

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
CURSO DE MESTRADO**

**AJUSTE DE PROTOCOLO PARA PRODUÇÃO DE MUDAS DE  
INHAME (*Dioscorea rotundata* POIR.) *IN VITRO***

**KARINE DA SILVA SIMÕES**

**CRUZ DAS ALMAS – BAHIA  
SETEMBRO - 2013**

AJUSTE DE PROTOCOLO PARA PRODUÇÃO DE MUDAS DE  
INHAME (*Dioscorea rotundata* POIR.) *IN VITRO*

**KARINE DA SILVA SIMÕES**

Engenheira Agrônoma

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2011

Dissertação submetida ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Agrárias, Área de Concentração: Fitotecnia.

**Orientador: Dr. Sebastião de Oliveira e Silva**

**Co-orientadora: Dr<sup>a</sup>. Lucymeire Souza Moraes Lino**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA  
MESTRADO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
CRUZ DAS ALMAS - BAHIA - 2013

## FICHA CATALOGRÁFICA

S593 Simões, Karine da Silva.

Ajuste de protocolo para produção de mudas de inhame (*Dioscorea rotundata* POIR.) *in vitro* / Karine da Silva Simões.\_ Cruz das Almas, BA, 20013.

111 f.; il.

Orientador: Sebastião de Oliveira e Silva

Coorientadora: Lucymeire Souza Morais Lino

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas.

1. Inhame – Cultivo. 2. Inhame – Propagação *in vitro*.

I. Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II. Título.

CDD: 635.23



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias

COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE  
KARINE DA SILVA SIMÕES

---

Membro Presidente: Prof. Dr. Sebastião de Oliveira e Silva  
Instituição: UFRB

---

Membro Externo à Instituição: Profa. Dra. Tatiana Góes Junghans  
Instituição: Embrapa Mandioca e Fruticultura

---

Membro Externo à Instituição: Prof. Dr. Nataniel Franklin de Melo  
Instituição: Embrapa Semiárido

Homologada em     /     /     .

**"Nunca ande pelo caminho traçado, pois ele conduz somente até onde os outros foram."**

**(Alexander Graham Bell)**

A meu pai José Benício Simões, minha mãe Cleonice Conceição e minha irmã  
Caliane Simões pelo amor incondicional, dedicação, compreensão e  
ensinamentos de vida.

**DEDICO**

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, que por sua graça e misericórdia me concedeu a vida, estando sempre ao meu lado iluminando meus caminhos, e permitindo que eu pudesse dar mais esse passo tão importante. Não tenho palavras meu pai para expressar todo amor e gratidão que sinto.

Aos meus pais José Benício e Cleonice, por todo amor e apoio, alicerces fundamentais em minha vida.

À minha irmã Caliane pelo seu companheirismo, amor e respeito.

Ao meu filhotinho por sempre está ao meu lado me trazendo alegrias, principalmente nos momentos mais difíceis, e fazendo com que a vida se tornasse mais leve.

À minha família em especial as minhas tias e a minha querida avó Maria Benedita, pelos seus valiosos conselhos, atenção e carinho.

Ao meu namorado Adriano pela cumplicidade, paciência, amizade, amor e carinho.

Ao meu orientador, Dr. Sebastião de Oliveira e Silva, pelo profissionalismo, atenção, amizade e exemplo de vida.

À Dr<sup>a</sup>. Lucymeire Souza Morais Lino que esteve presente durante toda a trajetória deste trabalho, contribuindo com sugestões, tirando dúvidas, além da amizade, compreensão e confiança.

Ao Pesquisador Dr. Antônio da Silva Souza pela importante colaboração na realização deste trabalho, confiança, atenção e amizade.

Ao pesquisador Dr. Carlos Alberto da Silva Ledo, pelos ensinamentos, sugestões e orientações.

À Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, pelo suporte técnico na realização deste trabalho.

À CAPES pela concessão da bolsa.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Ciências Agrárias da UFRB.

Aos amigos e funcionários do Laboratório de Cultura de Tecidos, Tânia, Honorato e Juraci que estiveram presentes em minha vida desde a graduação, contribuindo com seus ensinamentos, disposição, carinho e amizade.

Aos amigos e colegas do Laboratório, Mariane, Celma, Ádila, Daniela, Elaine, Renata, Camila, Maria Inês, Mariana, Helder, Silvocleio e Sandra pela ajuda, convívio, bons momentos de descontração, troca de experiências e companheirismo. Obrigada por tudo!

Ao amigo Benedito Conceição (Bizunga) pela colaboração inicial desse trabalho.

Aos colegas do curso de mestrado em Ciências Agrárias (Turma 2011) pelo convívio e amizade, em especial, Cleilton, Lívia, Viviane e Diane.

Aos amigos Letícia, Fernandilson, Annelyse, Kelly, Márcia, Ademir, Jair, Carlos Henrique, Pâmela e Adriane, pela constante força, incentivo e carinho.

Aos membros da Banca Examinadora, pela disponibilidade do tempo dedicado.

Por fim, agradeço todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho. A todos os meus sinceros e profundos agradecimentos.

**MUITO OBRIGADA!**



## SUMÁRIO

|   | Página |
|---|--------|
| RESUMO  |        |
| ABSTRACT  |        |
| INTRODUÇÃO.....   | 01     |
| <br>  |        |
| <b>Capítulo 1</b>   |        |
| AJUSTE DAS CONCENTRAÇÕES DO MEIO MS E DO ÁGAR PARA A MULTIPLICAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE INHAME DA COSTA ( <i>Dioscorea rotundata</i> POIR.) ..... | 23     |
| <br>  |        |
| <b>Capítulo 2</b>   |        |
| MICROPROPAGAÇÃO DE INHAME DA COSTA ( <i>Dioscorea rotundata</i> POIR.) SOB DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE BAP EM DOIS MEIOS DE CULTURA .....       | 47     |
| <br>  |        |
| <b>Capítulo 3</b>   |        |
| MICROPROPAÇÃO DE INHAME DA COSTA ( <i>Dioscorea rotundata</i> POIR.) EM DIFERENTES INTENSIDADES DE LUZ.....                                     | 75     |
| <br>  |        |
| CONSIDERAÇÕES FINAIS.....   | 99     |

