópolis, v. 34, n. 9, p. 1557-1563, 1999.

HUAMAN, Z. **Systematic botany and morphology of sweet potato plant**. Lima: International Potato Center, 22p, 1992.

HONG, Z. et al. Removal of feedback inhibition of Δ 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase results in increased proline accumulation and protection of plants from osmotic stress. **Plant physiology**, Ohio v. 122, n. 4, p. 1129-1136, 2000.

LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. São Carlos: RiMa, 531p, 2000.

LEIFERT, C.; MORRIS, C. E.; WAITES, W. M. Ecology of microbial saprophytes and pathogens in tissue culture and field-grow plants: reasons for contamination

problems *in vitro*. **Critical Reviews in Plant Science**, Aberdeen, v.13, n.2, p.139-183, 1994.

LEWTHWAITE, S. L. et al. Cultivar decline in sweetpotato (*Ipomoea batatas*). **New Zealand Plant Protection**, Auckland, v. 64, n., p. 160-167, 2011.

LEMUS, T. M., HERNÁNDEZ, N. M. R.. Evaluación de la actividad antibacteriana de preservos industriales. **Revista CENIC Ciencias Biológicas**, Ciudad de La Habana, v.38, n.1, p 45-48, 2007.

LEVIN, R., et al. *In vitro* multiplication in liquid culture of *Syngonium* contaminated with *Bacillus* spp. and *Rathayibacter tritici*, **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Bet-Dagan, v.45, n.3, p.277-280,1996.

MACHADO NETO, N. B., et al. Water stress induced by mannitol and sodium chloride in soybean cultivars. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Presidente Prudente, v. 47, n. 4, p. 521-529, 2004.

MAGALHÃES, J.S. et al. Indução de embriogênese somática em genótipos de batata-doce. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.24, n.1, p.79-83, 2006.

MANTELL, S. H.; MATTHEWS, J. A.; MCKEE, R. A. **Princípios de biotecnologia em plantas: uma introdução a engenharia genética em plantas**. Ribeirão Preto:SBG,.Cap.5,p.101-158,1994.

MARKS, J.G. et al. Methylchloroisothiazolino-ne/Methylisothiazolinone (Kathon CG) Biocide United. States Multicenter Study of Human Skin Sensitization. **American Journal of Contact Dermatitis**, v.4, n.1, p.157-161, 1990.

MIRANDA, J. E. C.; FRANÇA, F. H.; CARRIJO, O. A. **Batata-doce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.)**. 2.ed. Brasília: CNPH,. (Embrapa-CNPH. Circular técnica, 3). 19p, 1989.

MORAGA S. P.; ESCOBAR, R.; VALENZUELA, A. S. Resistance to freezing in three *Eucalyptus globulus* Labill subspecies. **Electronic Journal of Biotechnology**, Concepción, v.9, n.3, p.310-314, 2006

MORALES, S. R. et al. Las técnicas biotecnológicas, una valiosa herramienta para rescatar el potencial productivo en las raíces y tubérculos tropicales. In: **Anais do III Encontro Latino Americano de Biotecnologia Vegetal**, Cuba, p.52, 1998.

MURILO, D.V. Cultivares de batata-doce. In: **Encontro de professores, pesquisadores e extensionistas do Rio Grande do Norte**, 4. ed, Mossoró. Anais.Mossoró: Escola Superior de Agricultura de Mossoró – ESAM,. p. 27-29, 1990.

NANNETTI, D. C. **Utilização da cultura de tecidos vegetais na micropropagação e manutenção de *Heliconia* sp**. PhD Thesis, High School of Lavras, Lavras, Brasil 1994.

NIEDZ, R. P. Using isothiazolone biocides to control microbial and fungal contaminants in plant tissue cultures. **Hortechology**, Camden Road, v.8 , n.4, p. 598-601,1998.

NIEDZ, R.; BAUSHIER, M. G. Control in vitro contamination of explants from greenhouse and field-grown trees. **In Vitro Cell Development Biology**, Fort Pierce, v.38, n.5, p.468-471, 2002.

OLIVEIRA, A. P. J. et al. Produção de batata-doce e teor de amido nas raízes em função de doses de P2O5. **Acta Scientiarum. Agronomy**, Paraíba, v. 27, n.4, p. 747-751, 2005.

PEIXOTO, N.; MIRANDA, J. E. C. **Cultivo da batata-doce em Goiás**. Goiânia,. (EMGOPA Circular Técnica, 7). 24p. 1984.

PÉREZ, P. A. O. **Introducción a la propagación masiva**. In: Ponce, J. N. P. (ed.) *Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología*. Villa Clara: p. 125-133, 1998.

PINHO, R. S. **Comparação entre ágar e amido como agentes geleificantes na micropropagação de batata-doce *Ipomoea batatas* (L.) Lam.** Dissertação (Mestrado em Agronomia/Horticultura) Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 88p , 2003.

PIZARRO, C. J. et al. Virulent *Brucella abortus* prevents lysosome fusion and is distributed within auto phagosome-like compartments. **Infection and Immunity**, Marseille, v.66, n.5, p.2387-2392, 1998.

PLANT CELL TECHNOLOGY, Inc. 1998. **PPM: A powerful technology to prevent and eliminate microbial contamination in plant tissue culture**. Acessado em 02/07/2012.

RIBEIRO, R. C. S. et al. **Avaliação do amido de mandioca e feijão guandú como agente gelificante alternativo na cultura in vitro de *Arabidopsis thaliana***. In: Anais do I Congresso Latino Americano de Raízes Tropicais e IX Congresso Brasileiro de Mandioca, São Pedro, 07 a 10 de outubro de 1996.

SALLES-FILHO, S. et al. **Estudos em Biotecnologia: Instrumentos de apoio a definição de políticas em biotecnología**, Campinas: MCT/FINEP. 2001.

SANTOS, M.H.L.C. **Avaliação do efeito de bactérias promotoras de crescimento no cultivo *in vitro* e em casa de vegetação de *Heliconia psittacorum* L. F.** PhD Thesis, Federal Rural University of Pernambuco, Recife, Brasil. 1999.

SAWAZAKI, H. E.; TEIXEIRA, J. P. F.; ALMEIDA, L. D. A. Estresse de água no crescimento, produtividade e acúmulo de prolina em feijão. **Bragantia**. Campinas, v.40, p.157-166, 1981.

SAIRAM, R.K. et al. Expression of antioxidant defence genes in mung bean (*Vigna radiata* L.) roots under water-logging is associated with hypoxia tolerance. **Acta Physiologiae Plantarum**, New Delhi, v. 33, n.3, p.735-744, 2011.

SERAFINI, L.A.; BARROS, N.M.; AZEVEDO, J.L. Biotecnologia: princípios e aplicações. In: SERAFINI, L.A.; BARROS, N.M.; AZEVEDO, J.L. (Eds.). **Biotecnologia na agricultura e na agroindústria**. Guaíba: Agropecuária, p. 25–74, 2001.

SILVA, J.B.C.; LOPES, C.A.; MAGALHÃES, J.S. **Cultura da batata-doce (*Ipomoea batatas* L.)**. Brasília: EMBRAPA-CNPq, 2004. (Sistema de produção,n.6).Disponível em:<<http://www.cnpq.embrapa.br/sistprod/batatadoce/index.htm>>. Acesso em: 27/07/2012.

SILVA, J.B.C.; LOPES, C.A.; MAGALHÃES, J.S. **Cultura da batata-doce**. In: CEREDA, M. P. Agricultura: tuberosas amiláceas Latino-Americanas. São Paulo: Cargill, v.2, p.449-503, 2002.

SILVA, S. O. C., SOUZA, A. S., PAZ, O. P. Efeito da multiplicação vegetativa *in vitro* na produtividade de batata-doce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam). **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Cruz das Almas v.3, n.1, p.47-52, 1991.

SMITH, M. K.; DREW, R. A. Current applications of tissue culture in plant propagation and improvement. **Journal Plant. Physiol**, v.17, n.3, p. 267-289, 1990.

STREET, H. E.; LOWE, J. S. The carbohydrate nutrition of tomato roots. II. The mechanism of sucrose absorption by excised roots. **Annals of Botany**, Manchester,v. 14, p. 307-329, 1950.

SZABADOS, L. et al. Agentes gelatinizadores en el cultivo de tejidos. In: ROCA, W. M.; MROGINSKY, L. A. **Cultivo de tejidos en la agricultura**: fundamentos e aplicaciones. Cali. CIAT, p.80-92, 1991.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 719 p, 2004.

TEIXEIRA, S. L. et al. Cultura de tecidos vegetais, pela combinação de esterilizantes químicos e forno de microondas. **Revista Ceres**, Campos dos Goytacazes, v.52, n.301, p.343-349, 2005b.

TEIXEIRA, S. L.; RIBEIRO, J. M.; TEIXEIRA, M. T. Utilização de hipoclorito de sódio na esterilização de meio de cultura para multiplicação *in vitro* de *Eucalyptus pellita* L. **Ciência Florestal**, Campos dos Goytacazes, v.18, n.2, p.185-191, 2008.

TEIXEIRA, S. L.; SOUZA, R. T. S.; TEIXEIRA, M. T. Esterilização de meios nutritivos para cultura de tecidos vegetais em forno de microondas. **Revista Ceres**, Campos dos Goytacazes ,v.52, n.302, p.499-507, 2005a.

TEIXEIRA, S.L.; RIBEIRO, J.M.; TEIXEIRA, M.T. Influence of NaClO on nutrient medium sterilization and on pineapple (*Ananas comosus* cv. *Smooth cayenne*) behavior. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Campos dos Goytacazes, v.86, n.3, p.375-378, 2006.

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**, v.1 e 2. Brasília, Embrapa–CNPq,v.2, 864p, 1998.

TORRES, A. C.; TEIXEIRA, D. M. C. Considerações sobre cultura de tecidos de batata-doce. *ABCTP Notícias*, Brasília, DF, v. 26, p. 6-8, 01 dez. 1996.

VERAMENDI, J. et al. Gelrite as an alternative to agar for micropropagation and microtuberization of *Solanum tuberosum* L. cv. Baraka. **In Vitro Cell and Developmental Biology of Plants**, Pamplona, v.33, n.3, p.195-199, 1997.

YANAGAWA, T. et al. Application of disinfectants to orchid seeds, plantlets and media as a means to prevent in vitro contamination. **Lyndleyana**, v.10, n.1, p.33-36, 1995.

ZELKO, I. N.; MARIANI, T. J.; FOLZ, R. J. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and Ec-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression **Free Radical Biology and Medicine**, Durhan, v. 33, n.3, p. 337–349, 2002.

2 CAPÍTULO I:

UTILIZAÇÃO DE DIFERENTES GELIFICANTES PARA A CULTURA DE MICRO PROPÁGULOS DE BATATA-DOCE

2.1 RESUMO

Utilização de diferentes gelificantes para a cultura de micro propágulos de batata-doce

A cultura da batata-doce é de imenso potencial alimentar, tanto para seres humanos quanto para animais pelo uso de raízes rica em amido e nutrientes, podendo as ramas secas serem aproveitadas na forma de feno. É uma raiz de alto rendimento, que ainda ocupa áreas marginais da agricultura. A propagação é vegetativa utilizando-se ramas ou brotações de raízes para plantio. Porém, isso pode afetar a propagação da espécie, uma vez que tal metodologia pode disseminar doenças. Por sua vez, mudas oriundas de laboratórios se ausentam destas doenças, aumentando a produção, os agentes gelificantes mais utilizados na micropropagação encontra-se o agar e o Phytigel[®]. O objetivo deste trabalho foi de avaliar gelificantes na micropropagação de batata-doce. Um experimento foi montado comparando-se três doses dos gelificantes, agar e Phytigel[®]. Foram avaliados parâmetros de desenvolvimento como comprimento e massa seca, e as taxas de desenvolvimento das plantas *in vitro* e parâmetros bioquímicos como acúmulo de prolina e atividade de superóxido dismutase. A batata-doce não respondeu aos diferentes gelificantes, recomendando-se então o de menor custo.

Palavras-chave: *Ipomoea batatas*, *in vitro*, crescimento.

2.2 ABSTRACT

Use of different gelling agents for sweet potato micro shoots

Sweet potato culture has a high potential for human and animal feeding; and for this last purpose the branches can be used as hay. Is a high yield root, rich in nutrients which occupy marginal crop areas. The propagation is vegetative using branches or shoots from roots, what can affect it by disseminating pathogens. The main objective of this work was to evaluate the effect of gelling agents and a systemic disinfectant in sweet potato tissue culture. An experiment with different doses of gelling agents (Agar and Phytigel[®]) was done using two distinct clones of sweet potato, with yellow or white pulp. Shoot and root, length and dry weight, their development rates; biochemical parameters as proline accumulation and Superoxide Dismutase were evaluated. Sweet potato did not respond to different gelling agents, and the recommendation is to use the low cost effective.

Keywords: *Ipomea batatas*, in vitro, growth.

2.3 INTRODUÇÃO

A batata-doce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) é uma espécie de Convolvulaceae que apresenta consistência herbácea e, embora seja perene, é cultivada como anual. É uma planta de grande importância econômica social, participando no suprimento de calorias, vitaminas e minerais na alimentação humana. As raízes apresentam Ca, K e teor de carboidratos variando entre 25% e 30%, dos quais 98% são facilmente digeríveis (CLARK; MOYER, 1988). É a quarta hortaliça, não folhosa, mais consumida no Brasil. Além de ser rústica, de fácil cultivo, apresenta boa resistência contra a seca e ampla adaptação, sendo cultivada em praticamente todos os estados brasileiros (MIRANDA, 2003). O rendimento médio nacional é menor que 10 toneladas por hectare (500 caixas por ha), enquanto que se pode obter produtividades superiores a 22 toneladas por hectare, quando se utiliza tecnologias como cultivar adequada, época de plantio e, principalmente, irrigação. O declínio da produção e o baixo rendimento da espécie são consequências de ser um cultivo de atividade familiar, não apresentando estruturas adequadas de produção e de comercialização, cultivada como cultura marginal (SILVA et al., 2002). Por se tratar de uma planta de propagação vegetativa, pequenos produtores costumam usar ramas de sua própria localidade, assim acumulado várias doenças inclusive vírus, baixando assim sua produção. Por isso, a importância de baratear o custo de produção de mudas livres de doenças e vírus com a cultura de tecidos, para ter uma maior produção e facilitar o acesso a pequenos produtores.

