

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS  
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

*OBTENÇÃO DE MUDAS DE YACON (Polymnia sonchifolia)  
UTILIZANDO-SE TÉCNICAS DE CULTURA DE TECIDOS*

CRISTINA FARIA FREITAS

Monografia apresentada ao Curso de Ciências  
Biológicas, da Universidade Federal de  
Uberlândia, para a obtenção do grau de  
Bacharel em Ciências Biológicas.

Uberlândia-MG

Dezembro-1999

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS  
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

OBTENÇÃO DE MUDAS DE YACON (*Polymnia sonchifolia*)  
UTILIZANDO-SE TÉCNICAS DE CULTURA DE TECIDOS

CRISTINA FARIA FREITAS

Orientador: PROF. DR. WARWICK ESTEVAM KERR

Monografia apresentada ao Curso de Ciências  
Biológicas, da Universidade Federal de  
Uberlândia, para a obtenção do grau de  
Bacharel em Ciências Biológicas.

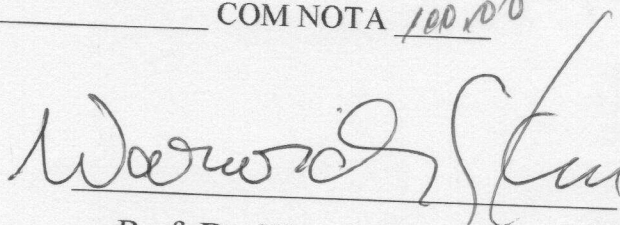
Uberlândia-MG  
Dezembro-1999

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS  
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

OBTENÇÃO DE MUDAS DE YACON (*Polymnia sonchifolia*)  
UTILIZANDO-SE TÉCNICAS DE CULTURA DE TECIDOS

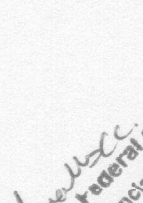
CRISTINA FARIA FREITAS

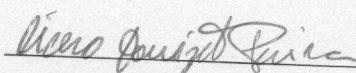
A BANCA EXAMINADORA REUNIDA EM 14/12/99 CONSIDEROU  
ESTA MONOGRAFIA \_\_\_\_\_ COM NOTA 100,00



Prof. Dr. Warwick Estevam Kerr

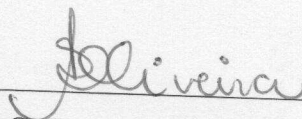
Orientador

  
Universidade Federal de Uberlândia  
Centro de Ciências Biomédicas  
Prof. Ana Maria Coelho Carvalho  
Coordenadora do Curso de Ciências Biológicas



Ms.C. Cícero Donizete Pereira

Co-orientador



Ms.C. Rosana de Cássia Oliveira

Co-orientadora

Eu vos louvarei de todo o coração, Senhor,  
Porque ouvistes as minhas palavras.  
Na presença dos Anjos eu vos cantarei.  
Ante vosso santo templo prostar-me-ei,  
E louvarei o vosso nome,  
Pela vossa bondade e fidelidade  
Por que acima de todas as coisas,  
Exaltastes o vosso nome e a vossa promessa.  
Quando vos invoquei, vós me respondestes;  
Fizestes crescer a força de minha alma.  
Verdadeiramente grande é a glória do Senhor.  
Sim, excelso, é o Senhor, mas olha os pequeninos  
Enquanto perscruta os soberbos.  
Em meio à adversidade vós me conservais a vida,  
Salva-me a vossa mão.  
O Senhor completará o que em meu auxílio começou.  
Senhor, eterna é a vossa bondade:  
Não abandoneis a obra de vossas mãos.

Sal.137, 1-3, 5b-8

## DEDICATÓRIA

À minha querida família que nunca me desamparou, e sempre me apoiou durante todos esses anos! Essa vitória também é de vocês!!!

## AGRADECIMENTOS

Ao primeiro e grande cientista: Deus, por ter me fortalecido nos momentos difíceis; por ter me dado grandes oportunidades para crescer como pessoa humana e principalmente por ainda me amar apesar de minhas limitações e infidelidades.

Ao professor Dr. Warwick Estevam Kerr pela paciência dispensada a mim e por todos os seus ensinamentos. Conviver com ele foi mesmo uma lição de vida!

Ao Engenheiro Agrônomo Cícero Donizete Pereira pela dedicação, entusiasmo e pelas infindáveis ajudas. Obrigada pelo exemplo de vontade firme, humildade e perseverança. Tenha certeza que você também é um homem iluminado!

À Mestra Rosana de Cássia Oliveira pelo auxílio e pela disposição em me ajudar! Lamento o tempo em que não aproveitei o seu conhecimento!

À Professora Dr<sup>a</sup> Ana Maria Bonetti por me ensinar a não ter medo de errar, pois é também pelos erros que se aprendem as maiores verdades.

Aos colegas do Laboratório de Cultura de Tecidos: Fred e Katiere (apesar de pouco tempo) e à querida Ana Paula. Foi com vocês que aprendi os primeiros passos de como trabalhar no Laboratório e isso é inesquecível! Desculpe Aninha por ter lhe amolado tanto, mas sou eternamente grata por tudo o que já fez por mim! Não sei o que seria de mim sem a sua ajuda!...

Aos meus pais, Nelson e Leocádia, que nunca mediram esforços e nem sacrifícios para realizar este grande sonho de cursar uma universidade. Obrigada por serem grandes exemplos de buscar na vida o que se quer!

Aos meus irmãos, Denise, Danilo, Valéria e Márcia, por todo amor, apoio, dedicação e carinho que sempre tiveram comigo. Vocês são verdadeiramente meus segundos pais!

Aos meus cunhados que me incentivaram por todo esse tempo.

Aos meus sobrinhos queridos, Paula, Saulo, Tereza Cristina, Bárbara, Sarah, Daniel e Natália Valéria, por sempre se preocuparem em me ver feliz e nunca mediram esforços para isso! Vocês serão minhas eternas criancinhas!!!

Aos amigos da Louca "Rep" : Aninha, Digão, Dimitri, Pri, Renata, e Renninho. Foi muito bom poder dividir as despesas, as bagunças, as diversões juntos. Nunca vou esquecer de tudo que eu pude aprender convivendo com vocês!

À minha querida amiga Luciana por quem tenho muito carinho, admiração e gratidão! Obrigada Lu, por tudo que já fez por mim e pela sua amizade, que me é preciosa!

Ao meu amigo Luciano que tantas e tantas vezes me amparou, consolou e ajudou! "Quem acha um amigo encontra um tesouro!" Pude crescer muitíssimo com nossa amizade!