## AJUSTE DE PROTOCOLO PARA PRODUÇÃO DE MUDAS DE INHAME (*Dioscorea rotundata* POIR.) *IN VITRO*

**Autora:** Karine da Silva Simões

**Orientador:** Sebastião de Oliveira e Silva

**Co-Orientadora:** Lucymeire Souza Morais Lino

**Resumo** - Apesar de sua grande importância na região Nordeste, o inhame ainda apresenta alguns fatores que limitam a produção, tais como manejo inadequado da cultura e o uso de túberas semente de baixa qualidade. A biotecnologia vem contribuindo com o uso de diferentes técnicas, destacando-se a micropropagação para a produção de material propagativo sadio. Este trabalho teve como objetivo estabelecer um protocolo para a propagação *in vitro* do Inhame da Costa. Utilizou-se microestacas de inhame pré-estabelecidas *in vitro* como explante inicial para montar os experimentos. Foram realizados três experimentos, sendo o primeiro para testar diferentes concentrações do meio MS; MS/2; MS/3 ou MS/4 suplementado com 5, 7 e 9 g L<sup>-1</sup> de ágar. O segundo testando os meios MS1 (contendo sais e vitaminas do MS) ou MS2 (sais e vitaminas do MS suplementado com 100 mg L<sup>-1</sup> de inositol, 20 mg L<sup>-1</sup> de cisteína, 0,20 mg L<sup>-1</sup> de ANA, 0,08 mg L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub>, e 7,5 g L<sup>-1</sup> de ágar) testando diferentes concentrações de BAP (0; 0,05; 0,15; 0,45; 1,35 e 4,05 mg L<sup>-1</sup>). Todos os meios de cultura foram suplementados com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose. No terceiro experimento microestacas de inhame foram inoculadas no meio MS2 e cultivadas em dois ambientes de cultivo com diferentes intensidades de luz: T1 - 100% de iluminação em sala de crescimento (SC); T2 - 70% de iluminação em SC; T3 - 50% de iluminação em SC e T4 - 30% de iluminação em SC; T5 - 100% de iluminação em BOD; T6 - 70% de iluminação em BOD; T7 - 50% de iluminação em BOD e T8 - 30% de iluminação em BOD. O meio MS/3 + 7 g L<sup>-1</sup> de ágar foi mais eficiente para o desenvolvimento das plantas *in vitro*, já o meio MS2 sem ou com a adição de 0,05 mg L<sup>-1</sup> de BAP promoveu o melhor desenvolvimento no cultivo *in vitro* do inhame, ambos aos 120 dias de avaliação. Nas condições avaliadas, as plantas de inhame quando cultivadas com 100% da intensidade de luminosidade em sala de crescimento na temperatura de 27°C apresentaram melhor desenvolvimento.

**Palavras chave:** Ágar, BAP, intensidade de luz.

## ADJUST THE PROTOCOL FOR PRODUCTION PLANTS OF YAM (*Dioscorea rotundata* POIR.) *IN VITRO*

**Author:** Karine da Silva Simões

**Adviser:** Sebastião de Oliveira e Silva

**Co-Adviser:** Lucymeire Souza Morais Lino

**Abstract** - In spite of its great importance in the Northeast region, the yam still presents some factors that limit the production, such as inadequate management of culture and the use of tubers seed of low quality. Biotechnology has been contributing with the use of different techniques, highlighting the micropropagation for the production of healthy nursery material. This study aimed to establish a protocol for the *in vitro* propagation of yam Coast. It was used microcuttings of yam pre-established *in vitro* as initial explant to assemble the experiments. Three experiments were performed, the first being to test different concentrations of the MS; MS/2; MS/3 and MS/4 medium supplemented with 5, 7 and 9 g L<sup>-1</sup> agar. The second testing the medium MS1 (containing salts and vitamins of MS) and MS2 (salts and vitamins of MS medium supplemented with 100 mg L<sup>-1</sup> of inositol, 20 mg L<sup>-1</sup> of cysteine, 0,20 mg L<sup>-1</sup> NAA, 0,15 mg L<sup>-1</sup> BA, 0,08 mg L<sup>-1</sup> of GA<sub>3</sub>, and 7,5 g L<sup>-1</sup> agar) testing different concentrations of BA (0; 0,05; 0,15; 0,45; 1,35 and 4,05 mg L<sup>-1</sup>). All culture media were supplemented with 30 g L<sup>-1</sup> sucrose. The third experiment microcuttings of yam were inoculated on medium MS2 and cultured in two cultivation environments with different light intensities: T1 - 100% of lighting in growth room (GR); T2 - 70% of lighting in GR; T3 - 50% of lighting in GR; T4 - 30% of lighting in GR; T5 - 100% of lighting in BOD; T6 - 70% of lighting in BOD; T7 - 50% of lighting in BOD and T8 - 30% of lighting in BOD. The medium MS/3 + 7 g L<sup>-1</sup> agar was more efficient for the development of *in vitro* plants, already the medium MS2 without adding or adding 0,05 mg L<sup>-1</sup> BA promoted the best development in the *in vitro* cultivation of yam, both at 120 days of evaluation. Under the conditions evaluated, the yam plants when grown with 100% of the light intensity in growth room at temperature 27°C showed better development.

**Key words:** Agar, BA, light intensity.

## INTRODUÇÃO

### A Cultura do Inhame

O inhame é uma planta do gênero *Dioscorea* pertencente à família Dioscoreaceae, que apresenta aproximadamente 600 espécies, 14 das quais têm seus tubérculos utilizados como alimento. É o único gênero comestível da família Dioscoreaceae, presente em todas as regiões do Brasil. No entanto, a maioria das espécies é pouco estudada (PEDRALLI, 2002). As espécies de *Dioscorea* cultivadas são originadas das zonas tropicais da Ásia e do Oeste da África (SANTOS, 1996). Dentre essas, as mais importantes, por suas túberas comestíveis são: *D. cayennensis* Lam. (Inhame Amarelo), *D. rotundata* Poir. (Inhame Branco), *D. alata* L. Many (Inhame Água), *D. trifida* L. e *D. esculenta* L. Schott (SANTOS, 1996).

O gênero *Dioscorea* é uma monocotiledônea, cuja estrutura de reserva é conhecida como tubérculo (SANTOS, 1996). Nesse gênero as espécies são herbáceas, anuais, dióicas, de flores pequenas rosadas ou creme. Os frutos são cápsulas deiscentes e a polinização é entomófila (MONTEIRO, 2002). Essa planta se desenvolve, satisfatoriamente, em clima tropical quente e úmido, sob condição de regime pluvial de 1.000 a 1.600 mm anuais, com temperatura ótima diária de 24 a 39 °C e umidade relativa do ar de 60 a 70%. Produz bem em solos de textura arenosa e média, profundos, bem drenados e arejados, férteis e ricos em matéria orgânica, com pH de 5,5 a 6,0 (SANTOS et al., 2006). O seu cultivo ocorre em regiões de altas temperaturas, sendo a África Ocidental e África Central responsáveis por aproximadamente 95% da produção mundial (MESQUITA, 2002).