A cultura de tecidos pode ser definida como o cultivo de todos os tipos de células, tecidos e órgãos da planta, sob condições assépticas. A principal vantagem da micropropagação é a fixação de ganhos genéticos nas populações clonais e a obtenção de um grande número de mudas saudáveis e de alta qualidade em pequeno espaço físico e em curto tempo, independentemente de fatores climáticos limitantes. Consequentemente, a propagação clonal em larga escala de variedades é dependente de uma eficiente capacidade de produção laboratorial (VAZ; NOGUEROLLES, 1981).

Os agentes gelificantes são frequentemente necessários em protocolos de cultivo *in vitro*, considerando que os explantes e plantas obtidas devem ficar

sobre um suporte, para não afundarem. A alteração do estado físico do meio de cultura modifica a resistência física e de contato dos explantes com o meio, podendo influenciar no desenvolvimento de plantas *in vitro* (CHEN; ZIV, 2001). O agente gelificante mais utilizado é o Agar que é um tipo de agente gelificante de natureza polissacarídica (CID, 2001). Normalmente, o Agar é utilizado na faixa de 0,4 a 1,0 % (p/v) para cultura de tecidos de plantas (CALDAS; HARIDASAN; FERREIRA, 1990).

Um agente gelificante alternativo que vem sendo usado na cultura de tecidos é o Phytigel[®], um heteropolissacarídeo produzido pela bactéria *Pseudomonas elodea* (GEORGE, 1993).

Entre os solutos orgânicos que se acumulam no citoplasma em resposta ao estresse, destacam-se a prolina (KUZNETSOV; SHEVYAKOVA, 1997; VIÉGAS; MELO; SILVEIRA, 1999). Em decorrência da sua importância no ajuste osmótico, a prolina é a molécula mais estudada em plantas submetidas a estresses abióticos (HEUER, 1994; MADAN et al., 1995).

A Superóxido-Dismutase (SOD) é uma das principais defesas antioxidantes que atuam nos organismos superiores. Halliwell e Gutteridge (1989) descrevem a SOD como tendo um papel fundamental na defesa do organismo contra as espécies reativas de oxigênio, pois elas atuam na remoção do radical superóxido.

Cada espécie de planta responde diferentemente ao agente gelificante e sua dosagem, contudo é necessário estudos para aperfeiçoar a produção da espécie desejada e obter um baixo custo de produção, pois o agente gelificante é um dos reagentes mais caros para cultura de tecidos.

2.4 MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas duas variedades de batata-doce crioula [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.], de polpa "amarela" (IAPAR 69) e polpa "branca" (APTA 1208), denominadas de "amarela" e "branca".

Com o objetivo de obter segmentos nodais assépticos as batatas foram tratadas como em Hirosse et al. (2012). As ramas obtidas foram lavadas e desinfetadas por uma solução de hipoclorito de sódio (NaClO) comercial a 20% adicionados de 100 µL/L de Triton X-100, por vinte minutos e enxaguados com água destilada e autoclavada, em seguida foram cortados segmentos nodais, com cerca de 4 cm, com uma gema, conforme proposto por Hirosse et al. (2012).

O meio de cultura utilizado foi o MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) com 2 g/L de Phytigel[®], 30 g/L de sacarose e 2 mg/L de glicina, pH ajustado para 5,9 e colocados em frascos de 50 mL em frascos de vidro com capacidade para 270ml e autoclavados 121°C a 1 atm durante 20 min. Foram postos três segmentos nodais por frasco. Em seguida os frascos foram vedados com filme de PVC e colocados em sala de crescimento a 25°C e fotoperíodo de 16 horas onde permaneceram por 35 dias.

As plantas axênicas obtidas foram seccionadas segmentos nodais para o experimento descrito abaixo:

Foram feitos 6 tratamentos com diferentes doses de dois gelificantes: T1= 1,5 g/L de Phytigel[®], T2= 2 g/L de Phytigel[®], T3= 2,5 g/L de Phytigel[®], T4= 6 g/L de Agar, T5= 8 g/L de Agar e T6= 10 g/L de Agar (Agar com 98% de pureza). O meio utilizado foi MS acrescido com 30 g/L de sacarose e 2 mg/L de glicina, pH ajustado para 5,9 e colocados em frascos de 50 mL e autoclavados 121°C a 1,5 atm durante 20 min. Foram postos três segmentos nodais por frasco. Em seguida os frascos foram vedados com filme de PVC e colocados em sala de crescimento a 25°C e fotoperíodo de 16 horas, onde permaneceram por 40 dias.

As variáveis analisadas foram o comprimento da parte aérea e de raiz, número de raízes e nós, massa seca da raiz, de parte aérea e total, taxas de crescimento relativo da raiz, de parte aérea, de massa seca de raiz, de massa seca da parte aérea e de massa seca total, atividade de SOD, e teor de prolina.

Para obtenção do comprimento da parte aérea, comprimento de raiz, massa seca da parte aérea e massa seca de raiz, as amostras foram lavadas com

água destilada para retirar o excesso de meio de cultura. O comprimento da parte aérea e comprimento da maior raiz foi medido com o auxílio de uma régua, e posteriormente o material foi para estufa de secagem a 70°C por 3 dias. Amostras foram guardadas em freezer -80°C para as análises bioquímicas até a utilização.

Para a quantificação da prolina foi utilizado o método proposto por Bates; Walderen e Teare (1973) modificado por Machado Neto et al. (2004), macerando-se de 200 a 300 mg de material fresco, em 5 a 10mL de ácido sulfossalicílico a 3 %. As amostras foram conservadas em freezer -80°C até a utilização. Para a realização das análises 2 mL do material obtido, foram adicionados dois mL de ácido acético glacial e dois mL de solução de ninhidrina ácida. As amostras ficaram a 100°C por 1 h, e posteriormente foram resfriadas em banho de gelo. A leitura foi feita em triplicatas em espectrofotômetro a 520nm. Os valores obtidos foram plotados contra uma curva de calibração de prolina.

Para a análise da atividade de SOD as amostras foram homogeneizadas, em tampão fosfato 0,1M (pH 7,8) gelado, contendo, por litro, 40 g de polyvinylpirrolidona, 3,085g de dithiothreitol e 292mg de EDTA. Foram utilizados 300mg de matéria fresca para 3mL da solução. As amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm durante 20 minutos. Foi retirado o sobrenadante das amostras, e conservadas em freezer -80°C.

Para a leitura adicionou-se 50µL da amostra mais 4,950mL ao tampão fosfato contendo 13 µM riboflavina, 13 mM methionina e 63 µM NBT. As amostras foram submetidas a luz fluorescente por 20 min a 25°C, a leitura foi feita em espectrofotômetro a 560nm. A atividade de SOD é expressa em SOD por mg de proteína. Para a análise de proteína solúvel usou-se o método de Bradford (1973).

O experimento foi conduzido pelo delineamento estatístico inteiramente casualizado, com fatorial de 2x6 sendo 2 variedades de batata-doce e 6 doses de gelificantes, com 6 repetições de 3 plantas cada. Os dados foram avaliados quanto a variância pelo teste F a 5% de significância e a comparação de médias entre as variedades foi feita pelo teste de Scott Knott (P< 0,05). Os dados de número de nós e de raízes foram transformados em $(x+1)^{-1}$. Para os dados de taxas de crescimento relativo foi usada a equação de Hunt (1982) adaptada por Echer et al. (2010):

$$R = \frac{\ln W_2 - \ln W_1}{t_2 - t_1}$$

Sendo: R = taxa de crescimento relativo; \ln = logaritmo neperiano; W_1 = comprimento ou massa inicial; W_2 = comprimento ou massa final; t_1 = tempo inicial e t_2 = tempo final. Para as análises foi utilizado o programa Sisvar conforme sugerido por Ferreira et al. (2011).

2.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As análises de plantas de batata-doce cultivadas sobre diferentes agentes gelificantes revelam que as variáveis : massa seca da parte aérea, massa seca total, taxa de crescimento relativo da massa seca de raiz, taxa de crescimento relativo de massa seca da parte aérea, taxa de crescimento relativo de massa seca total, teor de proteína e superóxido dismutase que não foram significativas para interação entre doses de gelificantes x variedades, variedades e dose.

As respostas das plantas aos agentes gelificantes podem variar de acordo com a espécie vegetal ou mesmo entre genótipos de uma mesma espécie (BERRIOS et al., 1999; BURGOS, ALBUQUERQUE, 2003).

Chacon et al. (2000) testaram diferentes doses de Agar e Phytigel[®] em duas espécies diferentes *Dioscorea alata* e *D. trifida* obtendo diferença significativa para os parâmetros em comprimento da parte aérea e massa seca entre as dosagens 1,3; 1,8 e 2,3 g/L de Phytigel[®] e 7, 8 e 9 g/L de Agar, ambas as variedades foram analisada separadamente. Para cada espécie o comportamento com agentes gelificantes é diferente. Não houve interferência do agente gelificante para batata-doce para as variáveis da tabela 1.

De acordo com a Tabela 1, nota-se que não há interferência das doses dos agentes gelificantes, houve apenas diferença significativa entre os as variedades nos parametros analisados de: comprimento da parte aérea, comprimento de raiz, massa seca de raiz e taxa de comprimento relativo de raiz.

A variedade "branca" (Tabela 1) em média teve um melhor desempenho em todas as variáveis analisadas quando comparada a variedade "amarela".

A variedade "amarela" teve um menor comprimento de parte aérea que a variedade "branca" (> 49%), (> 40%) menor em comprimento de raiz, (> 18%) a menos em massa seca de raiz e (> 17%) menor de taxa de crescimento relativo de raiz.

TABELA1- Análise de plantas de duas variedades de batata-doce cultivada sobre meio MS.

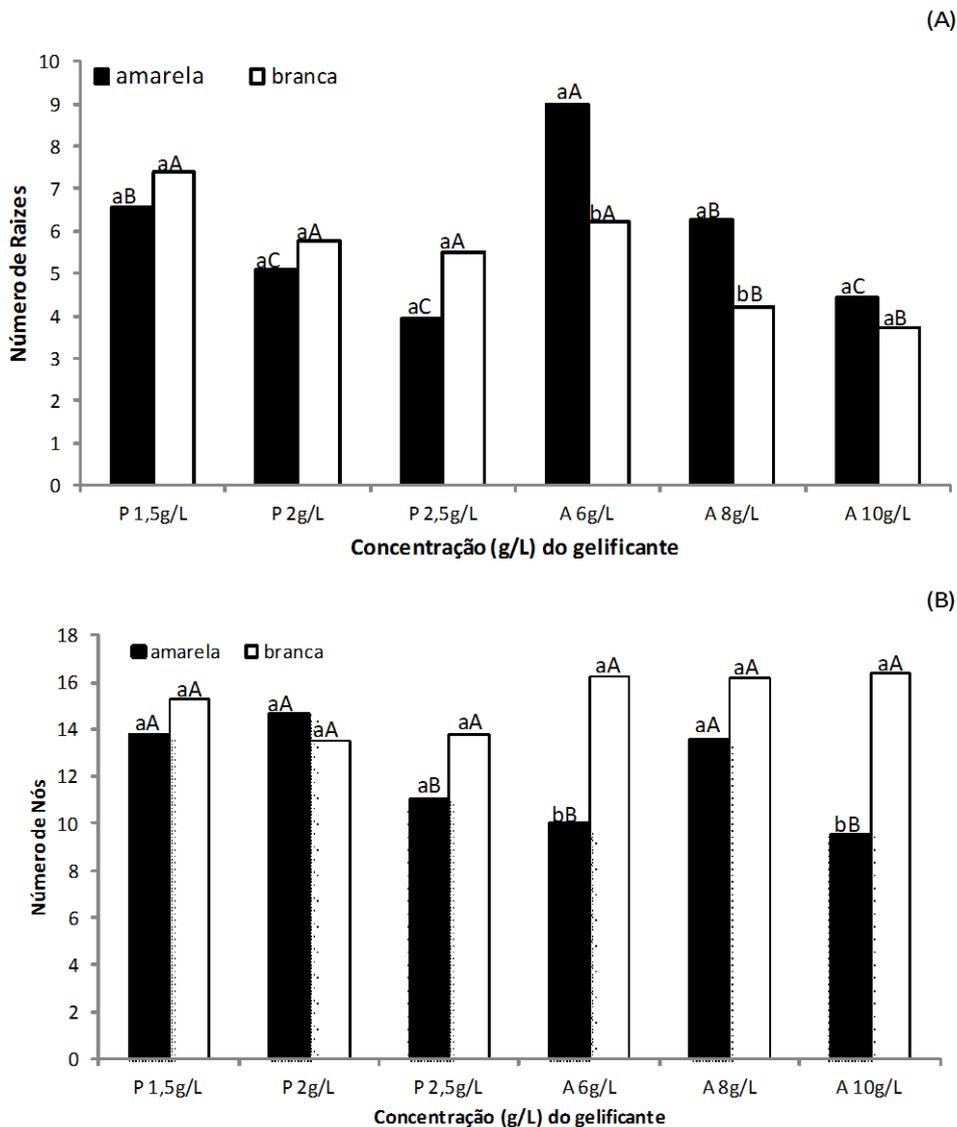
	Médias
Comprimento da parte aérea (cm)	
"branca"	9,28 a
"amarela"	4,18 b
Comprimento de raiz (cm)	
"branca"	25,69 a
"amarela"	15,58 b
Massa seca de raiz (mg)	
"branca"	0,022 a
"amarela"	0,018 b
Taxa de comprimento relativo de raiz (cm/dia)	
"branca"	0,081 a
"amarela"	0,067 b

A variedade "amarela" teve o maior número de raízes em 6 g/L de Agar e o menor número em 2,5 g/L de Phytigel[®], com um decréscimo de mais de 56% (Figura 1A). A variedade "branca" teve o maior número de raízes em de 1,5 g/L de Phytigel[®] e o menor número em 10 g/L de Agar, com aproximadamente 50% de decréscimo.

O número de raízes em concentrações mais elevadas de agente gelificante diminui, atribuído a menor aeração e difusão de metabólitos tóxicos, (PAIVA; PASQUAL; PAIVA, 1999). Sob a ação de ambos os agentes gelificantes, com o aumento das doses, houve uma redução do número de raízes para as duas variedades de batata-doce (Figura 1A).