Ao meu colega Zé Carlos (Angolano) pela disposição em me ajudar! Pena que fui lhe conhecer melhor já no fim do curso...

Aos meus grandes amigos de Anápolis. Se não fossem por vocês eu não chegaria onde cheguei! Obrigada por toda a dedicação e carinho!

Ao meu namorado Marcos, homem com quem sempre sonhei! Você chegou na hora certa para completar o que estava faltando! Obrigada por ser meu fiel companheiro, o meu grande amigo e, acima de tudo, meu cúmplice! Amo você como todo o meu coração!

## SUMÁRIO

	Pág.
Lista de Tabelas.....	ix
Lista de Figuras.....	x
RESUMO.....	xii
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>01</b>
1.1 Yacon.....	01
1.2 Cultura de Tecidos.....	04
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>07</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>08</b>
3.1 Material biológico.....	08
3.2 Assepsia.....	08
3.3 Meio de Cultura.....	10
3.4 Experimentos.....	13
3.4.1 Experimento I.....	13
3.4.2 Experimento II.....	19
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>20</b>
4.1 Experimento I.....	20
4.2 Experimento II.....	28
<b>5. CONCLUSÃO.....</b>	<b>30</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>32</b>



## Lista de Tabelas

	Pág.
<b>Tabela 1.</b> – Composição geral de tubérculos de yacon, segundo diferentes análises.....	03
<b>Tabela 2.</b> – Soluções estoque do meio MS utilizados no cultivo <i>in vitro</i> de yacon.....	10
<b>Tabela 3.</b> – Concentrações dos hormônios nos diferentes meios de cultura utilizados no cultivo <i>in vitro</i> do yacon.....	11
<b>Tabela 4.</b> – Seqüência dos meios utilizados no estabelecimento de explantes de yacon.....	12
<b>Tabela 5:</b> Índice de contaminação verificada em explantes colhidos em épocas diferentes do ciclo de vida de yacon.....	21
<b>Tabela 6:</b> Diferentes respostas de explantes colhidos em épocas distintas, mas com mesma concentração de hormônio para indução de calos.....	24

<b>Tabela 7.</b> – Índice de calogênese, oxidação e formação de brotos adventícios no cultivo de yacon com a utilização de diferentes meios de cultura.....	27
---	----

## Lista de Figuras

	Pág.
<b>Figura 1-</b> Brotos de yacon em meio MS com ausência de hormônios.....	14
<b>Figura 2-</b> Vaso com muda de yacon contendo duas porções de areia para uma de terra em fase inicial de aclimação.....	15
<b>Figura 3-</b> Vasos contendo mudas de yacon cobertos com película de PVC.....	16
<b>Figura 4-</b> Mudanças de yacon em fase de aclimação na Casa de Vegetação.....	17
<b>Figura 5-</b> Mudanças de yacon plantadas na Área Experimental do Campus Umuarama.....	18
<b>Figura 6-</b> Explantes de yacon escurecidos após a desinfestação e com calos formados após 17 dias em meio contendo 1,0mg/l de 2-4-D.....	22
<b>Figura 7-</b> Calo formado em meio contendo 1,5mg/l de BAP.....	25

## RESUMO

O yacon (*Polymnia sonchifolia*) é um arbusto anual cultivado na região andina e seu sistema radicular constitui-se de rizomas, que são utilizados para a propagação vegetativa da espécie, e de tubérculos, que armazenam frutano do tipo inulina, que é um polímero de frutose. Por essa característica é recomendado a ser consumido por pessoas diabéticas e que fazem regime alimentar. O extrato aquoso de suas folhas pode reduzir os níveis de glicemia no sangue (LEMONICA, 1997).

O objetivo do trabalho foi encontrar um meio de cultura específico para a formação de brotos a partir de calos de folhas de yacon colhidas em diferentes épocas do ciclo de vida da planta.

O trabalho foi dividido em dois experimentos em relação a quantidade de auxina utilizada para a indução da calogênese. O primeiro conteve 1,0mg/l de 2-4-D e o segundo, 1,5mg/l.

No primeiro experimento utilizou-se primórdios foliares colhidos na época inicial de brotação, no período antecedente a floração e início da floração. Após a formação de calos que se deu, respectivamente, em 17, 45 e 27 dias, os calos foram repicados para sete meios de cultura diferentes em relação a quantidade de auxina e/ou citocinina, sendo que somente no meio MS  $\phi$  (com ausência de fitohormônios) e no meio suplementado com 1,0mg/l de BAP é que houve indução de um broto (explantes colhido no início da brotação do yacon). Os brotos que foram isolados dos pré-existentes permaneceram em meio MS  $\phi$ , onde se mostraram vigorosos. As mudas de yacon aclimatadas desenvolveram-se bem em condições de campo.

O experimento II, foi dividido em três classes, de acordo com o tamanho e a localidade das folhas no caule. Classe A constituía-se das últimas folhas, classe B, as intermediárias; classe C, folhas subjacentes aos primórdios foliares, que constituíram a subclasse D, por serem pequenos, logo colhidos em diversos caules. As folhas maiores foram repicadas e somente alguns explantes foram utilizados, obtendo assim, uma amostragem de toda a planta. Após a formação de calos, que se deu apenas na classe C e na subclasse D, estes foram repicados para meio MS com ausência de reguladores de crescimento e meio contendo 0,1mg/l de 2-4-D e 1,0mg/l de BAP sem a verificação da indução de brotos.

A recalcitrância, que é a perda do potencial de regeneração; condições de luz e de temperatura e acúmulo de gás etileno (MANTELL *et al.*, 1994), podem ser fatores que tenham limitado o cultivo *in vitro* de yacon, isso explicaria a dificuldade de se encontrar um meio específico para a indução de brotos a partir de calos provenientes de folhas de yacon.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 YACON

O yacon (*Polymnia sonchifolia* Poep & Endl.), pertencente à família Asteraceae, é cultivado nas regiões Andinas, como Equador, Argentina, Colômbia, Peru, desde os tempos mais remotos, pelas antigas civilizações Incas e se estende até hoje servindo como fonte de rendas para as populações rurais daquela região (VIETMEYER, 1989 e ZARDINI, 1991).

É um arbusto anual podendo atingir até 2,5 m de altura. Os caules aéreos são pilosos, cilíndricos e de coloração esverdeada. As folhas são pilosas, opostas cruzadas, denteadas, cuja parte superior é triangular e hastiforme. Na base da parte inferior existem asas laterais. O sistema radicular se constitui de rizomas e tubérculos. Estes correspondem a parte comestível da planta e são agrupados em cachos contendo mais de 20 raízes. São tuberosos, suculentos, de sabor adocicado e de aproximadamente 20 cm de comprimento por 10 cm de diâmetro, podendo ter mais de 2kg cada. Já os rizomas são cilíndricos, podem pesar de 3 a 10 kg e são utilizados na propagação da espécie (ZARDINI, 1991). As flores alaranjado-claras são reunidas em capítulos. As da periferia são flores femininas e as do centro, masculinas (HERRERA, 1943). Possui 3 lígulas

denteadas, que são pequenas lâminas vegetais na base das folhas (ZARDINI, 1991).