As folhas de inhame têm uma grande variabilidade quanto ao tamanho, forma e cor. Geralmente, é simples, com margens lisas, e ápice pontiagudo, sem pubescência e o pecíolo é longo, alado ou espinhoso. A base do pecíolo pode ter um par de espinhos em *D. esculenta*, ou estrutura com a forma de orelha em *D. bulbifera* e *D. alata* ou simplesmente apresentar uma pretuberância, no caso de *D. rotundata* e *D. cayenensis* (VEGA, 2012). As plantas do gênero *Dioscorea* geralmente são dióicas, ou seja, têm apenas flores masculinas ou flores femininas e como caso excepcional são relatadas plantas monóicas, no entanto, muitas

cultivares não florescem devido a influência do ambiente no qual se desenvolvem (SANTOS, 2006).

As flores masculinas produzem panículas nas axilas das folhas, cada flor tem três sépalas, três pétalas e três a seis estames. A estrutura da flor apresenta uma cor esbranquiçada ou cinza e não é muito atraente. A flor feminina é maior do que a masculina e se dá em forma de espiga nas axilas das folhas, consiste em três sépalas, três pétalas e um ovário inferior (SANTOS, 2006).

Montaldo (1972) relatou que é difícil o uso de sementes verdadeiras na cultura de inhame, pois as espécies alimentícias, em sua grande maioria, apresenta raro florescimento dificultando a sua utilização. Outro fator que dificulta o cruzamento natural, segundo Zoundjihekpon et al. (1997), é a diferença entre a época de florescimento das plantas femininas e masculinas, ou seja, as plantas masculinas têm o florescimento vinte e cinco dias mais cedo que as femininas para algumas plantas do gênero *Dioscorea*.

O rizoma é uma estrutura que ocorre na fase inicial de desenvolvimento da planta. Fica localizado na base da haste e aparece depois de emitidos os primeiros brotos que formam as folhas. Uma vez desenvolvido, o rizoma emitirá as raízes principais da planta de inhame e dará origem ao tubérculo, cuja estrutura é a junção ou reunião tubérculo, caule e raiz. O rizoma, quando é pouco desenvolvido, pode permanecer anexado ao tubérculo depois da colheita, como nas espécies de inhame crioulo (*D. alata*) ou pode estar separado do tubérculo. Por ser uma estrutura bem diferenciada, às vezes dá origem a uma nova produção de tubérculos, como no caso das espécies de inhame com espinhos (*D. rotundata*) (VEGA, 2012).

As espécies mais utilizadas se caracterizam por apresentar tubérculos de coloração castanha clara a escura e massa branca a creme em *D. alata*, de castanha clara a escura e massa branco-amarelo a amarelo em *D. cayenensis* e coloração marrom e massa branca em *D. rotundata* (PEDRALLI, 2002).

As principais espécies cultivadas no Brasil são *D. alata* (cultivares Cará São Tomé, Cará Mandioca e Cará Flórida) e *D. rotundata*, cujas cultivares principais são: Cará Tabica, Cará Negro, Cará-da-Costa e Inhame da Costa. Na Bahia, a cultivar mais plantada é o Inhame da Costa (MESQUITA, 2002).

Segundo Santos (2006) é comum em algumas regiões ocorrer confusão quanto as principais espécies de inhame cultivadas. A espécie *D. cayenensis* é

originária do oeste da África, apresenta raízes tuberosas alongadas, de cor castanha clara, caule volúvel, folhas opostas e raramente alternadas, lâmina oval a sub-oblonga com sete a nove nervuras principais. A espécie *D. rotundata* também originária do oeste da África, é considerada por alguns botânicos como subespécie da *D. cayennensis*, mas parece ser distinta agronomicamente, pois pode crescer em regiões de estação seca prolongada e as túberas têm uma dormência pronunciada permitindo estender o armazenamento por um período maior e em boas condições. A planta apresenta caule volúvel, cilíndrico, folhas opostas, longamente pecioladas, ovaladas de base arredondada, pecíolo delicado com 5 cm de comprimento. A *D. alata* é uma espécie originária do continente Asiático, sendo conhecida como Inhame Água. Esta espécie apresenta bom desenvolvimento em áreas com período de chuva prolongado, pois requer no mínimo 1.500 mm de chuva para máxima produção. A planta apresenta caule quadrado, alado, verde a púrpura com acúleos, folhas de tamanho variável, oposta oval, cordada, acuminada, globosa.

### **Estádios de desenvolvimento**

De acordo com Silva et al. (2012) durante o ciclo de vida, o inhame passa por diversas fases, que podem ser definidas como: dormência, crescimento vegetativo, fase reprodutiva e fase de maturação.

O período de dormência é caracterizado por uma paralisação no desenvolvimento dos meristemas (gemas) que se encontram na superfície das túberas. Após a colheita, o material destinado ao próximo plantio (túberas semente) deve ser acondicionado em um local sombreado, arejado e protegido, permanecendo por um período de 20 a 40 dias, tempo necessário para que as gemas retomem suas atividades mitóticas (fim da dormência), o que é caracterizado pela formação de brotações nas túberas, estando prontas para o seccionamento.

Após a brotação inicia-se a fase vegetativa com o desenvolvimento do caule aéreo. A princípio, formado apenas por uma estrutura cilíndrica, sem folhas, constituindo uma fase lenta do desenvolvimento até a formação das primeiras folhas, quando ocorre uma aceleração no crescimento cerca de 30 dias, com a formação das ramificações laterais primárias. Em prosseguimento, no mês

seguinte formam-se as ramificações laterais secundárias. Vale ressaltar que neste período a túbera semente passa por um processo contínuo de decomposição, reduzindo o tamanho à medida que os nutrientes são transferidos para a nova planta. No início desta fase, são emitidas as primeiras raízes o que pode acontecer simultaneamente com a brotação da parte aérea.

A nova túbera inicia seu desenvolvimento por ocasião da formação das ramificações secundárias, ocorrendo ao lado da túbera semente já praticamente decomposta. Esta fase é encerrada com o aparecimento das inflorescências em forma de espiga, cerca de 4 a 5 meses após o plantio.