Em relação a número de nós (Figura 1B) a variedade "amarela" teve o maior número em 2 g/L de Phytigel[®] e o menor número em 10 g/L de Agar, com um decréscimo de mais de 34%. Para a variedade "branca" o maior número de nós ocorreu na dose de 10 g/L de Agar, e o menor número em 2 g/L de Phytigel[®] com mais de 17% de decréscimo, assemelhando-se a Pasqual et al. (2012) ao cultivar embriões imaturos de tangerineira "Poncã", submetido a altas concentrações de Agar.

FIGURA 1 - Número de raízes (A), número de nós (B), com seis doses de gelificantes, em duas variedades de batata-doce.



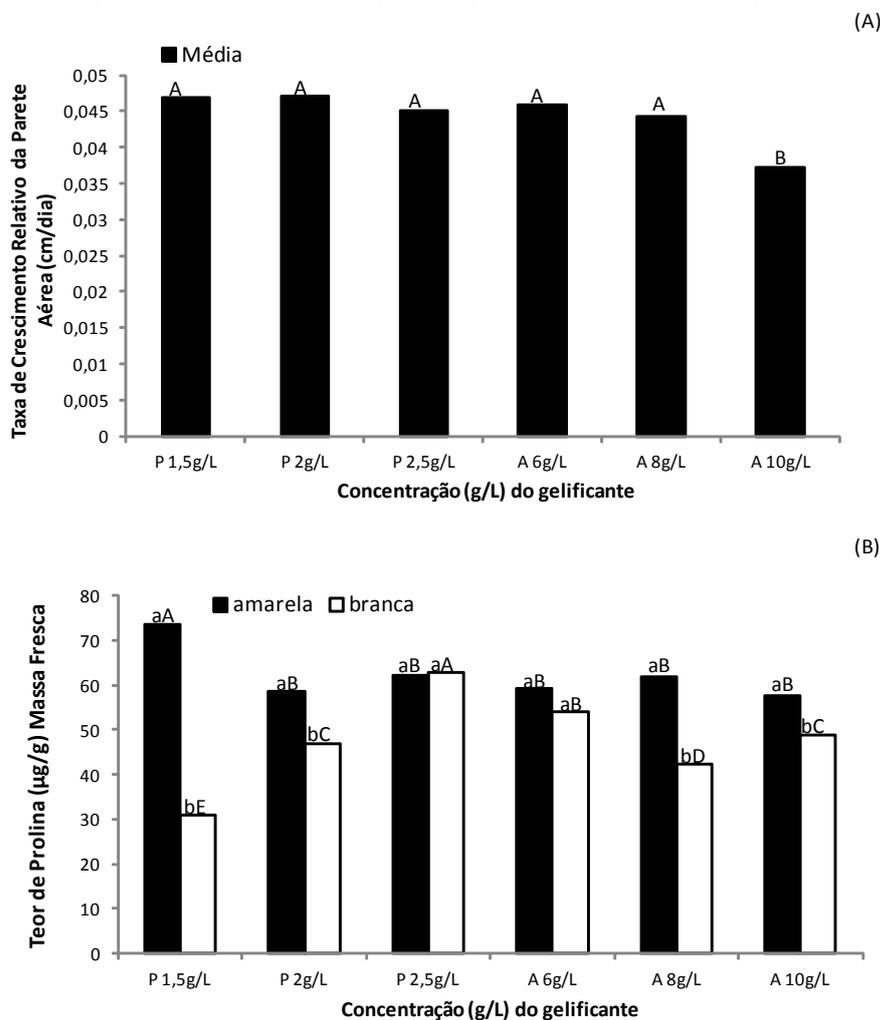
Letras minúsculas diferem variedades dentro do tratamento. Letras maiúsculas diferem tratamentos entre si. Equação para regressão para variáveis número de raízes: y (branca) = $-0,637x + 7,693$. $R^2 = 0,790^{**}$ e y (amarela) = $-0,145x^2 + 0,958x + 4,727$. $R^2 = 0,050^{ns}$. Números de nós: y (amarela) = $-0,732x + 14,70$. $R^2 = 0,395^{**}$. e y (branca) = $0,450x + 13,67$. $R^2 = 0,428^{**}$

De acordo com a Figura 2A observa-se que ocorreu somente diferença na última média da dose para taxa de crescimento relativo da parte aérea (TCRPA) (Figura 2A), sob ação do gelificante Agar, em sua dose mais elevada, possivelmente a limitação e disponibilidade de água e absorção de nutrientes.

O maior teor de prolina (Figura 2B) para a variedade "amarela" ocorreu na dose de 1,5 g/L de Phytigel[®] e o menor teor em 10 g/L de Agar com um decréscimo de mais de 21%. Para a variedade "branca" o maior teor de prolina ocorreu na dose de 2,5 g/L de Phytigel[®] e o menor teor em 1,5 g/L de Phytigel[®] com um decréscimo de mais de 101% (Figura 2B).

Altas concentrações de agente gelificante, ou meios muito consistentes, podem limitar a difusão de nutrientes até o explante (ROMBERGER; TABOR, 1971). Segundo Paiva.; Pasqual; Paiva (1999), a concentração do agente gelificante no meio de cultura deve ser mantida o mais baixo possível, tendo observado que alta concentração de agente gelificante limitou o crescimento, pela redução na disponibilidade de água e absorção de nutrientes, na propagação *in vitro* de crisântemo.

FIGURA 2 - Taxa de crescimento relativo do comprimento da parte aérea (A). Teor de prolina (B), com seis doses de gelificantes; em duas variedades de batata-doce.



Letras minúsculas diferem variedades dentro do tratamento. Letras maiúsculas diferem tratamentos entre si. Equação para regreção das variáveis Taxa de crescimento relativo do comprimento da parte aérea: y média = $-0,000x^2 + 0,002x + 0,044$ $R^2 = 0,875^*$. Teor de prolina: y amarela = $0,927x^2 - 8,562x + 78,10$ $R^2 = 0,619^*$, y branca = $-2,787x^2 + 21,41x + 14,94$ $R^2 = 0,617^*$

Observa-se na Tabela 2 que apesar do Agar com qualidade para análises laboratoriais tem um valor de comércio médio menor (R\$ 725,00 / Kg) do que o Phytigel® (R\$1028,00 / Kg), porém devido a quantidade usada para a gelificação do meio, o uso do Phytigel® é a solução mais econômica, o agar tem um

aumento de mais 250%, comparado ao Phytigel[®], pela menor quantidade usada o Phytigel[®] torna-se mais barato e com a vantagem de conter menos impurezas.

TABELA 3- Custo do gelificante usado em cada tratamento.

Tratamento	Dose g/L	Custo/L (R\$)	Custo por frasco de 50 mL (R\$)
Agar	6	4,35	0,2175
	8	5,8	0,29
	10	7,25	0,3625
Phytigel [®]	1,5	1,542	0,0771
	2	2,056	0,1028
	2,5	2,57	0,1285

Fonte www.sigmaaldrich.com/brazil, comparando o preço do produto Agar: A1296 microbiology tested, plant cell culture tested, cell culture tested, powder (1Kg) e Phytigel[®]: P8169 Bio Reagent, plant cell culture tested, powder (1Kg).

2.6 CONCLUSÕES

Há pouca diferença entre os agentes gelificantes Phytigel[®] e agar para o cultivo *in vitro* de micropropágulos de batata-doce.

O Phytigel[®] tem preço menor em virtude da quantidade usada para a gelificação do meio, e contém menos impurezas, sendo seu uso recomendado nesta etapa de propagação.

Altas concentrações dos agentes gelificantes (2 e 2,5 g/L de Phytigel[®], 8 e 10g/L de agar) diminuí o número de raízes de micro propágulos de batata-doce.

REFERÊNCIAS

- BATES, L. S.; WALDEREN, R. P.; TEARE, I.D. Rapd determination of free proline four water stress studies. **Plant and Soil**, Manhattan, v.39, n.1, p. 205-207, 1973.
- BERRIOS, E. F. et al. Influence of genotype and gelling agents on in vitro regeneration by organogenesis in sunflower. **Plant cell, tissue and organ culture**, Castanet, v. 59, n. 1, p. 65-69, 1999.
- BRADFORD, M. M.; et al, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, Athens, v. 72, n.1, p. 248–254, 1976.
- BURGOS, L.; ALBURQUERQUE, N. Ethylene inhibitors and low kanamycin concentrations improve adventitious regeneration from apricot leaves. **Plant Cell Reports**, Murcia, v. 21, n. 12, p. 1167-1174, 2003.
- CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP/Embrapa-CNPq, p.37-70,1990.
- CHEN, J.; ZIV, M. The effect of ancymidol on hyperhydricity, regeneration, starch and antioxidant enzymatic activities in liquid-culture Narcissus. **Plant Cell Reports**, Rehovot, v. 20, n.1, p. 22-27, 2001.
- CID, L. P. B. A propagação in vitro de plantas. O que é isso? Cultura de tecidos vegetais – uma ferramenta fundamental no estudo da biologia moderna de plantas. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v. 3, n. 19, p. 17-21, 2001.
- CLARK C. A.; MOYER J. W. **Compendium of sweet potato diseases**. Saint Paul: APS Press. 74p.,1988.
- ECHER F. R.; et al. Estresse hídrico induzido por manitol em cultivares de algodão **Revista Ciência Agrônômica**. Presidente Prudente, v. 41, n.4, p. 638-645, 2010.
- FERREIRA, D. F. SISVAR:. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011.
- GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture: the technology**. 2. ed. Amsterdam: Exegetics, 574 p, 1993.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in Biology and Medicine**. Oxford: Clarendon Press. 543 p. 1989.
- HEUER, B. Osmoregulatory role of proline in water and salt stress plants. In: PESSARAKLI, M. **Handbook of plant and crop stress**. New York: Marcel Dekker, cap. 17, p.363-381, 1994.

HUNT, R. **Plant growth curves: the functional approach to plant growth analysis**. London: Edward Arnold, 248p, 1982.

KUZNETSOV, V. V.; SHEVYAKOVA, N. I. Stress response of tobacco cells to high temperature and salinity. Proline accumulation and phosphorylation of polypeptides. **Physiologia Plantarum**, Moscow, v.100, n.2, p.320-326, 1997.

MACHADO-NETO, N. B, et al. Proline: use as an indicator of temperature stress in bean seeds. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Presidente Prudente, v. 4, n. 3, p. 330-337, 2004.

MADAN, S.; et al. Proline and proline metabolising enzymes in in-vitro selected NaCl-tolerant *Brassica juncea* L. under salt stress. **Annals. Botany**, Hisar, v. 76, n.1, p. 51-57, 1995.

MIRANDA, J. E. C. Batata-doce. EMBRAPA-CNPq. Disponível em <<http://www.cnpq.embrapa.br/cultivares/batata-doce.htm>>. Acesso em: 03 jun. 2012. 2003.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Madison, v.15, n.3, p. 473-497, 1962.

ROMBERGER, J. A.; TABOR, C. A. The *Picea abies* shoot apical meristem in culture. I. Agar and autoclaving effects. **American Journal of Botany**, Beltsville, p. 131-140, 1971.

SIGMA ALDRICH. Disponível em <http://www.sigmaldrich.com/brazil.html/> acessado em 04/08/2012.

PAIVA, P.D.O.; PASQUAL, M.; PAIVA, R. Efeito de concentrações de ágar e níveis de pH na propagação in vitro de crisântemo. **Revista Ceres**, Lavras, v. 46, p. 141-148, 1999.

PASQUAL, M. et al. Cultivo in vitro de embriões imaturos de tangerineira 'Poncã' em função do pH e da concentração de ágar. **Revista Brasileira de Agrociência/Current Agricultural Science and Technology**, Lavras, v. 8, n. 3, 2012.

SILVA, J. B. C.; LOPES, C. A.; MAGALHÃES, J. S. **Cultura da batata-doce**. In: CEREDA, M. P. Agricultura: tuberosas amiláceas Latino-Americanas. São Paulo: Cargill, v.2, p.449-503, 2002.

VAZ, R. L.; NOGUEROLES, J. **Micropropagação e influência do tempo de permanência em meio contendo floroglucinol no enraizamento de brotos apicais de pessegueiro e macieira**. In: congresso brasileiro de fruticultura, 12., 1981, Recife. Anais. Recife: SBF, p.1160-1165. 1981.

VIÉGAS, R. A.; MELO, A. R. B.; SILVEIRA, J. A. G. Nitrate reductase activity and proline accumulation in cashew in response to salt (NaCl) shock. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Fortaleza, v.11, n.1, p.21-28, 1999.

3 CAPÍTULO II:

USO DE KATHON[®]CG PARA CULTIVO DE MICROPROPÁGULOS DE BATATA-DOCE

3.1 RESUMO

Uso de kathon[®]CG para cultivo de micropropágulos de batata-doce

Batata-doce é uma raiz de alto rendimento e rico em nutrientes, mas ocupa áreas marginais da agricultura. A propagação é vegetativa utilizando-se ramos ou brotações de raízes para plantio. Esta pratica pode afetar a propagação de espécies, uma vez que tal metodologia pode disseminar doenças. O objetivo deste trabalho foi avaliar um desinfetante sistêmico na cultura de tecido de batata-doce. Mudanças oriundas de laboratórios são isentas destas doenças, porém é uma pratica dispendiosa, o uso de autoclave requer tempo e custo. Para isso dois experimentos foram montados, uma curva de doses de isotiazolinonas e a recuperação dos explantes em meio sem isotiazolinonas. Foram avaliados parâmetros de desenvolvimento como comprimento e massa seca, e as taxas de desenvolvimento das plantas *in vitro* e parâmetros bioquímicos como acúmulo de prolina e atividade de Superóxido Dismutase. O Kathon[®]CG provocou redução no crescimento nas diferentes concentrações. O retorno ao meio sem o Kathon[®]CG promoveu incremento no crescimento das plantas.

Palavras-chave: esterilização, *Ipomea batatas*, *in vitro*

3.2 ABSTRACT

Kathon[®]CG use for sweet potato micro shoot in vitro cultivation

Sweet potato culture is a high yield root, rich in nutrients which occupy marginal crop lands. The propagation is vegetative using branches or shoots from roots, what can affect it by disseminating pathogens. The main objective of this work was to evaluate the effect of gelling agents and a systemic disinfectant in sweet potato tissue culture. Two experiments were done; one with a response curve of isothiazolinones (Kathon[®]CG) and other a recovering the explant submitted to Kathon[®]CG to a medium without it. Shoots and roots Length and dry weight, their development rates; biochemical parameters as proline accumulation and Superoxide Dismutase were evaluated. The Kathon[®]CG caused reduced growth in different concentrations. The return to the medium without Kathon[®]CG improved the plantlet growth.