A propagação do yacon pode ser feita por brotos dos rizomas. Após o plantio, ele não requer muitos cuidados desde que haja solo úmido e calor moderado (VIETMEYER *et al.*, 1989). Segundo ZARDINI (1991), na Província de Jujiy, no noroeste da Argentina, o yacon é cultivado por pequenas famílias que vivem ao longo da planície Andina, e que, no fim de maio estocam no chão pedaços de rizomas que são cobertos com palha até início de agosto, época propícia do plantio. Em novembro, por ser a estação chuvosa, incia-se a brotação e no fim de abril a floração. Em maio, quando a parte aérea morre, o sistema radicular é colhido e separado. O rizoma é aproveitado para reiniciar um novo ciclo e os tubérculos suculentos são vendidos em mercados. HERRERA (1943) cita que os tubérculos podem ser estocados por longo tempo após a colheita e se expostos ao sol ficam mais doces.

O yacon possui uma característica muito peculiar: seu tubérculo armazena frutano, do tipo inulina, que é um polímero de frutose, e não amido, polímero de glicose, como ocorre com a maioria das raízes. Por essa é indicado para ser consumido por pessoas diabéticas ou que fazem regime alimentar. Pode ser utilizado na culinária na forma de doces, saladas, cozido ou assado. Os seus tubérculos são ricos em proteínas e sais minerais (Tabela 1) (VIETMEYER, 1989). ISEJIMA (1997) cita alguns efeitos benéficos do frutano à saúde:

- \* É anti-cariogênico, pois a microflora bucal não o absorve;
- \* Oferece poucas calorias, porque não é absorvido pelo organismo;
- \* Por não ser digerido no intestino delgado, funciona como fibra dietética, aliviando a prisão de ventre.

Segundo VILHENA (1997) o yacon foi introduzido no Brasil, por imigrantes japoneses, mais ou menos, no início da década de 90, na região de Capão Bonito-SP. Eles utilizam suas folhas, que são amargas, e suas raízes para

**Tabela 1:** Composição geral de tubérculos de yacon, segundo diferentes análises

Composto	Tubérculos frescos (%)	Tubérculos secos (%)
Água	69 a 83	—
Proteínas	0,4 a 2,2	6 a 7
Açúcar (do tipo inulina)	20	65
Cobalto	—	4 a 7
Gorduras	—	0,4 a 1,3
Fibras	—	4 a 6

—: valor não mencionado

Fonte: VIETMEYER, 1989



controlar os níveis de diabetes e de altas taxas de colesterol no sangue.

Na UNESP de Botucatu há um Centro de Raízes Tropicais que vem estudando propriedades farmacológicas do yacon, quanto ao seu efeito hipoglicemiante. LEMONICA (1997) observou em seu trabalho que o tratamento com extrato aquoso das folhas da planta reduziu significativamente a glicemia dos animais diabéticos tratados em relação àqueles não tratados, cuja glicemia aumentou gradativamente até o fim do experimento.

## 1.2. CULTURA DE TECIDOS

A cultura de tecidos é um processo onde pequenos fragmentos de tecido vegetal vivo, denominados de explantes, são isolados de um organismo e cultivados assepticamente por períodos indeterminados em um meio nutritivo semi-definido ou definido. Os explantes podem ser uma célula, um grupo de células ou um órgão e são, normalmente, constituídos de células em fases iniciais de desenvolvimento em um estado definido como "indeterminado". Essas células indeterminadas possuem alto grau de plasticidade e podem, também, proliferar-se rapidamente produzindo verdadeiras massas celulares conhecidas como calos, dependendo das condições ambientais que se impõe a elas (MANTELL *et al.*, 1994).

As células vegetais indeterminadas podem exibir totipotência, que é a capacidade de uma célula regenerar, por si só, o fenótipo do organismo completo e diferenciado, da qual é derivado, pois o núcleo dessas células contém todas as informações genéticas da planta. É nesta totipotencialidade que se baseia a cultura de tecidos vegetais (MANTELL *et al.*, 1994).

As atividades de cultura de tecidos são realizadas em ambiente asséptico, com temperatura e iluminação controladas e o meio de cultura nutritivo

escolhido. Essas são as condições mínimas aplicadas ao material *in vitro*, sendo condição limitante, o ambiente asséptico (TORRES *et al.*, 1998). Essas atividades de cultura de tecidos (micropropagação *in vitro*) devem passar por três etapas fundamentais: I: seleção dos explantes, esterilização dos mesmos e transferência para o meio de cultura escolhido; II: proliferação dos brotos e III: transferência para o meio ambiente, constituindo-se a fase de aclimatação (MURASHIGE, 1974 *apud* MANTELL *et al.*, 1994), que pode também ser um fator limitante para as mudas obtidas *in vitro*.

Os meios de culturas utilizados devem fornecer as substâncias essenciais para o crescimento dos tecidos sendo que os nutrientes mais comuns são os sais inorgânicos, fontes de carbono, algumas vitaminas e os reguladores de crescimento (fitohormônios). O meio mais usado tem sido de MURASHIGE & SKOOG (1962), intitulado apenas de MS. Existem vários meios derivados deste que podem ser aplicados em larga escala para diversas espécies e para objetivos distintos (LINDSEY, 1991).

Há vários tipos de culturas, entre elas, a de calos que podem ser derivados de vários órgãos da planta tais como raízes, brotos, folhas, endosperma e pólen. O material mais jovem é o mais adequado, principalmente nesse tipo de cultura, em relação aos maduros, cujas células apresentam baixa totipotência. A concentração e os tipos de reguladores de crescimento utilizados para obter uma cultura de calos variam muito de uma espécie para outra, assim como de um explante para outro (MANTELL *et al.*, 1994). Os principais reguladores de crescimento utilizados na cultura de calos são as auxinas e as citocininas. Estes podem ser usados separadamente ou de forma complementar. De modo geral, as auxinas induzem a formação de raízes e as citocininas, induzem a formação de gemas. As auxinas mais utilizadas são o ácido 3-indolacético (AIA), ácido naftalenoacético (ANA) e o ácido 2-4-diclorofenoxiacético (2-4-D) entre outras. O 6-benzilamimopurina (BAP) é a citocinina mais usada comercialmente

(TORRES *et al.*, 1998), por ser mais termoestável.