Com a formação das flores é iniciada a fase reprodutiva apresentando uma duração entre 30 e 40 dias e corresponde ao período em que a nova túbera apresenta um rápido crescimento e a planta alcança seu tamanho máximo. Com a senescência das flores esta fase é encerrada. As inflorescências se apresentam secas, enegrecidas e este é o momento indicado para se realizar a capação. Após esta fase a planta inicia um processo de regressão com perda de folhas e murcha de ramificações e caule. A túbera ainda cresce neste período até atingir seu tamanho máximo, ocorrendo a conclusão do ciclo da planta.

### **Importância sócio-econômica do inhame**

A área produzida com inhame no mundo é de 4,9 milhões de hectares com uma produção de 51,7 milhões de toneladas, o que corresponde a um rendimento aproximado de 10,5 t ha<sup>-1</sup>. A Nigéria produz 67% do inhame produzido no mundo. No Brasil são cultivados 27.000 ha de inhame e produzidas 244.000 t de túberas, o que equivale a um rendimento de 9,3 t ha<sup>-1</sup> (FAO, 2013). As espécies *D. rotundata* e *D. alata* são reconhecidas como as hortaliças mais cultivada no Brasil, em sistema de agricultura familiar. Na região Nordeste aproximadamente 90% do inhame produzido é oriundo de pequenos produtores, carentes de informações tecnológicas capazes de elevar o rendimento e reduzir custos de produção (OLIVEIRA, 2002). A cultura desempenha importante papel sócio-econômico nas regiões Sudeste (Rio de Janeiro, Minas Gerais, Espírito Santo e São Paulo) e principalmente, no Nordeste, em especial nos estados da Paraíba, Pernambuco, Bahia e Alagoas, responsáveis por aproximadamente 90% do inhame produzido no Brasil. Nessa Região a cultura presta grande contribuição ao desenvolvimento

rural regional, pela produção de túberas que contribuem na solução do problema da demanda reprimida de alimentos, como também na geração de emprego e renda aos pequenos produtores (MESQUITA, 2002; SANTOS; MACEDO, 2002). Os principais municípios produtores de inhame no Estado da Bahia são Maragogipe, Cruz das Almas, São Felipe e São Félix, localizados na região do Recôncavo, com destaque para o município de Maragogipe, atualmente maior produtor de inhame do estado (SILVA et al., 2012). Nesse Município, a cultura do Inhame da Costa é responsável por 37% da renda dos pequenos produtores. A produção brasileira é destinada em grande parte ao mercado interno, sendo também exportada, principalmente, para a Europa (MENDES et al., 2003).

Para que as plantas de inhame (*D. rotundata*) se desenvolvam e tenham uma boa produção de túberas, sua haste exige um apoio para enrolar, enquanto outras espécies como a *Dioscorea alata*, podem desenvolver seus caules prostrados (MINAG, 2008).

O inhame é uma espécie tuberosa de alto potencial, rica em vitaminas do complexo B, (contendo altos teores de tiamina, riboflavina, niacina), vitamina A, ácido ascórbico, carboidratos e grãos de amido (responsáveis pela alta digestibilidade), constituindo-se alimento básico para população de baixa renda e pode ainda ser utilizada na agroindústria (MASCARENHAS, 2002; SANTOS; MACEDO, 2002)

A exploração do inhame constitui uma alternativa viável para a agricultura nordestina, isso porque nas zonas produtoras dessa Região, encontram-se condições edafoclimáticas favoráveis para o desenvolvimento e produção dessa cultura em caráter altamente econômico. Soma-se a isso o grande potencial de expansão de sua área de cultivo, possibilitando maior produção e aumento na exportação para os grandes centros consumidores do sul do País, ou para o mercado externo. As túberas de alto valor nutritivo e energético são utilizadas na alimentação da população de várias classes sociais da população brasileira (MESQUITA, 2002).

Apesar de cultivado em vários continentes, o inhame (*Dioscorea* sp.) ainda apresenta limitações na produtividade. No Nordeste do Brasil os principais fatores responsáveis pela baixa produtividade, em torno de 9,3 t ha<sup>-1</sup>, são o manejo inadequado da cultura e o uso de túberas semente de baixa qualidade (desuniformidade no tamanho e na maturação, além de ferimentos nas túberas



que facilitam a contaminação por microrganismos do solo). A indisponibilidade de material vegetal de melhor qualidade e o elevado custo das túberas semente, que representa cerca de 60% do custo de produção de inhame, constituem problema crucial para aumento na produção dessa cultura (CAZÉ FILHO, 2002).

O desenvolvimento de novas tecnologias em complementação às atualmente disponíveis contribuirá inquestionavelmente para a melhoria da produtividade e da qualidade do inhame, possibilitando assim, a oferta de um produto de qualidade que atenda as exigências dos mercados consumidores, o que poderá incrementar de forma significativa as exportações e a geração de emprego e de renda (SANTOS; MACÊDO, 2002).

### **Propagação vegetativa**

A propagação do inhame por sementes sexuais apresenta dificuldades porque são plantas dióicas e com flores pequenas. Para manter a sua elevada heteroziguidade a cultura é propagada vegetativamente. Para isso, usam-se os segmentos de caules, bulbilhos axilares e tubérculos inteiros ou cortados (KADOTA; NIIMI, 2004).

Diversos autores, entre eles Silva (1983) e Santos (1996), descreveram a técnica tradicional da "capação", em colheita precoce, como sendo a forma mais utilizada na produção de túberas-semente, que são menores que as comerciais. Essas são posteriormente usadas no plantio inteiras ou cortadas em tamanho grande. As túberas inteiras são de melhor qualidade, como material de propagação, por serem totalmente cobertos pela epiderme, que não permitem a penetração de patógenos causadores de enfermidades (SANTOS,1996). A brotação desuniforme dessa semente tem acarretado perdas consideráveis aos produtores, devido à morte dos tubérculos, ocasionada por ataques de insetos e de patógenos no solo e pelas intempéries que danificam as gemas de brotação (SANTOS, 1998).