Keywords: sterilization, *Ipomea batatas*, *in vitro*

3.3 INTRODUÇÃO

A batata-doce [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.], pertencente a família Convolvulaceae, é uma hortaliça tuberosa de grande adaptação, que apresenta, dentre outras características, um germoplasma com grande diversidade genotípica e fenotípica (PEIXOTO; MIRANDA, 1984). A batata-doce é propagada vegetativamente, via estacas, retiradas de genótipos selecionados, e a qualidade fitossanitária destes propágulos no campo de produção de batata-doce depende da qualidade fitossanitária do material utilizado para propagação. Por essa razão, a batata-doce pode acumular, entre gerações de multiplicação, diversos patógenos, principalmente vírus. Uma das estratégias para contornar a limitação de produção de mudas com alta qualidade fitossanitária é o uso de métodos *in vitro* de propagação. Foram desenvolvidas técnicas alternativas de cultivo de partes da planta de batata-doce *in vitro*, assim, tornou-se possível a micropropagação *in vitro* desta espécie através de explantes de folhas, pecíolo, limbos, nós, entrenós, pedaços de raízes, ápices, brotos, pedaços de ramas e meristemas. Este último propágulo é empregado quando se busca a “limpeza” de vírus e outros patógenos (SILVA; SOUZA; PAZ, 1991).

A cultura de tecidos de plantas, também conhecida como cultivo *in vitro* ou micropropagação, é baseado na totipotencialidade das células, que é a capacidade de partes das plantas se regenerarem, dando origem a uma plantas com a mesma genética da planta doadora do tecido vegetal. Dodds e Roberts (1995) relatam que se utilizam meios nutritivos determinados para que as plantas se desenvolvam no cultivo *in vitro*, com formulações que seguem as necessidades de cada vegetal. A clonagem vegetal apresenta importantes benefícios para os processos industriais, principalmente por permite a homogeneização da matéria-prima, otimizando o processo produtivo, o que, conseqüentemente, permite a redução nos custos de produção (BORÉM, 2007).

Dentre os procedimentos aplicados a cultura *in vitro* está a esterilização de vidrarias e soluções nutritivas para os quais utiliza-se via de regra a autoclave. A autoclavagem é um procedimento que utiliza altas temperaturas (121°C) e pressão (1 kgf cm⁻²) por períodos de 15 a 30 minutos, para eliminação de microrganismos no meio de cultura e no recipiente de cultivo das plantas (TORRES;

CALDAS; BUSO, 1998). Além de elevar os custos de produção das mudas micropropagadas pelo alto consumo energético das autoclaves (TEIXEIRA; SOUZA; TEIXEIRA, 2005a), a autoclavagem também reduz o rendimento de produção de meios de cultura no laboratório, em razão do tempo demandado para esse procedimento.

Técnicas alternativas a autoclavagem têm sido testadas em diferentes trabalhos, em procedimentos físicos, como o micro-ondas (TEIXEIRA; SOUZA; TEIXEIRA, 2005a., TEIXEIRA et al., 2005b), químicos, com uso do hipoclorito de sódio (TEIXEIRA; RIBEIRO; TEIXEIRA, 2006, 2008) e do peróxido de hidrogênio (YANAGAWA et al., 1995). Essas alternativas têm tido sucesso na desinfestação de meios de cultura, porém têm causado problemas de fitotoxicidade, em geral pelos produtos químicos utilizados na esterilização ou por dificuldades no uso dessas técnicas. Algumas destas técnicas relatam que é preciso ter alguns cuidados com o ambiente onde o meio é autoclavado, como desinfestação de vidrarias com hipoclorito e local onde o meio é dispensado (TEIXEIRA; RIBEIRO; TEIXEIRA, 2008).

Outro método utilizado para a eliminação de microorganismo contaminante e o biocida, Kathon[®]CG (KCG) é o nome comercial da primeira isotiazolinona mista, cujas principais características são o baixo preço e alta eficiência em baixas concentrações contra bactérias (Gram-positivos e negativos) fungos e algas, características difíceis de encontrar em outros produtos químicos similares é eficaz em amplo espectro de pH. O uso da isotiazolinona como esterilizante de meio de cultura é, geralmente, como um auxiliar no meio de cultura para ajudar na descontaminação endógena dos explantes, sem a dispensa da autoclavagem (GEORGE; TRIPEPI, 2001; JIMÉNEZ et al., 2006; VOLK; RICHARDS, 2006; LEMUS, E HERNÁNDEZ, 2007).

Com o uso de uma substância estranha no meio de cultura, como o biocida, pode causar um estresse nas plantas. Dentre os solutos orgânicos que se acumulam no citoplasma em resposta ao estresse, destaca-se a prolina (KUZNETSOV; SHEVYAKOVA, 1997; VIÉGAS; MELO; SILVEIRA, 1999). O acúmulo deste aminoácido está relacionado com uma série de estresses biótico e abióticos (MACHADO NETO et al., 2004; MORAGA; ESCOBAR; VALENZUELA, 2006) sendo utilizado como fonte de carbono e energia ao final do estresse (HOAI et al. 2003). Para este tipo de estresse químico, o uso de isotiazolinona *in vitro* não

há trabalhos relacionando acúmulo de prolina ou mesmo alterações na atividade de superóxido dismutase (SOD).

A Superoxido-Dismutase é uma das principais defesas antioxidantes que atuam nos organismos superiores. Esta ligada como a primeira linha de defesa das células e a falha na regulação desta pode levar a desestruturação celular e morte do tecido (GREGGAINS et al., 2000).

O objetivo deste trabalho foi testar a eficácia do Kathon[®]CG como esterilizante de meio de cultura e, avaliar seus efeitos no crescimento dos explantes durante a exposição ao químico bem como ao tratamento de recuperação, onde as plantas foram cultivadas em meio sem o produto.

3.4 MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas três variedades de batata-doce crioula [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.], de polpa amarela (IAPAR 69), polpa branca (APTA 1208) e uma crioula de polpa roxa, denominadas de "amarela", "branca" e "roxa".

Para obtenção de explantes da batata-doce, foram processadas como em Hlrosse et al. (2012). O meio de cultura utilizado foi o MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) com 2 g/L de Phytigel[®], 30 g/L de sacarose e 2 mg/L de glicina, o pH foi ajustado para 5,9, e dispensados em alíquotas de 50 mL em frascos de vidro com capacidade para 270ml e autoclavados 121°C a 1 atm durante 20 min. Foram postos três segmentos nodais por frasco. Os quais vedados com filme de PVC e colocados em sala de crescimento a 25 ± 3 °C e fotoperíodo de 16 horas por 35 dias.

As plantas axênicas, que se originaram deste primeiro trabalho, foram doadoras dos segmentos nodais para os experimentos a seguir:

Utilizou-se o meio de cultura MS, como descrito acima suplementados com 156, 312, 624 e 1248 µL/L de Kathon[®]CG. Os meios com o Kathon[®]CG foram vedados com filme de pvc e mantidos sem autoclavagem, o mesmo se aplica aos frascos, nos quais foram somente lavados com água e sabão. Os segmentos nodais, axênicos, acima obtidos foram colocados sobre o meio com os tratamentos e cultivados como descritos anteriormente.

Posteriormente as plantas cultivadas foram repicadas em meios sem Kathon[®]CG e mantidas nas mesmas condições de cultivo, por outros 37 dias.

As variáveis analisadas foram o comprimento da parte aérea e de raízes, número de raízes e de nós, massa seca da raiz, taxas de crescimento relativo de raiz, da parte aérea, da massa seca de raiz, massa seca da parte aérea e atividade de SOD, proteína solúvel e teor de prolina.

Para obtenção do comprimento da parte aérea, comprimento de raiz, massa seca da parte aérea e massa seca de raiz, as amostras foram lavadas com água destilada para retirar o excesso de meio de cultura. O comprimento da parte aérea e comprimento de raiz (maior raiz) foi medido com o auxílio de uma régua, e posteriormente o material transferido para estufa de secagem a 70°C por 3 dias.

Partes das amostras foram guardadas em freezer -80°C para as análises bioquímicas.

A quantificação da prolina foi realizado pelo método de Bates; Walderen e Teare (1973) modificado por Machado Neto et al. (2004). Macerou-se de 200 a 300 mg de material fresco, em 10 mL de ácido sulfossalicílico a 3 %. As amostras foram conservadas em freezer -80°C. Retirou-se 2mL do material obtido, adicionando-se 2 mL de ácido acético glacial e 2mL de solução de ninhidrina ácida. As amostras foram incubadas a 100°C por 1 h, e imediatamente resfriadas em banho de gelo. A leitura foi feita em triplicatas em espectrofotômetro a 520nm. Os resultados obtidos foram plotados contra uma curva de calibração e expressos em microgramas de prolina por g de material fresco.

Para a análise da atividade de SOD as amostras foram homogeneizadas, em tampão fosfato 0,1M (pH 7,8) gelado, contendo de 4 g de polyvinylpirrolidona, 308,5mg de dithiothreitol e 29,2mg de EDTA por litro. Foram utilizados 300mg de matéria fresca para 3mL da solução. As amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm durante 20 min. Foi retirado o sobrenadante das amostras o qual foi conservada em freezer a -80°C.

Para a leitura adicionaram-se 50µL da amostra mais 4,950mL ao tampão fosfato contendo 13 µM riboflavina, 13 mM methionina e 63 µM NBT. As amostras foram submetidas a luz fluorescente por 20 min a 25°C, a leitura foi feita em espectofotômetro a 560nm (LEI et al., 2005). A atividade de SOD é expressa em unidade de SOD por mg de proteína. O teor de proteína solúvel das amostras foi padronizado pelo método de Bradford (1973).

Para os dados de taxas de crescimento relativo foi usada a equação de Hunt (1982) adaptada por Echer et al. (2010).

$$R = \frac{\ln W_2 - \ln W_1}{t_2 - t_1}$$

Sendo; R = taxa de crescimento relativo; ln = logaritmo neperiano; W_1 = comprimento ou massa inicial; W_2 = comprimento ou massa final; t_1 = tempo inicial e t_2 = tempo final.

O experimento foi conduzido pelo delineamento estatístico inteiramente casualizado, em um fatorial de 3x5; sendo 3 variedades de batata-doce e 5 doses de Kathon[®]CG, com 6 repetições com 3 expantes cada. Os dados foram

avaliados quanto à variância pelo teste F a 5% de significância, a comparação de médias entre as variedades foi feita pelo teste de Scott Knott ($P < 0,05$) e análise de regressão ($P < 0,05$) para as doses, onde consideraram-se as equações significativas de menor grau e com o maior coeficiente de determinação (R^2). Os dados relativos de número de nós e de raízes foram transformados em $(x+1)^{-1}$. Para as análises foi utilizado o programa Sisvar (FERREIRA, 2011).

3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os ensaios revelam que o uso de doses menores que 1 mL de Kathon[®]CG não foi eficiente, havendo contaminação de 100% dos explantes.

Para a variável comprimento da parte aérea (CPA) dos segmentos nodais que passaram pelos tratamentos com as doses de Kathon[®]CG (Figura 1A), na dose zero, o clone amarelo apresentou o melhor resultado.

Com o uso de 156 µL/L de Kathon[®]CG todas as variedades apresentaram diminuições no CPA, sendo as mais sensíveis as variedades "branca" (> 71%) e a "roxa" (> 75%). Para a dose de 312 µL/L de Kathon[®]CG o efeito foi o mesmo, porém havendo um grande decréscimo (> 63%) para a variedade "amarela".

Com o uso de 1248 µL/L de Kathon[®]CG todas as variedades apresentaram um decréscimo (> 90%) em relação a dose zero.

No tratamento de recuperação, com o uso de autoclave, os segmentos nodais da variedade "amarela" que passaram pelo tratamento com as doses de Kathon[®]CG (Figura 1B) a testemunha foi a que obteve o maior CPA. Segmentos nodais da variedade "branca" que passaram pelo tratamento com a dose de 624 µL/L de Kathon[®]CG tiveram um maior crescimento (> 6%) que a testemunha. Segmentos nodais da variedade "roxa" que passaram pelo tratamento com a dose de 156 µL/L de Kathon[®]CG obtiveram maior crescimento (> 4%), e em 312 µL/L um maior crescimento (> 20%).

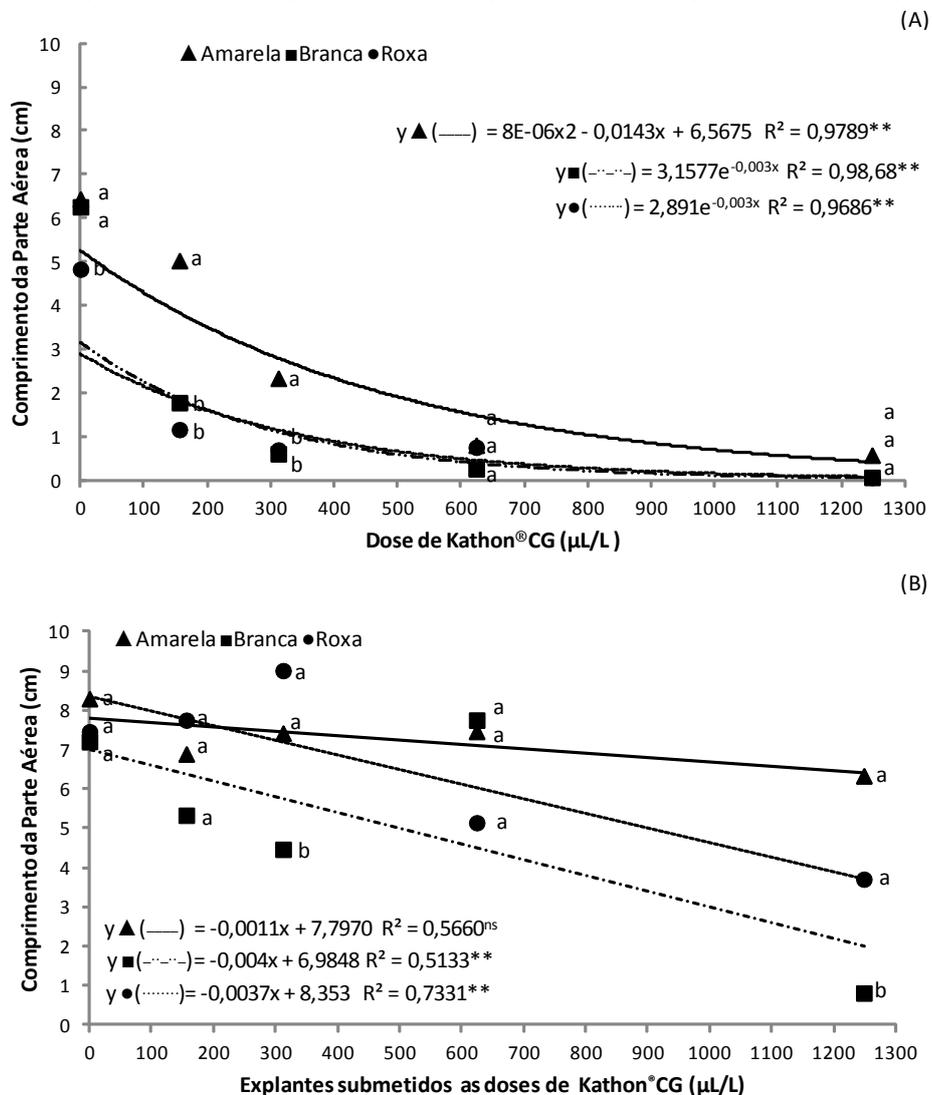
O Kathon[®]CG é o primeiro composto comercial misto de isotiazolinonas (MARKS et al., 1990), as quais são conservantes de amplo espectro e biocidas, matando bactérias e células de fungos, impedindo a germinação de esporos, e em concentrações mais elevadas, podendo eliminar contaminação endógena de explantes (NIEDZ, 1998).