O calo é um tecido não organizado, formado por células irregularmente diferenciadas que se multiplicam desordenadamente favorecendo o surgimento de células mutantes. Isto faz com que a utilização deste tipo de cultura seja de grande importância para que se obtenha indivíduos com características diferentes ou apuradas em relação à planta mãe, aumentando assim, a variação genética da espécie em larga escala. Segundo TORRES *et al.* (1998), esta característica permite a aplicação da cultura de tecidos em programas de melhoramento de plantas.

A variação somaclonal possibilita um aumento na variabilidade genética (D'AMATO, 1978 *apud* TORRES *et al.*, 1998) por ser a somatória de mutações cromossômicas e gênicas incorporadas nas plantas regeneradas de outra da mesma espécie. Essa variação será avaliada em condições de campo, uma vez que o importante é a obtenção de novas cultivares do que só o aumento na variabilidade genética propriamente dita (TORRES *et al.*, 1998).

## 2. OBJETIVO

Este trabalho teve como objetivo buscar um meio de cultura específico para a formação de brotos a partir de calos provenientes de folhas de yacon (*Polymnia sonchifolia*) colhidas em épocas diferentes do ciclo de vida da planta.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

Os experimentos foram conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, do Departamento de Genética e Bioquímica, da Universidade Federal de Uberlândia de agosto de 1998 a novembro de 1999.

#### **3.1. MATERIAL BIOLÓGICO**

Utilizou-se primórdios foliares de clones de yacon, cujas mudas são descendentes de material trazido da cidade de Cuzco, Peru, em 1994. Estas foram plantadas e mantidas na Área Experimental do Campus Umuarama da Universidade Federal de Uberlândia.

#### **3.2. ASSEPSIA**

A desinfestação usada nas folhas foi 10 minutos em álcool 50% e 15 minutos em solução de hipoclorito de sódio 50% (com concentração comercial de 2,5 a 3%), contendo 3 gotas de Tween. Estas concentrações foram mantidas constantes para todos os experimentos assim como o pH, que foi ajustado para

± 6,0 antes da autoclavagem.

Após o processo de desinfestação, os primórdios foliares foram lavados por três vezes em água destilada e autoclavada dentro da Câmara de Fluxo Laminar Horizontal.

Todos os materiais como placas de Petri, papéis de filtro, bisturis, pinças e inclusive os meios de culturas, foram previamente autoclavados a 121°C por 15 minutos. Durante o plantio pinças e bisturis foram constantemente flambados para garantir as condições assépticas que são necessárias para cultivo *in vitro*.

### 3.3. MEIO DE CULTURA

O meio de cultura básico utilizado foi o MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) (Tabela 2) acrescido ou não de auxina e/ou citocinina (Tabela 3).

O trabalho foi dividido em dois experimentos, devido a variação na quantidade inicial de auxina utilizada para a indução de calos. O primeiro conteve 1,0 mg/l de 2-4-D, e o segundo experimento 1,5 mg/l.

As culturas permaneceram em câmara escura até que se verificasse a formação de calos, quando então foram repicados para diferentes meios de cultura (Tabela 4) e transferidos para a câmara de crescimento sob intensidade de luz a 3.000lux, fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 25° C variando entre 22 e 28° C.

**Tabela 2:** Soluções estoque do meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) utilizados no cultivo *in vitro* de yacon

Solução estoque	Compostos	Concentração Solução estoque (mg/l)	Volume da solução estoque adicionada ao meio (mg/l)	Concentração final (mg/l)
<b>A</b>	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	82500	20	1.650,00
<b>B</b>	KNO <sub>3</sub>	95000	20	1.900,00
<b>C</b>	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1240	5	6,2
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	34000		170,0
	KI	166		0,83
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> . 2H <sub>2</sub> O	50		0,25
	CoCl <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O	5		0,025
<b>D</b>	CaCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O	17600	25	440,0
<b>E</b>	MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	74000	5	370,0
	MnSO <sub>4</sub> . H <sub>2</sub> O	3378,2		16,891
	ZnSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	1720		8,60
	CuSO <sub>4</sub> . 5H <sub>2</sub> O	5		0,025
<b>F</b>	Na <sub>2</sub> EDTA. 2H <sub>2</sub> O	7450	5	37,25
	FeSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	5570		27,85
<b>Hexitol</b>	Mio-inositol	2,0	50	100,00
<b>Vitaminas</b>	Tiamina HCl	10		0,1
	Piridoxina	10	10	0,5
	Ácido nicotínico	50		0,5
<b>Aminoácido</b>	Glicina	80	25	2,0
<b>Açúcar</b>	Sacarose (3%)	---	---	30.000,00
<b>Ágar</b>	---	---	---	7.000,00

pH ± 6,0

**Tabela 3:** Concentrações dos hormônios nos diferentes meios de cultura utilizados no cultivo *in vitro* de yacon

Tipos de meios	Concentração de hormônios	
	Auxina 2-4-D (mg/l)	Citocinina BAP (mg/l)
M <sub>1</sub>	1,0	—
M <sub>2</sub>	—	1,5
M <sub>3</sub>	—	—
M <sub>4</sub>	—	1,0
M <sub>5</sub>	—	0,5
M <sub>6</sub>	—	0,8
M <sub>7</sub>	0,05	1,0
M <sub>8</sub>	1,5	—
M <sub>9</sub>	0,1	1,0

— : ausência



**Tabela 4:** Seqüência dos meios utilizados no estabelecimento de explantes de yacon

Experimento	Meio inicial para indução de calogênese	1ª-Repicagem	2ª-Repicagem	3ª-Repicagem	4ª-Repicagem
<b>I</b>	<b>M<sub>1</sub></b>	M <sub>2</sub>	M <sub>3</sub>	M <sub>4</sub>	M <sub>3</sub>
	<b>M<sub>1</sub></b>	M <sub>4</sub>	M <sub>7</sub>	M <sub>7</sub>	—
	<b>M<sub>1</sub></b>	M <sub>4</sub>	M <sub>5</sub>	—	—
	<b>M<sub>1</sub></b>	M <sub>5</sub>	—	—	—
	<b>M<sub>1</sub></b>	M <sub>6</sub>	M <sub>7</sub>	M <sub>7</sub>	—
	<b>M<sub>1</sub></b>	M <sub>7</sub>	M <sub>3</sub>	—	—
<b>II</b>	<b>M<sub>8</sub></b>	M <sub>9</sub>	—	—	—
	<b>M<sub>8</sub></b>	M <sub>3</sub>	—	—	—