A colheita do inhame pode ser realizada aos sete meses, quando associada à "capação", ou aos nove meses, quando a planta completa seu ciclo de vida. A primeira colheita é realizada com o objetivo de se obter túberas para comercialização no período de entressafra e proporcionar a produção futura de sementes e a segunda, caso não tenha sido efetuada a prática da "capação", é

realizada com o objetivo de se obter a produção de túberas maduras (SANTOS, 1996). Agricultores geralmente utilizam de 10% a 30% da colheita para produção de sementes ou material de plantio para a próxima safra. As túberas pequenas ou grandes são cortadas em pedaços, chamados de mini sementes, antes do plantio. Sob a forma de pequenas túberas o inhame é mantido ano após ano, o que pode deteriorar a qualidade da muda, com o acúmulo de doenças, fator que também afeta a germinação e desenvolvimento da cultura (LEBOT, 2009).

### **Clonagem *in vitro***

A micropropagação pode melhorar a qualidade da muda de inhame produzida. Apesar disso, quase nenhuma informação existe na literatura especializada sobre o tema, para as condições brasileiras.

Estudos sobre cultura de tecidos vegetais têm auxiliado no melhor entendimento da fisiologia do crescimento de regiões isoladas da planta, sem a interferência dos efeitos das demais partes do vegetal, eliminando-se, também, a influência do meio ambiente. A grande capacidade de regeneração dos tecidos vegetais cultivados *in vitro* se deve, fundamentalmente, à totipotencialidade das células vegetais, que permite manifestar, em momentos diferentes e sob estímulos apropriados, a potencialidade de iniciar um novo indivíduo multicelular (KERBAUY, 1999).

A multiplicação *in vitro* apresenta várias vantagens sobre os métodos convencionais de propagação, pois permite a obtenção de um grande número de mudas em um curto período de tempo e em espaço físico reduzido, além de possibilitar a produção de plantas isentas de patógenos (TORRES et al., 1998).

Os resultados de pesquisa sobre micropropagação do inhame (*Dioscorea* sp.) são escassos e não satisfazem as expectativas de sua clonagem, em larga escala (SANTOS; MACÊDO, 2002).

As diferentes técnicas de cultivo *in vitro* de órgãos vegetais desempenham fundamental papel na propagação vegetativa ou regeneração de espécies e cultivares que se deseja trabalhar. A utilização de uma determinada técnica, depende do objetivo que se persegue e a capacidade de regenerar plantas está determinada pelo genótipo, pelas condições de cultivo, nutrientes, reguladores de crescimento e pelo estado fisiológico da planta (CAZÉ FILHO, 2002). Mantell e

Hugo (1989) relatam que alguns componentes do meio de cultura são fundamentais para o processo de obtenção de plantas *in vitro* de certas espécies de *Dioscorea*. Compostos como sacarose, reguladores de crescimento, especialmente citocininas, auxinas e ácido abscísico associados a manutenção das culturas sob fotoperíodo são indispensáveis nesse processo. As técnicas de cultivo *in vitro* têm sido bastante utilizadas em todo o mundo, para a clonagem de plantas, sendo as de micropropagação as mais utilizadas. Dentre elas, destacam-se o microestaqueamento (segmento nodal, ápice caulinar, etc.) e o cultivo de meristemas (CALDAS et al., 1998).

De acordo com Coleman e Coleman (2000), o uso de reguladores de crescimento no meio de cultivo, como o BAP, tem como objetivo acelerar a microtuberização, e diminuir o tempo de dormência. Há um aumento na quantidade e peso dos microtubérculos obtidos a partir do cultivo com BAP sob condições de baixa temperatura e fotoperíodo curto (GOPAL et al., 1998).

No Brasil, embora os resultados de pesquisa sobre micropropagação do inhame, ainda sejam escassos, não satisfazendo as expectativas de clonagem da espécie em larga escala, é possível desenvolver uma metodologia para produção de muda de inhame *in vitro* que possibilite obter grande quantidade de plantas de alta qualidade agrônômica, em qualquer época do ano, com o máximo aproveitamento do propágulo vegetal, e em curto espaço de tempo (SANTOS et al., 2002).

Para a obtenção de material isento de doenças tem-se utilizado o cultivo de meristemas, que trabalhado adequadamente, pode proporcionar boa taxa de regeneração de planta livre de enfermidades, conseqüentemente, melhorar a qualidade do produto e a produtividade da cultura, com ganhos na relação custo/benefício. Esta metodologia é utilizada para algumas espécies de propagação vegetativa como batata (*Solanum tuberosum* L.) e mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) (SITA et al., 1976).

A propagação rápida de clones de *Dioscorea cayenensis*, *D. alata*, tem sido estudada, em todo o mundo, principalmente para selecionar genótipos livres de doenças virais (VEGA, 2012). No entanto, os protocolos desenvolvidos para a micropropagação de *D. cayenensis* e *D. rotundata* são caracterizados pela utilização de meios de crescimento semi-sólidos e frascos de cultura com tamanho convencional, o que limita as possibilidades de automatização da

multiplicação (ONDO et al., 2007). Estas foram algumas das causas do lento crescimento e multiplicação de segmentos nodais, que limita o uso da micropropagação para produção comercial de sementes, devido aos elevados custos relacionados com a obtenção de propágulos (BALOGUN et al., 2006).

A clonagem do inhame *in vitro* foi possível em meio de culturas MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) modificado e suplementado com cinetina, ácido indolbutírico e benzilaminopurina. A tuberização *in vitro* foi conseguida em meios de culturas suplementados com cinetinas, aos 120 - 159 dias após a inoculação dos explantes (SANTOS, 2002).

Estudos foram realizados para comparar o potencial de regeneração de plantas de *D. alata* micropropagadas, onde os resultados mostraram uma regeneração de 100% dos explantes a partir de material *in vitro* mantido em meio D-571 (BORGES et al., 2001) suplementado com 1,5% de Manitol + 0,1 mg L<sup>-1</sup> BAP + 2 g L<sup>-1</sup> de carvão ativado (BORGES et al., 2004). Também tem sido testada a otimização de meios de cultura para a micropropagação de *D. alata*, clone Caraqueño por meio da aplicação de diferentes agentes antioxidantes, concentrações de sais do MS e de reguladores crescimento, resultando numa resposta variada na dependência dos tratamentos utilizados (BORGES et al., 2011).

Visando otimizar um protocolo de micropropagação para produção de mudas de inhame (*Discorea multiflora* Griseb) em escala comercial, Souza et al. (2011) utilizaram segmentos nodais subcultivados em meio MS sólido, que posteriormente foram transferidos para multiplicação em meio MS suplementado com BAP e meio MS suplementado com BAP acrescido de diferentes concentrações de sacarose. Para o enraizamento, as brotações foram cultivadas em meio MS suplementado com AIB ou ANA. Eles observaram que os melhores resultados de multiplicação e enraizamento foram obtidos em meio MS + 0,1 mg L<sup>-1</sup> de BAP (80%) e em meio MS + 1,0 mg L<sup>-1</sup> de AIB (42,6%), respectivamente, constatando que o protocolo de micropropagação é efetivo e pode ser usado para a produção em escala comercial.