George e Tripepi (2001) usando o Plant Preservative Mixture[™] (que contém a mistura de duas isotiazolinonas como o Kathon[®]CG) observaram uma redução de 97% em formação de rebentos a partir de folhas de crisântemo. Resultados semelhantes aos observados foi observada esta redução de crescimento em segmentos nodais de batata-doce na Figura 1A.

Em relação aos explantes iniciais, a exceção dos tratamentos de 1248 µL/L, houve uma equivalência ou até uma melhora no desempenho de todos os cultivares. Isto pode ser devido a toxidez do Kathon[®]CG aos microorganismos

endofíticos e que podem ser patogênicos diminuindo o crescimento das plantas. Com a eliminação destes as plantas podem alocar melhor as reservas e crescer mais vigorosamente. Todavia, na dose mais elevada a toxidez pode ter atingido de maneira mais grave as organelas (mitocôndrias e cloroplastos) afetando negativamente o crescimento dos explantes.

FIGURA 1 - Comprimento da parte aérea (CPA) (A) de explantes de três variedades de batata-doce no meio de cultura com quatro doses de Kathon®CG e a testemunha. CPA (B) de explantes que foram submetidos aos tratamentos e depois transferidos para meio de cultura sem Kathon®CG.



O comprimento de raiz (CR) dos segmentos nodais submetidos as doses de Kathon®CG (Figura 2A) apresentou desempenho similar ao relatado para o CPA.

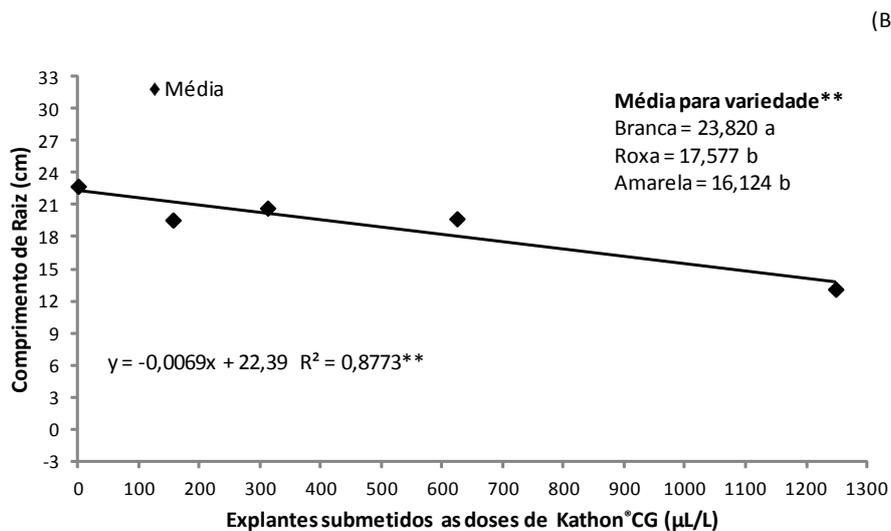
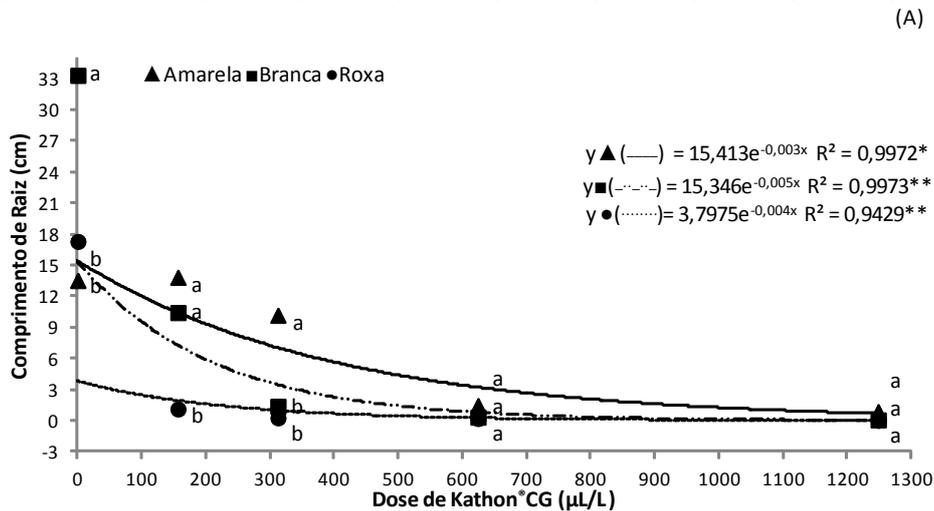
Todas as variedades apresentaram queda nos comprimentos radiciais com o incremento das doses de Kathon[®]CG. A variedade "roxa" apresentou uma grande redução (> 93%) já na primeira dose do produto. As variedades "branca" e "amarela" apresentaram reduções mais drásticas nas doses superiores. Na maior dose (1248 µL/L) todas as variedades apresentaram crescimento quase nulo.

Entretanto ao serem transferidas para o meio sem Kathon[®]CG o crescimento das raízes foi superior para as variedades "amarela" e "roxa" (Figura 2B). Comparadas a testemunha da Figura 2A, a média do CR da variedade "amarela" aumentou (> 16%). A variedade "roxa" aumentou (> 1,5%). A variedade "branca" teve um decréscimo (> 28%). Em 1248 µL/L a média das variedades diminuiu cerca de 42%. Doses elevadas de Kathon[®]CG afetam o crescimento do sistema radicular da planta quando transferida para o meio com aoutoclave.

Kneifel e Leonhardt (1992) descrevem que o uso de um antibiótico isolado não afeta o crescimento de explantes. Todavia, quando misturado ao Kathon[®]CG reduziu o crescimento de raízes de *Spatiphyllum* e *Nephrolepis exaltata*. Para a variedade "amarela" na dosagem de 156 e 312 µL/L (Figura 2A) observa-se que não houve interferência significativa no crescimento. Para as variedades "branca" e "roxa" na primeira dose de Kathon[®]CG apresenta uma queda brusca em seu CR.

Apesar do declínio linear no tamanho das raízes das plantas que passaram pelo tratamento com Kathon[®]CG o (Figura 2B) a diminuição do tamanho das raízes não interferiu na altura da parte aérea nas doses que melhor se mostrou para cada variedade (Figura 1B).

FIGURA 2 - Comprimento de raiz (CR) (A) de explantes de três variedades de batata-doce no meio de cultura com quatro doses de Kathon®CG e a testemunha. CR (B) de explantes que foram submetidos aos tratamentos e depois transferidos para meio de cultura sem Kathon®CG.



A variedade "amarela" (Figura 3A) se sobressai em número de raízes (NR) na testemunha, apresentando um NR (> 49%) em relação a variedade "branca" e (> 74%) em relação a variedade "roxa".

O NR das plantas que foram submetidas aos tratamentos com as doses de Kathon®CG (Figura 3A) em 156 µL/L o biocida não interferiu significativamente no NR para as variedades.

Em 1248 $\mu\text{L/L}$ a variedade "amarela" teve uma redução de ($> 77\%$) em NR. A variedade "branca" e "roxa" teve um decréscimo ($> 90\%$).

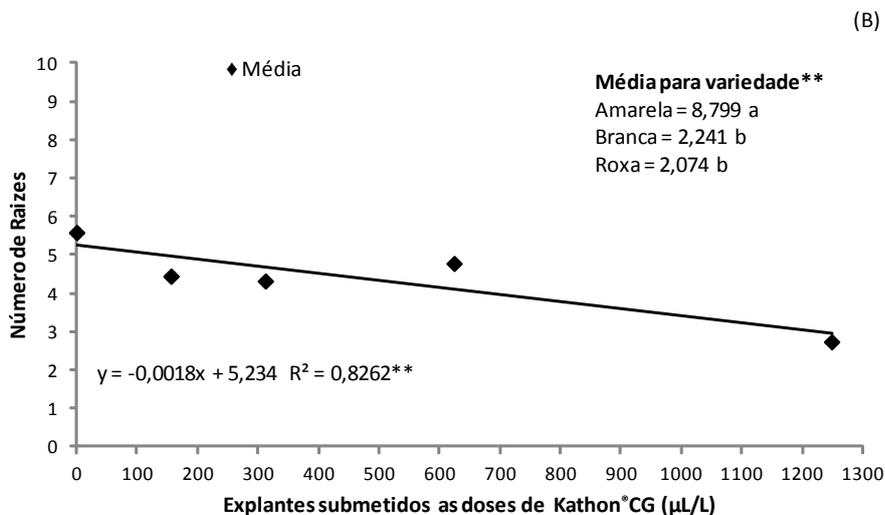
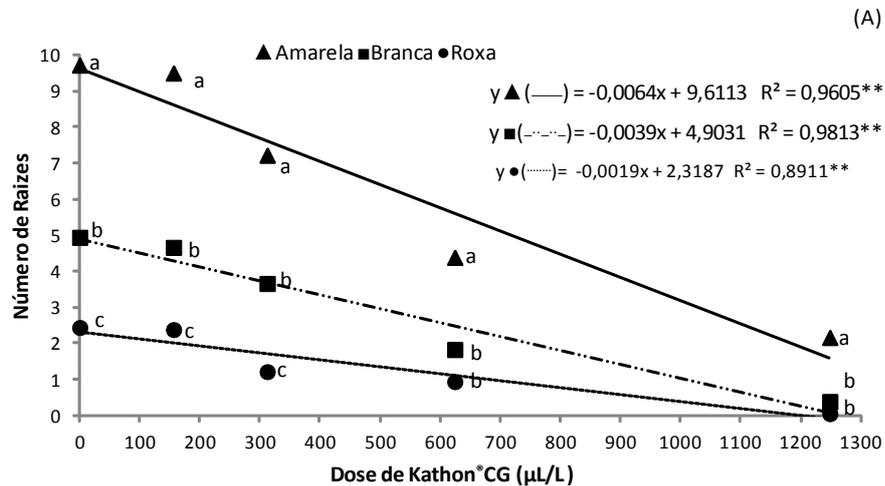
A variedade que foi menos prejudicada em seu NR pelo Kathon[®]CG foi a variedade "amarela", cujos segmentos nodais conseguiram emitir mais de 2 raízes mesmo na dose mais alta do biocida.

No tratamento de recuperação dos segmentos nodais que passaram pelas doses de Kathon[®]CG não houve interação, foi significativo apenas para doses e variedade (Figura 3B). A variedade "amarela", em média, teve um maior NR ($> 74\%$) que a variedade "branca" e ($> 78\%$) que a variedade "roxa".

Ao incremento das doses, decresce o seu NR em todas as doses de Kathon[®]CG, da testemunha a dose de 1248 $\mu\text{L/L}$ houve um decréscimo ($> 51\%$).

Mesmo que o NR dos segmentos nodais que passaram pelos tratamentos com o Kathon[®]CG mostra-se reduzido, não afetou significativamente o CPA (Figura 1B) e o CR (Figura 2B) da variedade "amarela".

FIGURA 3 - Número de raízes (NR) (A) de explantes de três variedades de batata-doce no meio de cultura com quatro doses de Kathon®CG e a testemunha. NR (B) de explantes que foram submetidos aos tratamentos e depois transferidos para meio de cultura sem Kathon®CG.



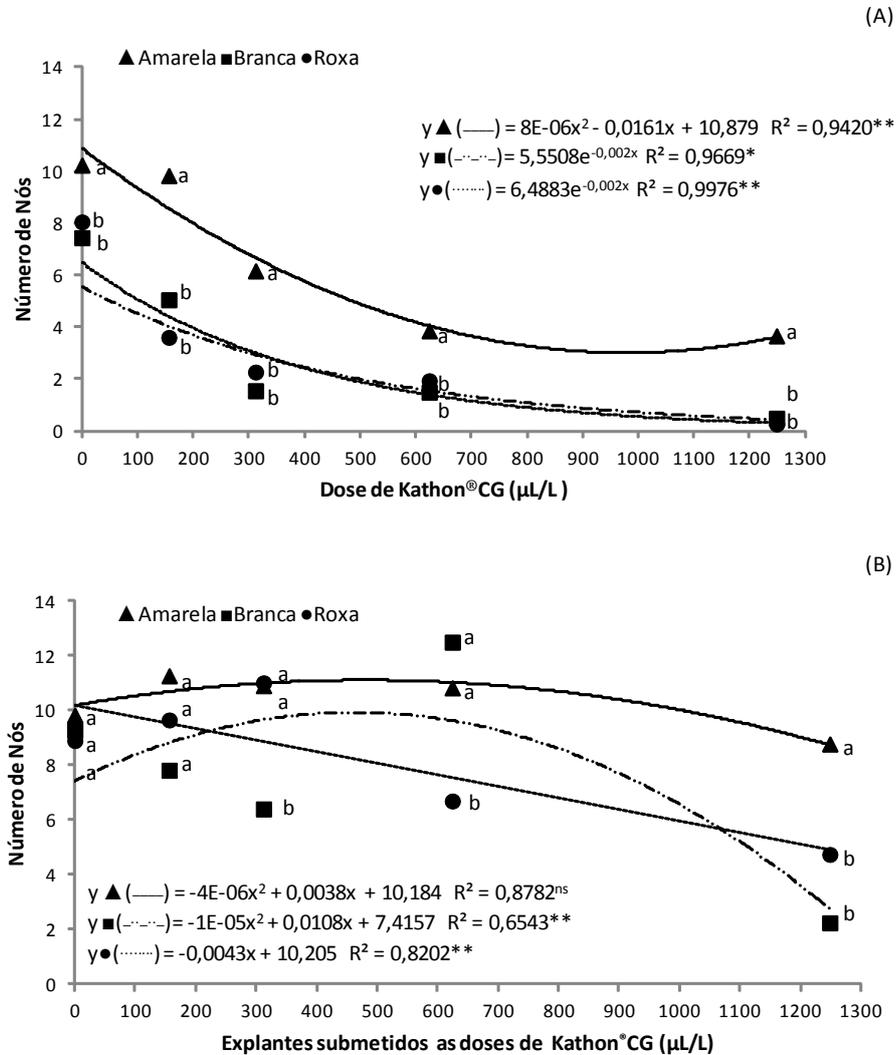
A variedade "amarela" (Figura 4A) se sobressai as outras variedades em número de nós (NN), apresentou um NN (> 27%) em relação a variedade "branca", e (> 21%) em relação a variedade "roxa", no tratamento testemunha.