— : ausência

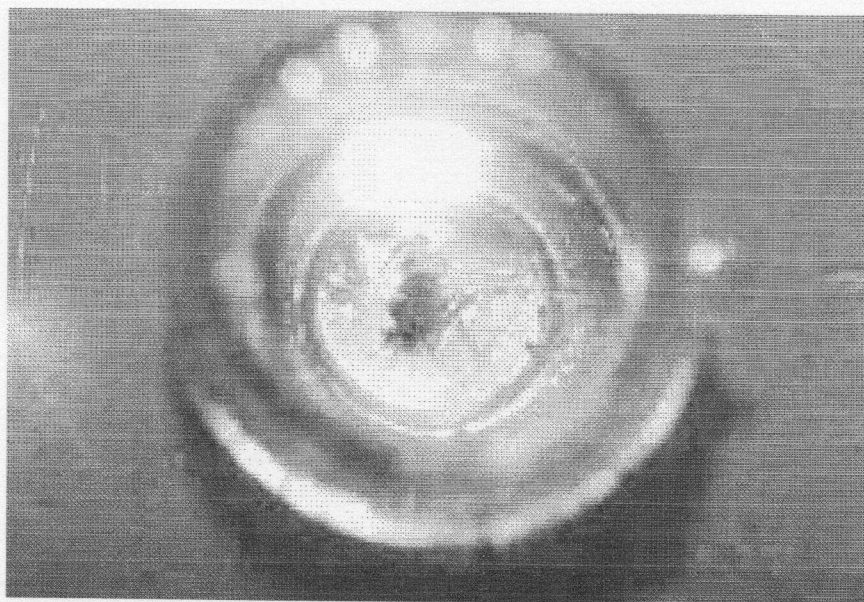
### 3.4. EXPERIMENTOS

#### 3.4.1 Experimento I:

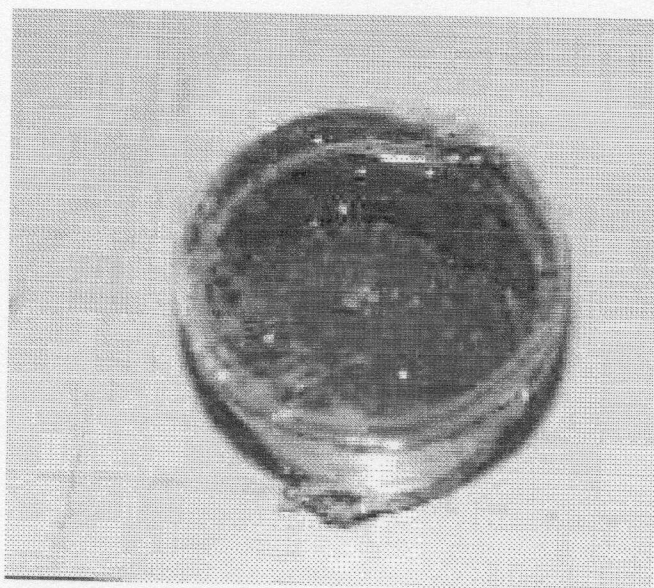
Os explantes foram coletados da planta mãe nos meses de agosto e novembro de 1998 e fevereiro de 1999, meses correspondentes, ao início da brotação, época antecedente à floração e período inicial da mesma, respectivamente, cujos tamanhos foram, em média, de 1,7cm, 1,6cm e 1,6cm.

O meio de cultura inicial foi o MS enriquecido com 1,0mg/l de 2-4-D, correspondendo o M<sub>1</sub>. Após a formação dos calos estes foram estabelecidos em diversos meios (tabela 4).

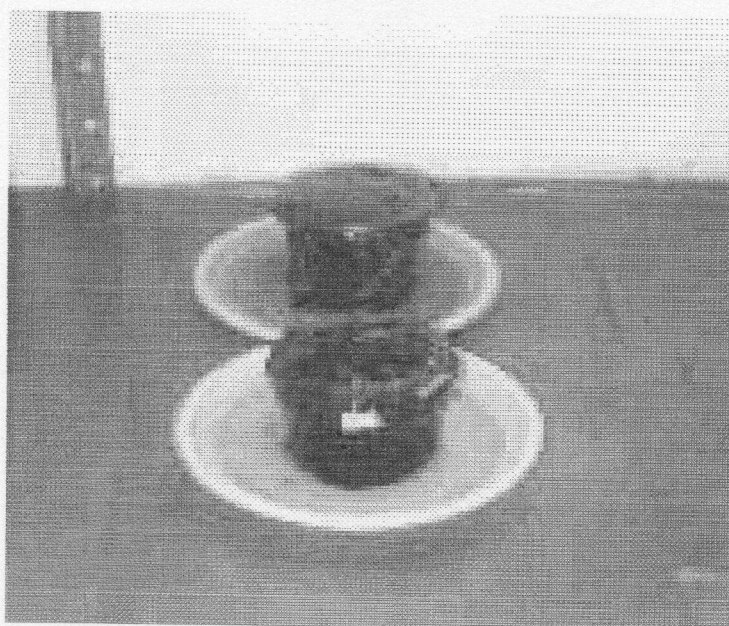
Os brotos que se formaram foram destacados da planta e estabelecidos em meio MS (meio com ausência de reguladores de crescimento) (Figura 1). Posteriormente foram transferidos para vasos contendo 2 porções de areia para 1 de terra autoclavados (Figura 2). Estes permaneceram em pratos contendo água e foram cobertos com película de PVC para reter a umidade (Figura 3). Esta película foi perfurada sete dias após, a fim de que, a planta se adaptasse com a temperatura (aclimatação). Quando as mudas atingiram 5-7cm foram transplantadas para a Casa de Vegetação do Campus Umuarama (Figura 4) onde também eram mantidas úmidas. Com aproximadamente 11cm as mudas foram plantadas definitivamente na Área Experimental do Campus Umuarama (Figura 5).