Estudos realizados com diferentes explantes, meios de cultivo, reguladores de crescimento, condições de incubação, e métodos de propagação *in vitro*, revelaram a possibilidade de se definir protocolos de laboratório capazes de alcançar os objetivos desejados, ou seja, a clonagem em larga escala. Está

determinado que o tipo de explante utilizado, o meio de cultura e as diferentes concentrações e a relação auxina/citocinina influenciam diretamente na micropropagação do inhame (MITCHELL et al., 1995).

Apesar dos resultados obtidos, continuam as expectativas para obtenção de protocolo de clonagem, ou produção de muda em larga escala para *Dioscorea* spp. no Brasil. Novas pesquisas necessitam ser desenvolvidas, na busca de obter material propagativo (muda) em quantidade e com características agrônomicas desejáveis. As diferentes técnicas de cultivo *in vitro* de órgãos ou tecidos vegetais desempenham papel importante na micropropagação ou regeneração de espécies de plantas que se deseja trabalhar.

### **Importância da intensidade de luz**

A utilização da luz natural apresenta inúmeras vantagens sobre o sistema de iluminação tradicional, no que se refere às alterações morfofisiológicas das plantas. Entre elas, destacam-se: aumento no crescimento das plantas micropropagadas, melhoria das características fisiológicas, pelo fato de as condições ambientais de cultivo serem semelhantes às aquelas naturais de desenvolvimento das plantas, e, conseqüentemente, reduzir o estresse da planta durante o transplante para ambiente *ex vitro* (ERIG; SCHUCH, 2005).

A luz é um fator fundamental para as plantas, pela ação direta ou indireta na regulação de seu crescimento e desenvolvimento (MORINI; MULEO, 2003). As respostas da planta não dependem apenas de ausência ou presença de luz, mas também da variação em qualidade e intensidade de luz (FELIPPE, 1986). Para melhorar a captação da energia luminosa para a fotossíntese, as plantas desenvolveram uma série de fotorreceptores que regulam seu crescimento e desenvolvimento em relação à presença, quantidade, intensidade, direção, duração e qualidade da radiação luminosa incidente (MORINI; MULEO, 2003). Segundo Pinto et al. (2007), cada espécie responde de maneira distinta ao sombreamento.

A anatomia das folhas, em particular, pode ser muito afetada pelas condições do meio, pois é o órgão vegetal de maior plasticidade, com grande capacidade de adaptação de suas estruturas internas, o que lhe confere amplo potencial de aclimação (BJORKMAN, 1981). Ela pode ser um forte indicador da disponibilidade de luz durante as fases de crescimento das plantas. Assim,

aumento dos níveis de luz proporciona aumentos na espessura foliar, massa foliar, epiderme, parênquima e número total de células das folhas (LEE et al., 2000). Já folhas crescidas em baixa radiação apresentam mais clorofila por unidade de peso ou volume foliar, porém, o conteúdo de clorofila por unidade de superfície foliar é menor do que aquele das folhas crescidas em radiações maiores e a proporção de clorofila a/b diminui à medida que diminui a radiação (BOARDMAN, 1997).

O crescimento, a massa seca e a adaptação da planta ao ambiente relacionam-se à sua eficiência fotossintética e esta depende, dentre outros fatores, dos teores de clorofila. A síntese e a degradação das clorofilas estão sob o efeito direto da intensidade de luz, ocorrendo decomposição maior sob elevada radiação e maior equilíbrio, em baixa taxa luminosa (ENGEL; POGGIANI, 1991).

Salas de crescimento, geralmente, são equipadas com lâmpadas fluorescentes que emitem luz branca de similaridade espectral entre as bandas. A irradiância fornecida primariamente na sala de crescimento afeta o desenvolvimento das plantas, principalmente por meio de alterações fotomorfogênicas, que são observadas, principalmente, na formação dos tecidos do mesófilo e na ineficiência do mecanismo de abertura e fechamento dos estômatos, afetando sua funcionalidade (REZENDE, et al., 2008).

Estudos da qualidade de luz na micropropagação ainda são escassos e também não são conclusivos quanto aos efeitos do espectro e de níveis de irradiância no crescimento de plantas durante o cultivo *in vitro*. Alguns estudos revelam que, com a variação na qualidade da luz, pode-se manipular o crescimento *in vitro* de diversas espécies, de maneira alternativa à adição de reguladores de crescimento ao meio de cultura. A qualidade espectral afeta também estruturalmente a anatomia das folhas, parecendo exercer maiores efeitos durante a expansão foliar (DOUSSEAU, et al., 2008).

Kodym e Zapata-Arias (1999) afirmam que além dos reguladores de crescimento, a intensidade da luz também influencia consideravelmente a taxa de multiplicação e o crescimento de explantes cultivados *in vitro*. Esses autores observaram que o número de brotos por explante de bananeira foi maior sob luz natural, do que sob o cultivo convencional com iluminação artificial. Uma provável explicação para elevação nas taxas de multiplicação na luz solar, é que a intensidade de luz elevada poderia estar reduzindo as concentrações de auxinas

endógenas das gemas através da fotoxidação, provocando um deslocamento do balanço hormonal em direção às citocininas (RADMANN et al., 2001)

Apesar de cultivado sob luz direta Rubatzky e Yamaguchi (1997) relataram que o inhame é tradicionalmente explorado em consórcio com coco, milho e outras culturas em alguns países da América Central, demonstrando apresentar certa tolerância ao sombreamento (GOENAGA,1995). A possível tolerância ao sombreamento, associada ao ciclo cultural longo, são características que vislumbram a possibilidade da associação do inhame com outras culturas de maior porte. Todavia, pesquisas envolvendo a tolerância do inhame ao sombreamento são limitadas (OLIVEIRA, 2004). Portanto, determinar a intensidade e a época de sombreamento tolerado pela cultura, torna-se de fundamental importância como subsídio para o estabelecimento de associação do inhame com culturas de maior porte.