O NN das plantas que foram submetidas aos tratamentos com as doses de Kathon®CG, em 156 $\mu\text{L/L}$ a variedade "amarela" diminui o seu NN (> 3%), em 1248 $\mu\text{L/L}$ (> 64%). A variedade "branca" em 156 $\mu\text{L/L}$ diminui (> 32%), em 1248 $\mu\text{L/L}$ (> 93%). A variedade "roxa" em 156 $\mu\text{L/L}$ decresce (> 55%) e em 1248 $\mu\text{L/L}$ (> 96%).

Ao incremento das doses de Kathon[®]CG a variedade "amarela" é a que teve a menor porcentagem de decréscimo de NN do que as outras variedades. Pelo fato de ter um CPA (Figura1A) maior que as outras variedades.

Os segmentos nodais da variedade "amarela" que passaram pelo tratamento com as doses de Kathon[®]CG (Figura 4B), tiveram um aumento de NN nas doses de 156, 312 e 624 $\mu\text{L/L}$ de Kathon[®]CG de até 14,5%, comparada a testemunha, entretanto não houve diferença significativa entre os tratamentos. A variedade "branca" teve um aumento no seu NN em 624 $\mu\text{L/L}$ de (> 34%). A variedade "roxa" teve um aumento no seu NN em 156 $\mu\text{L/L}$ (> 8%) e em 312 $\mu\text{L/L}$ (> 23%).

FIGURA 4 - Número de nós (NN) (A) de explantes de três variedades de batata-doce no meio de cultura com quatro doses de Kathon[®]CG e a testemunha. NN (B) de explantes que foram submetidos aos tratamentos e depois transferidos para meio de cultura sem Kathon[®]CG.



Não houve interação para massa seca da parte aérea (MSPA) nos segmentos nodais submetidos as doses de Kathon[®]CG. Sendo significativo apenas para doses e variedade, não havendo interação (Figura 5A).

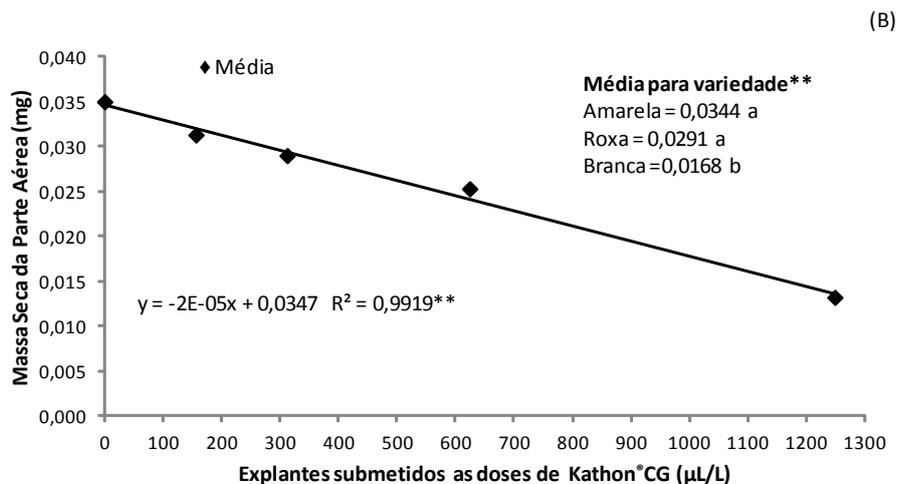
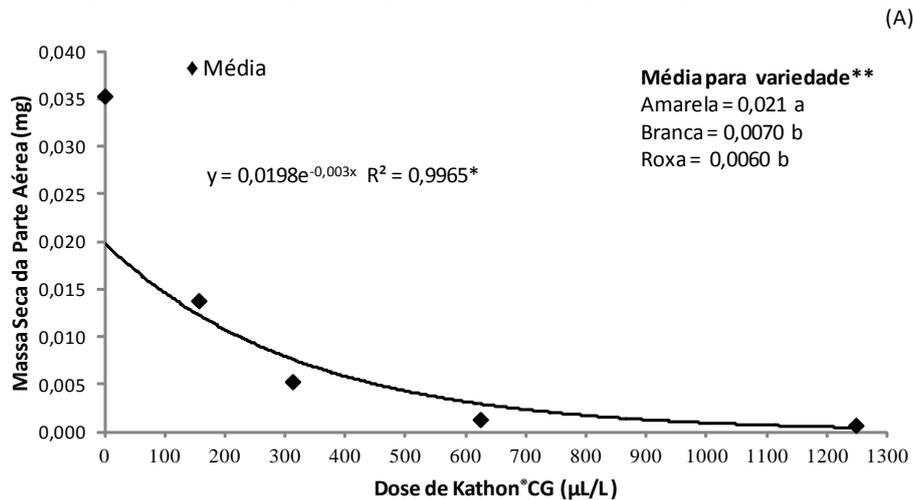
A média da MSPA da variedade "amarela" foi (> 66%) que a variedade "branca" e (> 71%) que a variedade "roxa". A variedade "amarela" teve um maior CPA do que as outras variedades ao incremento das doses de Kathon[®]CG (Figura 1A), portanto também teve um maior acúmulo de MSPA.

Ao incremento das doses de Kathon[®]CG da testemunha a dose de 156 µL/L de Kathon[®]CG, a média da MSPA decresce (> 60%), já na última dose de Kathon[®]CG a média teve um acúmulo de MSPA quase nulo.

Não houve interação (Figura 5B) para a recuperação dos segmentos nodais que passaram pelas doses de Kathon[®]CG em MSPA. Foi significativo apenas para doses e variedade. A variedade "amarela", em média, teve uma maior MSPA que a variedade "branca" (> 51%) e (> 15%) que a variedade "roxa".

A média para tratamento decresce a sua MSPA em todas as doses de Kathon[®]CG, da testemunha a dose de 1248 µL/L decresce (> 62%). Entretanto somente houve diferença significativa na última dose.

FIGURA 5 - Massa seca da parte aérea (MSPA) (A) de explantes de três variedades de batata-doce no meio de cultura com quatro doses de Kathon[®]CG e a testemunha. MSPA (B) de explantes que foram submetidos aos tratamentos e depois transferidos para meio de cultura sem Kathon[®]CG.



Na Figura 6A em massa seca de raiz (MSR) a variedade "branca" teve um maior acúmulo (> 31%) que a variedade "amarela", (> 77%) que a variedade "roxa", na testemunha.

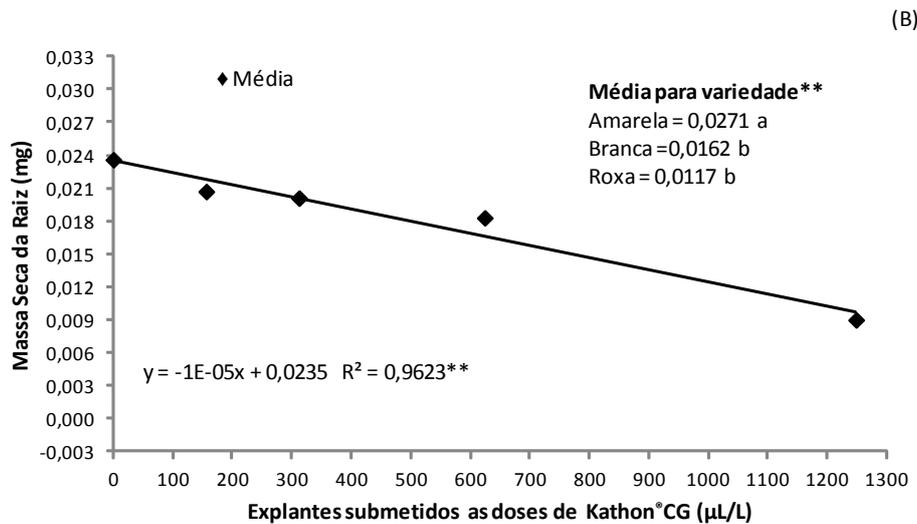
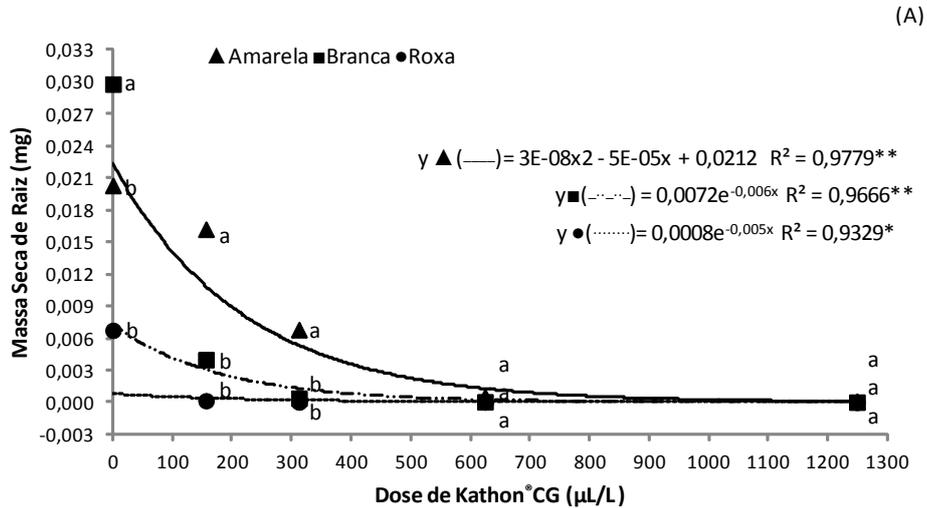
Em 156 µL/L Kathon[®]CG, a variedade "amarela" decresce (> 20%), a variedade "branca" (> 89%) e a variedade "roxa" decresce (> 97%). Em 1248 µL/L foi quase nulo a MSR.

A variedade "amarela" se mostrou mais resistente as 2 primeiras doses de Kathon[®]CG do que as outras variedades.

Não houve interação (Figura 6B) para os segmentos nodais que passaram pelas doses de Kathon[®]CG em MSR. Foi significativo apenas para doses e variedade. A variedade "amarela", em média, teve uma maior MSR que a variedade "branca" (> 40%) e (> 56%) que a variedade "roxa".

A média para dose decresce a sua MSR em todas as doses de Kathon[®]CG, da testemunha a dose de 1248 µL/L decresce (> 61%). Todavia somente houve diferença significativa na última dose.

FIGURA 6 - Massa seca de raiz (MSR) (A) de explantes de três variedades de batata-doce no meio de cultura com quatro doses de Kathon[®]CG e a testemunha. MSR (B) de explantes que foram submetidos aos tratamentos e depois transferidos para meio de cultura sem Kathon[®]CG.



Na testemunha (Figura 7A) as variedades, "amarela" e "branca" se sobressai na taxa de crescimento relativo de parte aérea (TCRPA) em relação a "roxa", a variedade "roxa" teve um decréscimo de (> 19%) em relação a "amarela" e (> 9%) em relação a "branca".

Em 156 µL/L sob a ação de Kathon[®]CG, a variedade "amarela" teve um decréscimo menor em relação as outras variedades (> 12%), a variedade

"branca" (> 91%), e a variedade "roxa" (> 84%). Nas doses de 624 e 1248 $\mu\text{L/L}$ a TCRPA foi praticamente nula.

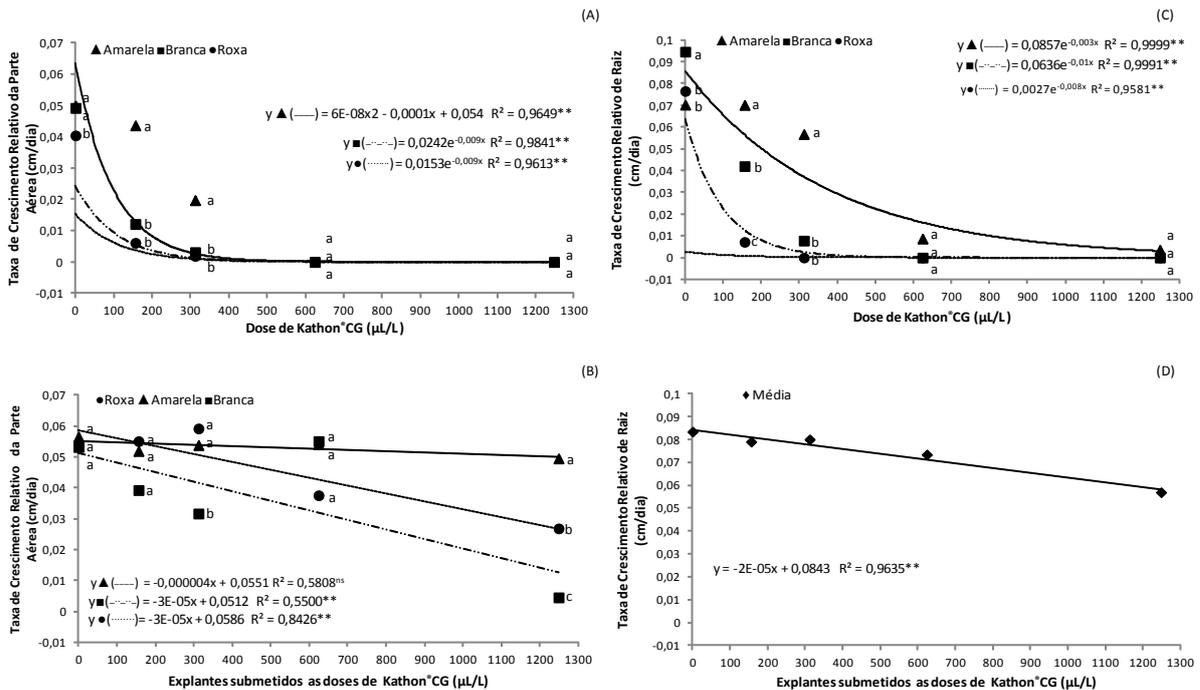
Para os segmentos nodais que foram submetidos as doses de Kathon[®]CG (Figura 7B) não houve interferência do biocida para a variedade "amarela". A variedade "branca" teve a sua maior TCRPA em 624 $\mu\text{L/L}$ (> 3%) que a testemunha. A variedade "roxa" teve uma maior TCRPA em 156 $\mu\text{L/L}$ (> 1,5%) e em 312 $\mu\text{L/L}$ (> 8,5%), comparadas a testemunha.