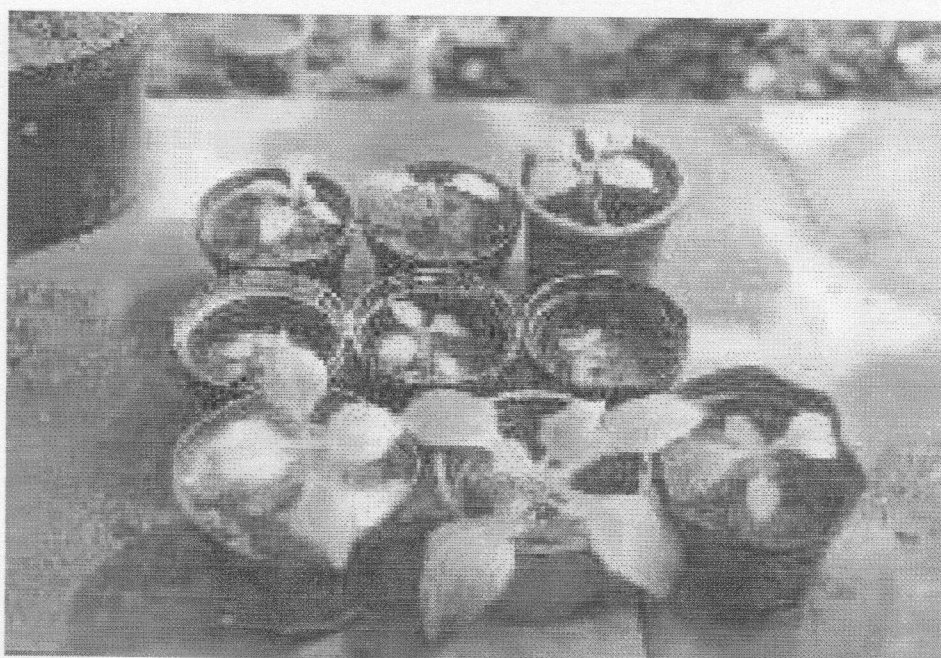
**FIGURA 1-** Brotos de yacon em meio MS com ausência de hormônios



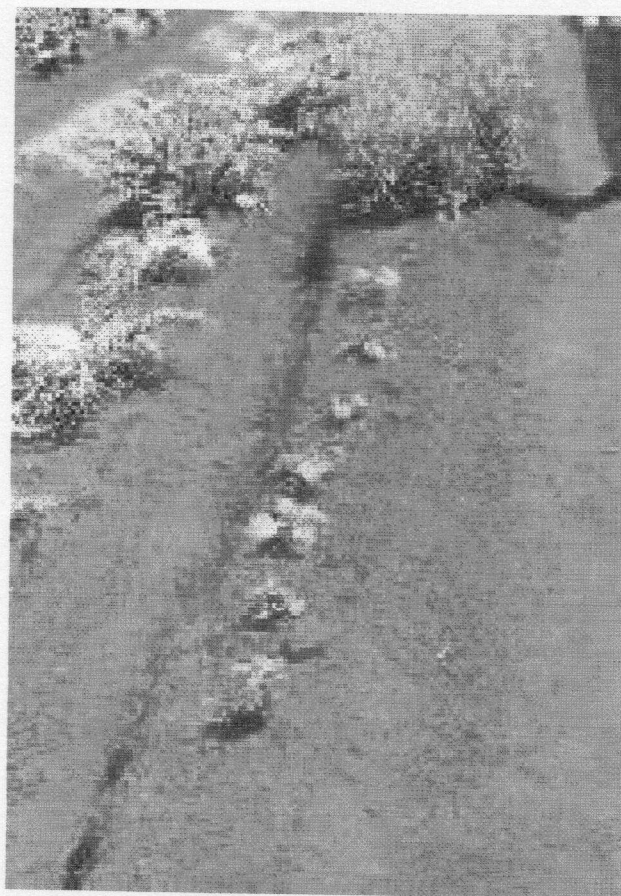
**FIGURA 2-** Vaso com muda de yacon contendo duas porções de areia para uma de terra em fase inicial de aclimação



**FIGURA 3-** Vasos contendo mudas de yacon  
coberto com película de PVC



**FIGURA 4-** Mudas de yacon em fase de aclimação na Casa de Vegetação



**FIGURA 5-** Mudras de yacon plantadas  
na Área Experimental do  
Campus Umuarama

### 3.4.2 Experimento II:

Os explantes foram retirados da planta mãe no fim da floração do yacon, ou seja, maio de 1999. Utilizou-se folhas do mesmo caule, mas de quatro tamanhos e locais diferentes. Isso fez com que o experimento fosse dividido em três classes distintas, sendo que a Classe A constituía-se das duas últimas folhas do caule; Classe B, as intermediárias; Classe C as subjacentes aos primórdios foliares que, por serem pequenos, foi necessário utilizar primórdios pertencentes a outros caules formando assim, a Subclasse D.

O meio de cultura inicial foi o MS suplementado com 1,5mg/l de 2-4-D, ou seja, o M<sub>8</sub>.

As folhas por serem grandes, foram repicadas a fim de se reduzir os explantes a aproximadamente 1cm<sup>2</sup>. Para o plantio, selecionou-se alguns fragmentos das bordas laterais, do ápice, da parte central e da base foliar, assim como da parte mediana das folhas de forma a se obter uma amostragem de todas as partes da planta. Somente os explantes selecionados foram desinfestados.

As folhas da Classe A tinham, em média, 22,4cm; as da Classe B, 17,9cm; as da Classe C, 10cm e as da Subclasse D 1,8cm de comprimento.

Após a formação de calos estes foram repicados para os meios M<sub>9</sub> (0,1mg/l de 2-4 D mais 1,0mg/l de BAP) e M<sub>3</sub> (meio com ausência completa de fitohormônios).



## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Experimento I:

A contaminação verificada nos explantes colhidos no início da brotação do yacon foi, aproximadamente, 1,5%, um índice muito baixo. Nos explantes das épocas de pré-floração e de floração foi superior a 40% (tabela 05). Segundo GRATTAPLAGLIA & MACHADO, 1990 *apud* MAZZONETTO (1999) a condição fitossanitária da planta doadora dos explantes determina a facilidade da desinfestação dos mesmos. A contaminação verificada nos explantes colhidos no início da brotação foi menor devido à pouca idade da fonte dos explantes, tendo assim, pouco tempo de exposição à ação de patógenos. Aqueles explantes retirados da planta matriz com um estágio de desenvolvimento mais avançado (fase adulta - período de reprodução) apresentaram um índice elevado de contaminação, pois quanto mais velhas são as plantas doadoras maior o tempo em que ficaram expostas a intempéries e a insetos que provocam ferimentos permitindo assim, a entrada de microorganismos de natureza endógena e que não são expostos aos produtos desinfestantes.

Após 24 horas do plantio, os explantes escureceram-se totalmente, tornando-se pretos (Figura 6), possivelmente devido a forte assepsia empregada,

**Tabela 5:** Índice de contaminação verificada em explantes colhidos em épocas diferentes do ciclo de vida de yacon

<b>Época de colheita dos explantes</b>	<b>Contaminação (%)</b>
Início da brotação	$\pm 1,5$
Pré-floração e floração	Superior a 40



**FIGURA 6-** Explantes de yacon escurecidos após desinfestação e com calos formados após 17 dias em meio contendo 1,0mg/l de 2-4-D

pois uma desinfestação com álcool a 50% é muito forte para tecidos vegetais jovens. Verificou-se em um ensaio (explantes colhidos no início da floração) que o meio também escureceu-se, oxidando cerca de 45% dos explantes. Estes podem ter sido mal lavados em água autoclavada o que poderia favorecer a permanência de álcool e/ou hipoclorito de sódio na superfície dos mesmos. Esses resíduos da desinfestação provavelmente contribuíram com a liberação de níveis elevados de produtos fenólicos que estariam oxidando o meio e este por sua vez, os explantes. E essa oxidação pode ter retardado o início da calogênese se comparado com o tempo em que ela se deu em explantes colhidos no início da floração (tabela 6).