Na testemunha (Figura 7C) a variedade "branca" tem um melhor desempenho na taxa de crescimento relativo de raiz (TCRR) que a variedade "amarela" (> 25%), e (> 19%) que a variedade "roxa".

Ao incremento do incremento das doses de Kathon[®]CG, a variedade "amarela" tem um melhor desempenho que as demais, em 156 $\mu\text{L/L}$ teve um pequeno decréscimo comparada as outras variedade (< 1%), a variedade "branca" (> 55%), e a variedade "roxa" (> 90%). Em 1248 $\mu\text{L/L}$ a TCRR é quase nula para todas as variedades.

As análises estatísticas revelam que não ocorreu interação significativa entre TCRR das variedades de batata doce e doses de Kathon[®]CG dos segmentos nodais que passaram pelos tratamentos com o Kathon[®]CG (Figura 7D). A média para dose decresce a sua TCRR em todas as doses de Kathon[®]CG, da testemunha a dose de 1248 $\mu\text{L/L}$ decresce (> 31%). Entretanto somente houve diferença significativa na ultima dose.

FIGURA 7 - Taxa de crescimento relativo de comprimento da parte aérea (TCRCPA) (A), de explantes de três variedades de batata-doce no meio de cultura com quatro doses de Kathon[®]CG e a testemunha. TCRPA (B) TCRCR (D) de explantes que foram submetidos aos tratamentos e depois transferidos para meio de cultura sem Kathon[®]CG.



Na taxa de crescimento relativo de massa seca da parte aérea (TCRMSPA) a variedade "amarela" (Figura 8A) teve um melhor desempenho que a variedade "branca" (> 22%), e (> 13%) que a variedade "roxa", na testemunha.

Em 156 μL/L a variedade "amarela" decresce (> 9%), variedade "branca" (> 67%) e a variedade "roxa" (> 81%). Em 1248 μL/L a TCRMSPA é quase nulo para todas as variedades.

Não houve interação (Figura 8B) para os segmentos nodais que passaram pelas doses de Kathon[®]CG em TCRMSPA. Foi significativo apenas para doses e variedade. A variedade "amarela", em média, teve uma maior TCRMSPA que a variedade "branca" (> 44%) e (> 7%) que a variedade "roxa".

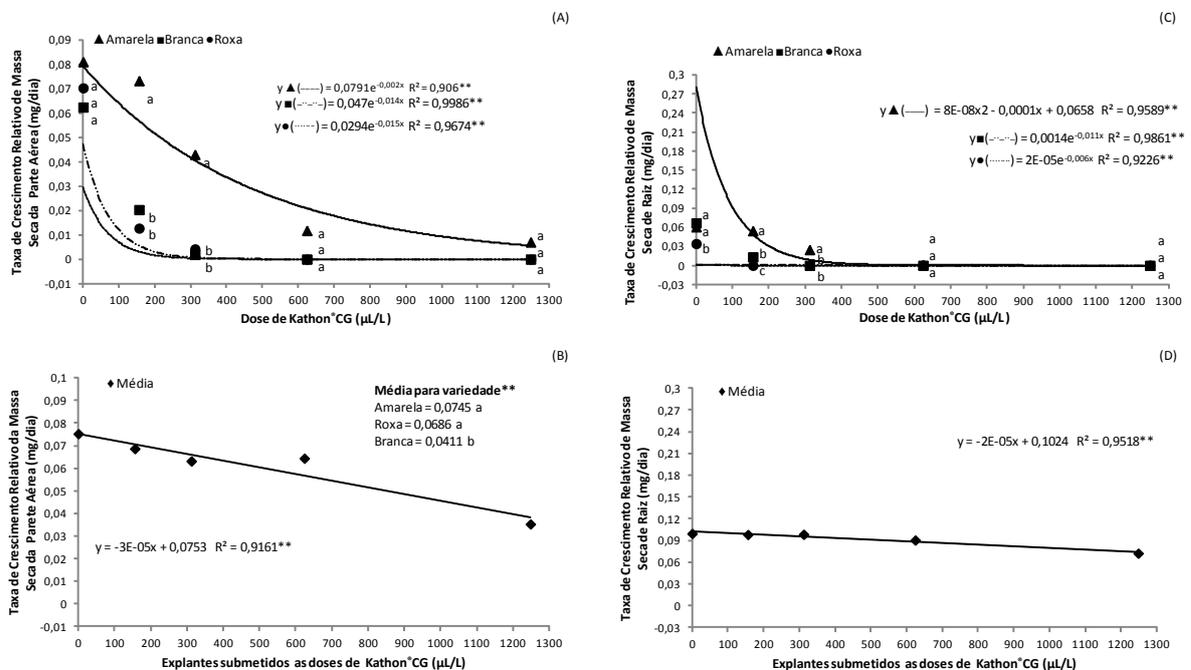
Da testemunha a dose de 1248 μL/L a média para dose decresce (> 53%). Entretanto somente houve diferença significativa na ultima dose.

Na testemunha a taxa de crescimento relativo de massa seca de raiz (TCRMSR) (Figura 8C) a variedade "roxa" teve um pior desempenho (> 43%) em relação a "amarela" e (> 48%) em relação a "branca".

Com o incremento das doses de Kathon[®]CG, a variedade "amarela" em 156 µL/L teve um decréscimo (> 10%), a variedade "branca" (> 80%), e a variedade "roxa" a redução foi de quase 100%. Na ultima dose a redução da TCRMSR foi quase nula para todas as variedades.

Não foi significativo (Figura 8D) para interação e variedade para TCRMSR dos segmentos nodais que passaram pelos tratamentos com o Kathon[®]CG. A média para dose em TCRMSR, da testemunha a dose de 1248 µL/L decresce (> 27%). Entretanto somente houve diferença significativa na ultima dose

FIGURA 8 - Taxa de crescimento relativo de massa seca da parte aérea (TCRMSPA) (A), taxa de crescimento relativo de massa seca de raiz (TCRMSR) (C) de explantes de três variedades de batata-doce no meio de cultura com quatro doses de Kathon[®]CG e a testemunha. TCRMSPA (B) TCRMSR (D) de explantes que foram submetidos aos tratamentos e depois transferidos para meio de cultura sem Kathon[®]CG.

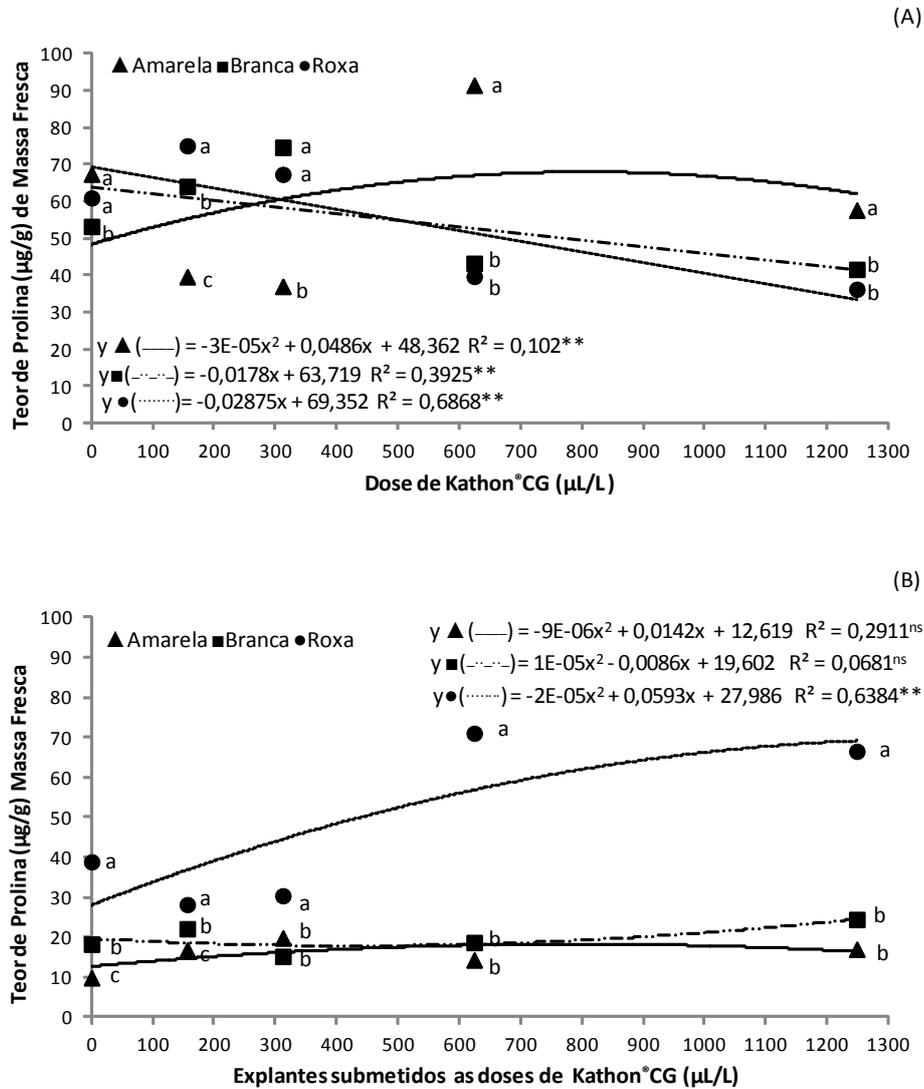


Na Figura 9A, na testemunha a variedade "amarela" teve o maior acúmulo de prolina (> 20%) que a variedade "branca" e (> 9%) que a variedade "roxa". Variedade "roxa" teve o maior acúmulo de prolina que a variedade "branca" (> 12%).

Ao incremento do incremento das doses de Kathon[®]CG, a variedade "amarela" tem o seu menor acúmulo em 312 µL/L (> 45%), seu maior acúmulo foi em 624 µL/L (> 35%), comparada a testemunha. A variedade "branca" teve seu maior acúmulo em 312 µL/L (> 26%), e seu menor acúmulo em 1248 µL/L (> 22%), comparada a testemunha. A variedade "roxa" teve seu maior acúmulo em 156 µL/L (> 23%), e seu menor acúmulo em 1248 µL/L (> 40%), comparada a testemunha.

Para os segmentos nodais que foram submetidos as doses de Kathon[®]CG (Figura 9B), a variedade "amarela" aumenta o seu teor de prolina em todas as doses de Kathon[®]CG. A variedade "branca" teve um decréscimo em 312 µL/L (> 16%). A variedade "roxa" teve um decréscimo em 156 µL/L (> 27%), e em 312 µL/L (> 21%) comparada a testemunha.

FIGURA 9 - Teor de prolina (A) de explantes de três variedades de batata-doce no meio de cultura com quatro doses de Kathon®CG e a testemunha. Teor de prolina (B) de explantes que foram submetidos aos tratamentos e depois transferidos para meio de cultura sem Kathon®CG.



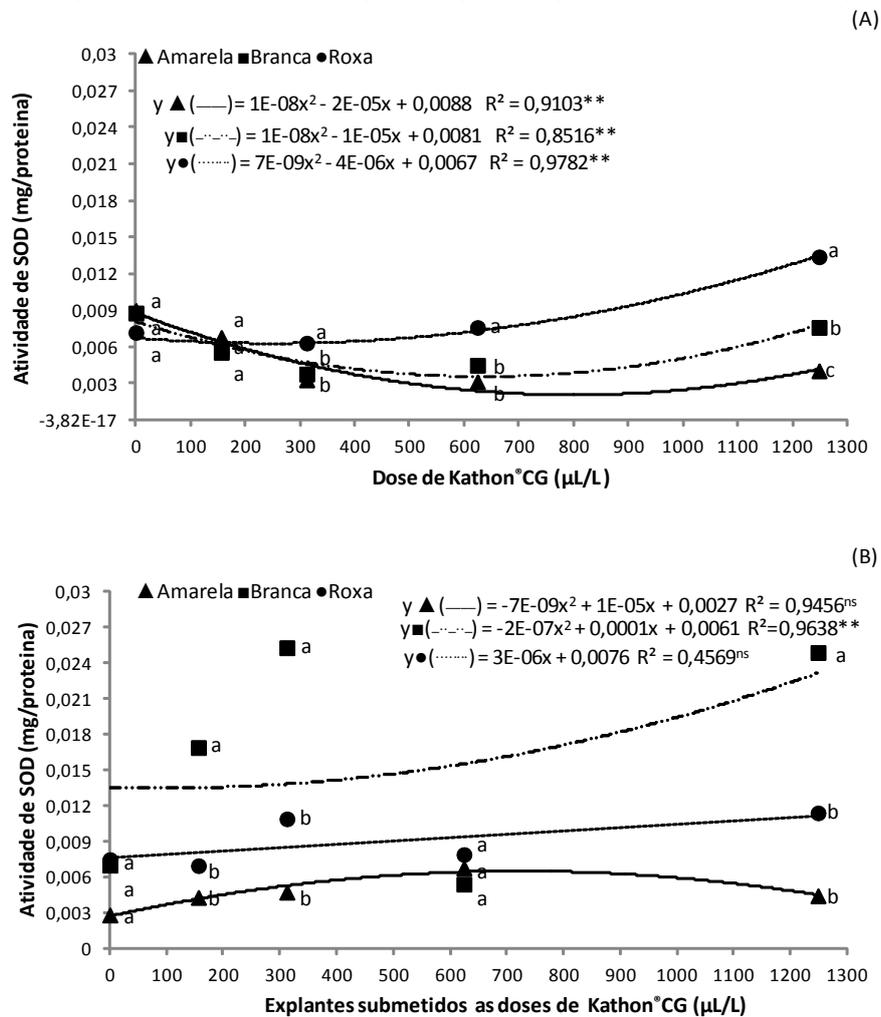
Na testemunha (Figura 10A) a variedade que teve a maior atividade de SOD foi a "amarela" (> 3 %) que a variedade "branca", e (> 20%) que a variedade "roxa".