Os resultados dos diferentes meios de cultura utilizados encontram-se na tabela 7.

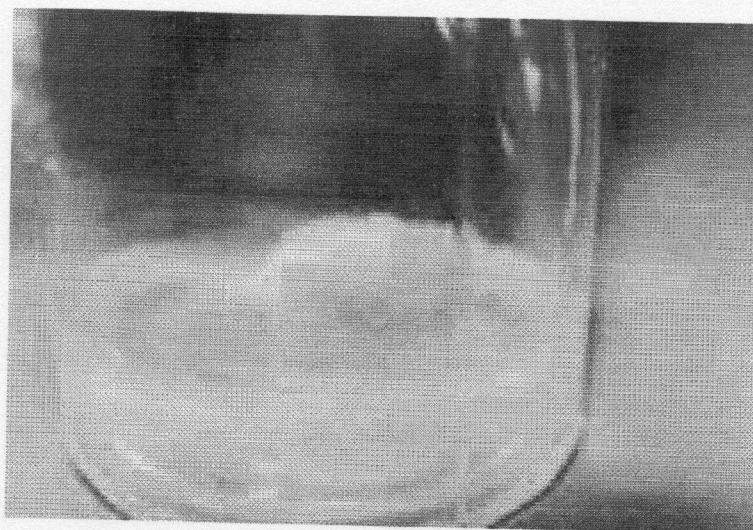
O meio de cultura inicial suplementado com 1,0mg/l de 2-4-D induziu a calogênese em 17 dias em primórdios foliares colhido no início da brotação do yacon (Figura 6), enquanto que nas épocas de pré-floração e de floração a calogênese se deu em 45 e 27 dias, respectivamente. Isto indica que as diferentes épocas do ciclo de vida do yacon, são fatores que interferem no início da calogênese, quando a concentração de auxina se mantém constante (tabela 06). MANTELL *et al.* (1994) relata que tanto a estação do ano quanto a fase de crescimento da planta matriz podem ser críticos na determinação do comportamento de explante na cultura.

O meio de cultura M<sub>2</sub> que continha 1,5mg/l de BAP, induziu o crescimento dos calos à acima de 60% do seu tamanho original (Figura7), mas não ao aparecimento de brotos, indicando que esta concentração de citocinina não é ideal para o cultivo de yacon, pois níveis elevados desse hormônio pode inibir o crescimento dos calos e pode também induzir o seu desenvolvimento (PEREIRA, comunicação pessoal).

No meio M<sub>3</sub> (sem reguladores de crescimento), os calos se desenvolveram

**Tabela 6:** Diferentes respostas de explantes colhidos em épocas distintas, mas com mesma concentração de hormônio para indução de calos

<b>Época de colheita dos explantes</b>	<b>Início da calogênese (dias)</b>	<b>Concentração de 2-4-D usada para a indução de calos</b>
Início da brotação	17	1,0mg/l
Pré-floração	45	1,0mg/l
Floração	27	1,0mg/l



**FIGURA 7-** Calo formado em meio contendo 1,5mg/l de BAP

de 15 a 25% a mais do seu tamanho original, mas houve o aparecimento de um único broto provavelmente pela ausência completa de reguladores de crescimento. Este resultado não foi relevante, mas isolou-se vários brotos do pré-existente (Figura 1), e mantidos neste mesmo meio onde cresceram sem maiores problemas.

O crescimento dos calos no meio que conteve 1,0mg/l de BAP (M<sub>4</sub>) foi de 30 a 55% do tamanho original mostrando que esta concentração também não é ideal, já que houve a indução de calos apesar da obtenção de um broto, cujo calo havia sido retirado do M<sub>3</sub>, onde havia ausência completa de reguladores de crescimento.

O meio M<sub>5</sub> que foi suplementado com 0,5mg/l de BAP não foi ideal para o crescimento de calos. Houve 100% de oxidação. Nos meios M<sub>6</sub> (com 0,8mg/l de BAP) e M<sub>7</sub> (1,0mg/l de BAP e 0,05mg/l de 2-4D) o índice de contaminação foi de 57,6% e não mais que 10%, respectivamente. A oxidação nos calos de yacon pode estar relacionada muito mais com a manipulação do material do que com o meio de cultura. Exemplo disso, é o contato do material vegetal com o instrumental aquecido e a desidratação do mesmo [GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1990 *apud* MAZZONETTO (1999)].

Os calos repicados para o meio M<sub>6</sub> cresceram de 15 a 25% e no meio M<sub>7</sub> acima de 60% indicando que a combinação desse reguladores é ideal para a calogênese, mas não para a indução de brotos adventícios.

Foram isolados 26 brotos dos pré-existentes, dos quais, apenas 13 foram plantados em campo e destes 8 sobreviveram. Esta perda de brotos pode estar relacionada com a clara distinção morfológica que se pode fazer de indivíduos mutantes. Eles possuíam aparência vitrificada e rugosa. Isto pode ter sido resultado da variação somaclonal que provavelmente também estaria selecionando as mudas negativamente às condições de luz, umidade, temperatura entre outros como má formação de raízes e deficiência nos vasos condutores assim como no processo de fotossíntese.

**Tabela 7:** Índice de calogênese, oxidação e formação de brotos adventícios no cultivo de yacon com a utilização de diferentes meios de cultura

Experimento	Tipos de meios	Concentração de hormônios		Calogênese*	Oxidação**	Formação de brotos adventícios***
		2-4-D (mg/l)	BAP (mg/l)			
I	M <sub>1</sub>	1,0	—	Significativa	Insignificativa	—
	M <sub>2</sub>	—	1,5	Muito significativa	—	—
	M <sub>3</sub>	—	—	Pouco significativa	—	Insignificativa
	M <sub>4</sub>	—	1,0	Significativa	—	Insignificativa
	M <sub>5</sub>	—	0,5	Insignificativa	Muito significativa	—
	M <sub>6</sub>	—	0,8	Pouco significativa	Significativa	—
	M <sub>7</sub>	0,05	1,0	Muito significativa	Insignificativa	—
II	M <sub>8</sub>	1,5	—	Muito significativa	—	—
	M <sub>9</sub>	0,10	1,0	Muito significativa	Significativa	—

\*: Insignificativa: 0 a 10% do tamanho original  
 Pouco significativa: 15 a 25% do tamanho original  
 Significativa: 30 a 55% do tamanho original  
 Muito significativa: acima de 60% do tamanho original

\*\* : Insignificativa: 10 a 20 %  
 Significativa: 40 a 60%  
 Muito significativa: 100%

\*\*\*: Insignificativa: 1 broto

— : ausência



#### 4.2 Experimento II:

A desinfestação dos explantes neste experimento foi mais eficiente (apenas 20% dos explantes se contaminaram) em comparação com os explantes do primeiro colhidos na época de floração (superior a 40%). Esse resultado pode ter sido devido às escovações da superfície foliar antes da desinfestação. Provavelmente a escova retirou esporos e/ou outros patógenos que não seriam eliminados apenas com as soluções utilizadas para a desinfestação.

Observou-se calogênese somente nos explantes da Classe C e da Subclasse D (folhas subjacentes ao primórdios foliares e primórdios foliares, respectivamente) sendo nesta em maior quantidade. Nas demais classes (tecido mais velho) não houve aparecimento de calos, por que "raramente se obtém culturas bem sucedidas, a partir de tecidos senis devido a sua pouca habilidade de totipotência" (MANTELL *et al.*, 1994).

Em M<sub>8</sub> a concentração de auxina utilizada (1,5mg/l) para a indução de calogênese foi muito eficiente para os explantes colhidos no fim da floração em comparação com a dose inicial do mesmo hormônio usado em M<sub>1</sub> (tabela 07). Talvez o aumento desta concentração é que tenha favorecido a indução de grandes calos.

O calos estabelecidos no meio M<sub>9</sub> enriquecido com 0,1mg/l de 2-4-D e 1,0mg/l de BAP cresceram mais de 60% do seu tamanho original, possivelmente pela combinação desses reguladores. A oxidação foi em torno de 47,4%.

O M<sub>3</sub> mostrou-se favorável para o crescimento dos calos, mas não houve surgimento de brotos como ocorreu no primeiro experimento. A recalcitrância (perda do potencial de regeneração das células cultivadas), pode ter sido um fator limitante no cultivo *in vitro* de yacon (MANTELL *et al.*, 1994). Isso poderia ser uma das explicações para a dificuldade de se encontrar um meio específico para a indução da parte aérea em calos de folhas da espécie em

questão.

Outros fatores como as condições de luz e de temperatura; a composição dos meios de cultura utilizados podem ter sido fatores que interferiram no surgimento de brotos de yacon a partir de calos. O acúmulo de gás como o etileno também pode limitar o desenvolvimento de brotos e promover a calogênese (MANTELL *et al.*, 1994).

## 5. CONCLUSÃO

- A desinfestação usada, 10 minutos em álcool a 50% e 15 minutos em solução de hipoclorito de sódio a 50% contendo três gotas de Tween, foi eficiente mantendo os índices de contaminação em uma taxa controlada, embora com o uso de uma escova em água corrente na superfície foliar antes da desinfestação, tenha diminuído os índices de contaminação.
- Os explantes provenientes de primórdios foliares colhidos no início da brotação apresentaram menor taxa de contaminação do que os de fases mais adiantadas no ciclo de vida do yacon.
- A dose ideal de 2-4 D para a indução de calos em primórdios foliares de yacon no início da brotação foi de 1,0mg/l. Para fases mais adiantadas de desenvolvimento foi de 1,5mg/l, embora novos experimentos sejam necessários para a confirmação destes resultados.
- Houve uma resposta diferenciada para a calogênese em relação à idade da planta-mãe, quando a concentração de auxina se manteve constante. Explantes provenientes da época da brotação desenvolveram calos num tempo menor que os demais explantes colhidos em períodos mais adiantados do ciclo de vida da planta.
- Não se obteve um meio de cultura específico, cuja concentração de

citocinina fosse ideal para o aparecimento de brotos adventícios, em grande escala. Entretanto o meio de cultura MS  $\phi$  (com ausência de fitohormônios) mostrou-se bom para o desenvolvimento dos brotos.

- Brotos de yacon possuem uma resistência à aclimação, e em condições de campo as mudas mostraram-se vigorosas.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) HERRERA, F.L. 1943. Plantas alimenticias y condimenticias indígenas del departamento del Cuzco. **Boletim del la Dirección General de Agricultura. Perú 14:48-51.**
- 2) ISEJIMA, E. M. 1997. Yacon como fonte de frutanos. *In: Bases racionais para utilização de uma nova cultura. I workshop de Yacon.* Botucatu, SP.
- 3) LEMONICA, I. P. 1997. Estudo dos efeitos hipoglicemiantes do extrato aquoso das folhas de *Polymnia sonchifolia* em ratas. *In: Bases racionais para utilização de uma nova cultura. I workshop de Yacon.* Botucatu, SP.
- 4) LINDSEY, K. 1991. **Plant Tissue Culture Manual.** Kluwer Academic Publishers.
- 5) MANTELL, S. H.; MATTHEWS, J.A. & McKEE, R. A. 1994. **Princípios de Biotecnologia em Plantas: uma introdução à engenharia genética em plantas.** Tradução de J.L. Azevedo *et al.*, Sociedade Brasileira e Genética, Ribeirão Preto, SP: 334.

- 6) MAZZONETTO, F. W. 1999. **Micropropagação de Abiu (*Pouteria caimito*) em meio "MS" modificado.** (Monografia apresentada para a obtenção do Título de Biólogo). Uberlândia: UFU: 27.
- 7) MURASHIGE, T. & SKOOG, F., 1962; A Revised Medium for Rapid growth and bioassays with Tobacco Tissue. **Physiologia Plantarum. 15:** 436-496.
- 8) TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. & BUSO, J. A. 1998. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas.** EMBRAPA/ ABCTP, Brasília, DF. 1: 509.
- 9) VIETMEYER, N. D. 1989. Yacon. *In:* National Research Council. **Lost crops of Incas: little known plants of the andes with promise for worldwide cultivation.** National Academy Press, Washington: 115-123.
- 10) VILHENA, S. M. C. 1997. Cultivo de Yacon (*Polymnia sonchifolia* Poep Endl.) no Brasil. *In:* Bases racionais para utilização de uma nova cultura. **I workshop de Yacon.** Botucatu, SP.
- 11) ZARDINI, E. 1991. Ethnobotanical notes on Yacon (*Polymnia sonchifolia* - Asteraceae). **Economic Botany. 45 (1):** 72-85.