Ao incremento do incremento das doses de Kathon®CG, a variedade "amarela" decresceu sua atividade de SOD em todas as doses, sua menor atividade foi em 624 $\mu\text{L/L}$ (> 64%). A variedade "branca" também teve sua atividade diminuída em todas as doses, com o maior decréscimo em 312 $\mu\text{L/L}$ (> 56%). A variedade

"roxa" tem uma atividade de SOD maior em 1248 $\mu\text{L/L}$ ($> 46\%$) que a testemunha, e sua menor atividade em 156 $\mu\text{L/L}$ ($> 22\%$).

Para os segmentos nodais que foram submetidos as doses de Kathon[®]CG (Figura 10B), a variedade "amarela" teve um aumento na atividade de SOD em todas as doses, com a sua maior atividade em 624 $\mu\text{L/L}$ ($> 58\%$). A variedade "branca" tem a sua maior atividade de SOD em 312 $\mu\text{L/L}$, ($> 261\%$) e sua menor atividade em 624 $\mu\text{L/L}$ ($> 22\%$). Variedade "roxa" tem sua maior atividade em 1248 $\mu\text{L/L}$ ($> 52\%$), e sua menor atividade em 156 $\mu\text{L/L}$ ($> 8\%$).

FIGURA 10 - Atividade de SOD (A) de explantes de três variedades de batata-doce no meio de cultura com quatro doses de Kathon®CG e a testemunha. Atividade de SOD (B) de explantes que foram submetidos aos tratamentos e depois transferidos para meio de cultura sem Kathon®CG.

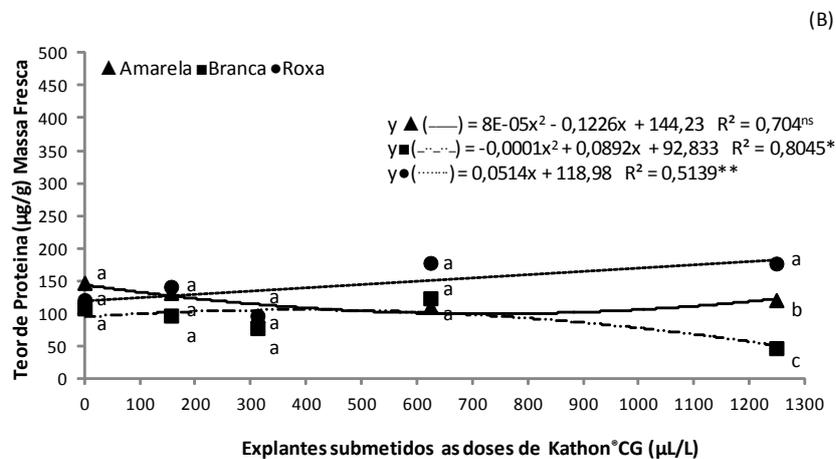
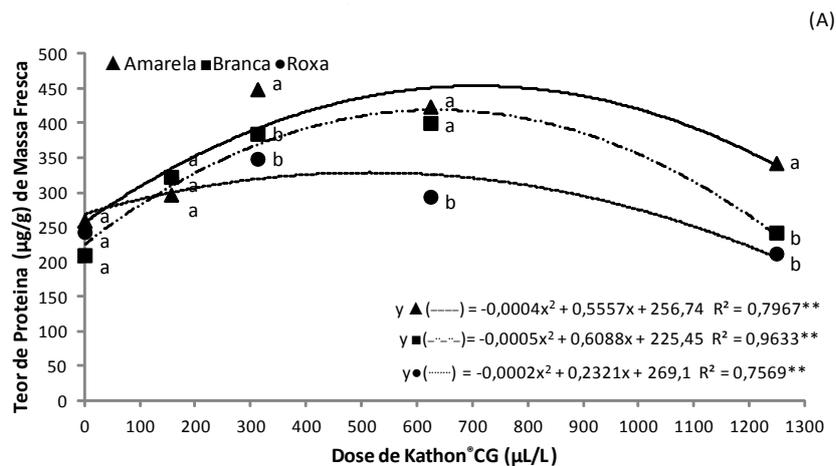


Com o incremento nas doses de Kathon®CG (Figura 11A) houve mudanças nos teores de proteínas dos materiais testados. a variedade "amarela" aumentou o teor de proteína, com máximo em 312 µL/L (> 73%), comparada a testemunha. A variedade "branca" teve o maior acúmulo em 624 µL/L (> 90%). A variedade "roxa" teve o maior acúmulo em 312 µL/L (> 43%), e seu menor acúmulo em 1248 µL/L (> 2%), comparada a testemunha.

No tratamento de recuperação, ou seja, o retorno para meio sem Kathon®CG (Figura 11B), a variedade "amarela" diminuiu o teor de proteína em

todas as doses de Kathon[®]CG. A variedade "branca" teve um aumento somente em 624 $\mu\text{L/L}$ ($> 14\%$). A variedade "roxa" diminuiu seu teor de proteína somente em 312 $\mu\text{L/L}$ ($> 19\%$). A variedade "roxa" apresentou maior suscetibilidade ao Kathon[®]CG.

FIGURA 11 - Teor de proteína (A) de explantes de três variedades de batata-doce no meio de cultura com quatro doses de Kathon[®]CG e a testemunha. Teor de proteína (B) de explantes que foram submetidos aos tratamentos e depois transferidos para meio de cultura sem Kathon[®]CG.



Para quase todas as variáveis analisadas o Kathon[®]CG apresentou decréscimos crescentes com o incremento de doses. Quando da recuperação destes materiais em meio sem Kathon[®]CG, houve um aumento de quase todos os parâmetros. Isto indica que o produto interfere diretamente com o metabolismo celular, podendo inibir o funcionamento adequado das organelas fazendo com que as células não se desenvolvam. Quando o inibidor é retirado do meio, os tecidos

tendem a se recuperar e mesmo a ter um crescimento mais vigoroso do que o material exposto a dose inicial do produto.

3.6 CONCLUSÃO

O Kathon[®]CG foi eficiente como esterilizante do meio de cultura em todas as doses testadas.

O Kathon[®]CG reduziu o crescimento aéreo e radicular de micro propágulos de batata-doce das 3 variedades testadas em qualquer dose.

O Kathon[®]CG não obteve resultado positivo como desinfetante de explantes nodais de batata-doce na dose de até 1 ml/L.

REFERÊNCIAS

- BATES, L. S.; WALDEREN, R. P.; TEARE, I.D. Rapd determination of free proline four water stress studies. **Plant and Soil**, Manhattan, v.39, n.1, p. 205-207, 1973.
- BORÉM, A. **Biologia Florestal**. Viçosa: Editora da UFV, 387 p., 2007.
- BRADFORD, M. M.; et al, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, Athens, v. 72, n.1, p. 248–254, 1976.
- DELAUNEY, A.; VERMA, D. Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. **The Plant Journal**, Bridgetown, v.4, n.2, p.215-223, 1993.
- DODDS, J.H.; ROBERTS, L.W. **Experiment in plant tissue culture**. 3 ed. New York: Cambridge University Press, p.256, 1995.
- ECHER F. R.; et al. Estresse hídrico induzido por manitol em cultivares de algodão **Revista Ciência Agronômica**. Presidente Prudente, v. 41, n.4, p. 638-645, 2010.
- FERREIRA, D. F. SISVAR:. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011.
- GEORGE, M. W.; TRIPEPI, R. R. Plant Preservative Mixture™ Can Affect Shoot Regeneration from Leaf Explants of *Chrysanthemum*, European Birch, and *Rhododendron*, **HortScience**, Moscow, v. 36, n.4, p.768–769, 2001.
- GREGGAINS, V.et al. Metabolism-induced free radical activity does not contribute significantly to loss of viability in moist-stored recalcitrant seeds of contrasting species. **New Phytologist**, Sheffield, v.148, n.2, p.267-276, 2000.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in Biology and Medicine**. Oxford: Clarendon Press. 543 p. 1989.
- HARE, P. D.; CRESS, W. A. Metabolic implications of stress induced proline accumulation in plants. **Plant Growth Regulation**, v.21, p.79-102, 1997.
- HEUER, B. Osmoregulatory role of proline in water and salt stress plants. In: PESSARAKLI, M. **Handbook of plant and crop stress**. New York: Marcel Dekker, cap. 17, p.363-381, 1994.
- HIROSSE, E.H. et al. In vitro growth of sweet potato fed with potassium phosphite. **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v. 34, n. 1, p. 85-91, 2012.
- HOAI, N.T.T., et al. Accumulation of some nitrogen compounds in response to salt stress and their relationships with salt tolerance in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. **Plant Growth Regulation**, Ibaraki, v.41, n.2, p.159-164, 2003.

HUNT, R. **Plant growth curves: the functional approach to plant growth analysis**. London: Edward Arnold, 248p, 1982.

JIMÉNEZ, V. M.; et al. In vitro propagation of the neotropical giant bamboo, *Guadua angustifolia* Kunth, through axillary shoot proliferation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, San Pedro, v.86, n.3, p.389-395, 2006.

KNEIFEL, W.; LEONHARDT, W. Testing of different antibiotics against gram-positive and gram-negative bacteria isolated from plant-tissue culture, **Plant Cell, Tissue and Culture Organ**, Vienna, v 29, n.2, p 139-144,1992.

KUZNETSOV, V. V.; SHEVYAKOVA, N. I. Stress response of tobacco cells to high temperature and salinity. Proline accumulation and phosphorylation of polypeptides. **Physiologia Plantarum**, Moscow, v.100, n.2, p.320-326, 1997.

LEI, Y.-B.; SONG, S.-Q.; FU, J.-R. Possible involvement of anti-oxidant enzymes in the cross-tolerance of the germination/growth of wheat seeds to salinity and heat stress. **Journal of Integrative Plant Biology**, Guangzhou,v. 47, n. 10, p. 1211-1219, 2005.

LEMUS, T. M., HERNÁNDEZ, N. M. R.. Evaluación de la actividad antibacteriana de preservos industriales. **Revista CENIC Ciencias Biológicas**, Ciudad de La Habana, v.38, n.1, p 45-48, 2007.

MACHADO-NETO, N. B, et al. Proline: use as an indicator of temperature stress in bean seeds. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Presidente Prudente, v. 4, n. 3, p. 330-337, 2004.

MADAN, S.; et al. Proline and proline metabolising enzymes in in-vitro selected NaCl-tolerant Brassica juncea L. under salt stress. **Annals. Botany**, Hisar, v. 76, n.1, p. 51-57, 1995.

MAIA, P. S. P. et al. Conteúdo relativo de água, teor de prolina e carboidratos solúveis totais em folhas de duas cultivares de milho submetidas a estresse hídrico. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, p. 918-920, 2007. (Suplemento).

MARKS J G, et al.: Methylchloroisothiazolone-ne/Methylisothiazolinone (Kathon CG) Biocide United. States Multicenter Study of Human Skin Sensitization. **American Journal of Contact Dermatitis**, Bunnell, v.3, n.1, p.157-161, 1990.

MORAGA S. P.; ESCOBAR, R.; VALENZUELA, A. S. Resistance to freezing in three *Eucalyptus globulus* Labill subspecies. **Electronic Journal of Biotechnology**, Concepción, v.9, n.3, p.310-314, 2006

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Madison, v.15, n.3, p. 473-497, 1962.

NIEDZ, R. P. Using isothiazolone biocides to control microbial and fungal contaminants in plant tissue cultures. **Hortechology**, Camden Road, v.8, n.4, p. 598-601, 1998.

PEIXOTO, N.; MIRANDA, J. E. C. **Cultivo da batata-doce em Goiás**. Goiânia, (EMGOPA Circular Técnica, 7). 24p. 1984.

SILVA, S. O. C.; SOUZA, A. S.; PAZ, O. P. Efeito da multiplicação vegetativa *in vitro* na produtividade de batata-doce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam). **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Cruz das Almas, v.3, n.1, p.47-52, 1991.

TEIXEIRA, S. L. et al. Cultura de tecidos vegetais, pela combinação de esterilizantes químicos e forno de microondas. **Revista Ceres**, Campos dos Goytacazes, v.52, n.301, p.343-349, 2005b.

TEIXEIRA, S. L.; RIBEIRO, J. M.; TEIXEIRA, M. T. Utilização de hipoclorito de sódio na esterilização de meio de cultura para multiplicação *in vitro* de *Eucalyptus pellita* L. **Ciência Florestal**, Campos dos Goytacazes, v.18, n.2, p.185-191, 2008.

TEIXEIRA, S. L.; SOUZA, R. T. S.; TEIXEIRA, M. T. Esterilização de meios nutritivos para cultura de tecidos vegetais em forno de microondas. **Revista Ceres**, Campos dos Goytacazes, v.52, n.302, p.499-507, 2005a.

TEIXEIRA, S.L.; RIBEIRO, J.M.; TEIXEIRA, M.T. Influence of NaClO on nutrient medium sterilization and on pineapple (*Ananas comosus* cv. *Smooth cayenne*) behavior. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Campos dos Goytacazes, v.86, n.3, p.375-378, 2006.

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. V.1e2. Brasília, Embrapa–CNPq, v.2, 864p, 1998.

VIÉGAS, R. A.; MELO, A. R. B, SILVEIRA, J. A. G. Nitrate reductase activity and proline accumulation in cashew in response to salt (NaCl) shock. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Fortaleza, v.11, n.1, p.21-28, 1999.

VOLK, G. M.; RICHARDS, K. Preservation methods for Jerusalem artichoke cultivars. **HortScience**, Fort Collins, v.41, n.1, p.80-83, 2006.

YANAGAWA, T.; et al. Application of disinfectants to orchid seeds, plantlets and media as a means to prevent *in vitro* contamination. **Lyndleyana**, v.10, n.1, p.33-36, 1995.