### **Melhoramento genético**

A maioria das variedades cultivadas são acessos selecionados pelos agricultores entre as variedades locais antigas. O melhoramento de inhame pode ser comparado a de outras culturas tuberosas como batata ou mandioca que não tem sido realizado com sucesso até recentemente. Somente nos anos de 1960 foram iniciados os primeiros trabalhos de melhoramento de inhame comestível. O trabalho foi iniciado com *D. trifida* no Caribe (DEGRAS, 1969), seguido com *D. rotundata* nos anos 1970 na Nigéria (SADIK; OKEREKE, 1975), e só recentemente nos anos 1980 com *D. alata* na Índia (ABRAHAM et al., 1986). A falta de conhecimento sobre a origem, diversidade e genética dessas espécies têm limitado muito a eficiência dos programas de melhoramento genético.

Os progressos obtidos recentemente foram graças ao uso de diferentes ferramentas biotecnológicas e, em particular a marcadores moleculares, técnicas citogenéticas e cultura *in vitro*. O conhecimento essencial foi adquirido recentemente sobre nível de ploidia e o número básico de cromossomos das três principais espécies cultivadas: *D. rotundata*, *D. alata* e *D. trifida* (SCARCELLI et al., 2005). Com base nas análises de segregação de microssatélite, Scarcelli et al. (2005) e Bousalem et al. (2006) chegaram a conclusão de que *D. rotundata* e *D. trifida*, espécies, previamente assumidas ser tetraplóide e octoplóide,

respectivamente, são na verdade diplóide ( $2n = 40 = 2x$ ) e tetraplóide ( $2n = 80 = 4x$ ), respectivamente. Outro recente estudo, também baseado em análises de segregação de microssatélites revelou que os acessos de *D. alata* com  $2n = 40$ , 60 e 80 cromossomos são diplóides, triplóides e tetraplóides respectivamente, e não tetraplóides, hexaplóides e octoplóides como normalmente assumidos (ARNAU et al., 2009). Acrescenta-se ainda que esses resultados foram confirmados por padrões de segregação de isoensima para espécies de *D. rotundata*. Esses três estudos foram definitivos para evidenciar que o número básico de cromossomos dessas espécies seria  $x = 20$  e não  $x = 10$  como se acreditava antes.

### **Recursos genéticos**

O conceito de recursos genéticos refere-se a todo material de uso potencial para o melhoramento genético para rendimento, adaptabilidade, qualidade e resistência às doenças. Isto inclui variedades antigas, ancestrais selvagens, espécies relacionadas e coleção de trabalho do melhorista (GUERRA et al., 1998).

Em vários países do mundo, a exemplo, Fiji, Nova Caledônia, Papua Nova Guiné, Ilhas Salomão e Vanuatu existem bancos de germoplasma de espécies de *Dioscorea* sp., no entanto, o germoplasma com maior número de acessos é o IITA (2013), mantido na Nigéria. Esse banco de Germoplasma inclui oito espécies e em torno de 3.200 acessos. A maioria dos acessos foi introduzida do Oeste da África e da África Central, e *D. rotundata* perfaz aproximadamente 67% da coleção. Todos os acessos são mantidos em campo, em cultivos anuais, mas 1.544 desses estão também conservados *in vitro*, como plantas em cultura de tecidos. Uma coleção básica, de 391 acessos de seis espécies, tem sido definida com base em características morfológicas (MAHALAKSHMI et al., 2007).

Independente da técnica a ser utilizada, os principais objetivos da maioria dos programas de melhoramento de inhame, incluem alta estabilidade de rendimento de túberas comerciáveis, túbera de qualidade (em termos de conteúdo de massa seca, boa textura no cozimento, sabor, período de dormência), resistência aos estresses bióticos no campo e durante a estocagem pós-colheita, tolerância a estresses abióticos (seca e baixa fertilidade), e



adequação aos sistemas de cultivo prevalentes (arquitetura de planta, vigor, e período de maturidade (MIGNOUNA et al., 2007).

Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi adequar às condições do meio de cultura, as concentrações de ágar e de benzilaminopurina (BAP) e as intensidades de luz, visando estabelecer um protocolo eficiente de micropropagação.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAM, K.; NAIR, S. G.; SREEKUMARI, M. T.; UNNIKRISHNAN, M.. Seed set and seedling variation in greater yam (*Dioscorea alata* L). **Euphytica**, Wageningen, v.35, p.227-343, 1986.

ARNAU, G.; NEMORIN, A.; MALEDON, E.; ABRAHAM, K. Revision of ploidy status of *Dioscorea alata* L (*Dioscoreaceae*) by cytogenetic and microsatellite segregation analysis. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.118, p.1239-1249, 2009.

BALOGUN, M.O.; FAWOLE, I.; NG, S. Y. C.; NG, Q.; SHIWACHI, H.; KIKUNO, H. Interaction among cultural factors in microtuberization of white yam (*Dioscorea rotundata* Poir.). **Tropical Science**, Nova York, v.46, n. 1, p. 55-59, 2006.

BJORKMAN, O. Responses to different quantum flux densities. In: LANGE, O.; NOBEL, P. S.; OSMONA, C. B.; ZIEGLER, H. (Ed.). **Physiological plant ecology I: Responses to the physical environment**. New York: Springer-Verlang, 1981. p. 57-60.

BOUSALEM, M.; ARNAU, G.; HOCHU, I.; ARNOLIN, R.; VIADER, V.; SANTONI, S.; DAVID J. Microsatellite segregation analysis and cytogenetic evidence for tetrasomic inheritance in the American yam *Dioscorea trifida* and a new basic chromosome number in the Dioscoreae. **Theoretical and Applied Genetic**, Berlin, v.113 p.439-451, 2006.

BOARDMAN, N. K. Comparative photosynthesis of sun and shade plants. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v.28, p. 355-377, 1977.

BORGES, M.; MENESES, S.; VÁZQUEZ, J.; GARCIA, M.; AGUILERA, N.; CEIRO, W.; INFANTE, Z.; RODRIGUEZ, A. **Metodología de conservación *in vitro* de germoplasma de ñame**. International Workshop on Plant Biotechnology. Ciego de Avila, 2001. 58 p.

BORGES, M.; CEIRO, W.; MENESES, S.; AGUILERA, N.; VÁZQUEZ, J.; INFANTE, Z. Y.; FONSECA, M. Regeneration and multiplication of *Dioscorea alata* germplasm maintained *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, The Hague, v. 76, p. 87-90, 2004.

BORGES, M.; DESTRADE, R.; MENESES, S.; GÓMEZ, R.; MALAURIE, B.; HAMON, P. Y.; DEMENORVAL, L. Optimización de un medio de cultivo para plantas micropropagadas de *Dioscorea alata* L. **Revista Colombiana de Biotecnología**, Colômbia , v. 13, n.2, p. 221-228, 2011.

CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, C. A.; CALDAS, S. L.; BUSO, A. J. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília; EMBRAPA-SPI / EMBRAPA-CNPH, 1998, v. 1, p. 87-132.

CAZÉ FILHO, J. Clonagem do inhame (*Dioscorea* sp.) por métodos biotecnológicos. In: SIMPÓSIO NACIONAL SOBRE AS CULTURAS DO INHAME E DO TARO, 2002. **Anais...** João Pessoa: Emepa, 2002. v.1, p.113-126.

COLEMAN, W. K.; COLEMAN, S. E. Modification of potato microtuber dormancy during induction and growth *in vitro* or *ex vitro*. **American Journal of Potato Research**, Estados Unidos v.77, p. 103-110, 2000.

DEGRAS, L. Quelques données sur la variabilité de descendance d'igname Cousse-couche *D. trifida*. In: **Proc. 7 th Annual Meeting Carib**. Guadeloupe-Martinique : Petit-Bourg. INRA-AG. 1969.p. 59-65.

DOUSSEAU, S.; ALVARENGA, A. A. DE.; CASTRO, E. M. DE.; SOARES, R. P.; EMRICH, E. B.; MELO, L. A. DE. Anatomia foliar de *Tabebuia serratifolia* (Vahl) Nich. (Bignoniaceae) propagadas *in vitro*, *in vivo* e durante a aclimatização. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.32, n.6, p.1694-1700, 2008.

ENGELV, V. L.; POGGIANI F. Estudo da concentração de clorofila nas folhas e no espectro de absorção de luz em função do sombreamento em mudas de quatro espécies florestais nativas. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Campinas, v.3, p.39-45, 1991.

ERIG, A.C.; SCHUCH, M.W. Micropropagação fotoautotrófica e o uso da luz natural. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.35, n.4, p.961-965, 2005.

FAO. Food and agriculture organization of the United Nations. Disponível em: <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567>. Acesso em: 23 Julho 2013.

FELIPPE, G.M. Fotomorfogênese. In: FERRI, M.G. (Ed.). **Fisiologia Vegetal 2**. São Paulo: EPU, 2.ed, 1986. p.231-280.

GUERRA, M. P.; NODARI, R. O.; REIS, M. S.; ORTH, A. I. A diversidade dos recursos genéticos vegetais e a nova pesquisa agrícola. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.28, n.3, p.521-528, 1998.

GOENAGA, R. Accumulation and partitioning of dry matter in taro [*Colocasia esculenta* (L.) Schott]. **Annals of Botany**, Oxford, v. 76, p. 337-34, 1995.

GOPAL, J.; MINOCHA, J. L.; DHALIWAL, H. S. Microtuberization in Potato (*Solanum tuberosum* L.). **Plant Cell Reports**, Alemanha, v. 17, p. 794-798. 1998.

IITA. International Institute of Tropical Agriculture. Disponível em [http://old.iita.org/cms/articlefiles/515-YAM\\_manual.pdf](http://old.iita.org/cms/articlefiles/515-YAM_manual.pdf). Acesso em: 21 Julho 2013.

KADOTA, M.; NIIMI, Y. Improvement of micropropagation of Japanese yam using liquid and gelled medium culture. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam v.102, p.461-466, 2004.

KERBAUY, G. B. Competência e determinação celular em cultura de células e tecidos de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília: Embrapa – SPI / Embrapa – CNPH, 1999. v. 2, p. 519-531.

KODYN, A.; ZAPATA-ARIAS, F. J. Natural light as an alternative light source for the in vitro culture of banana (*Musa acuminata* cv. 'Grand Naine1'). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, The Hague, v. 55, p. 141-145, 1999.

LEBOT, V. **Tropical root and tuber crops: cassava, sweet potato, yams and aroids**. Oxford: CAB International, 2009. 413p.

LEE, D. W.; OBERBAUER, S. F.; JOHNSON, P.; KHIRNAPILAY, B.; MANSOR, M.; MOHAMAD, H.; YAP, S. K.. Effects of irradiance and espectrus quality on leaf structure and function in seedlings of two southeast aian Hopea (*Diptenocarpeceae*) species. **American Journaul of Botany**, Saint Louis, v. 87, p.447- 455, 2000.

MAHALAKSHMI, V.; NG, Q.; ATALOBHOR, J.; OGUNSOLA, D.; LAWSON, M.; ORTIZ, R. Development of a West African yam *Dioscorea* spp. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v.54, p.1817-1825, 2007.

MANTELL, S. H.; HUGO, S. A. Effects of photoperiod, mineral medium strength, inorganic ammonium, sucrose and cytokinin on root, shoot and microtuber development in shoot cultures of *Dioscorea alata* L. and *D. bulbifera* L. yams. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, The Hague, v. 16, p. 23- 37, 1989.

MASCARENHAS, M.H.T.; REZENDE, L.M.A. Situação atual e prospecção das culturas do inhame (*Dioscorea alata*) e do taro (*Colocasia esculenta*) no Sudeste

do Brasil. In: SIMPOSIO NACIONAL SOBRE AS CULTURAS DO INHAME E DO TARO, 2002. **Anais...** João Pessoa, PB: EMEPA-PB, 2002. p. 33-51.

MENDES, L. do N.; GARRIDO, M. da S.; OLALDE, A. R.; SILVA, T. O. da. Caracterização dos produtores de inhame (*Dioscorea cayennensis* Lam.) do município de Maragogipe – Bahia. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ECONOMIA E SOCIOLOGIA RURAL, 41, 2003, Juiz de Fora, **Resumos...** Juiz de Fora: SOBER, 2003. CD-ROM.

MESQUITA, A. S. Inhame *Dioscorea cayennensis* Lam. e Taro *Colocasia esculenta* (L.) Schott. – Cenários dos mercados brasileiro e internacional. In: SIMPÓSIO NACIONAL SOBRE AS CULTURAS DO INHAME E TARO, 2002. **Anais...** João Pessoa, PB: EMEPA-PB, 2002. p. 215-238.

MESQUITA, A. S. Inhame na Bahia. In: CARMO, C. A. S. **Inhame e taro: sistema de produção familiar**. Vitória: Incaper, 2002. p.33-48.

MIGNOUNA, H. D.; ABANG, M. M.; ASIEDU, R. Yams. In: KOLE, C. **Genome Mapping and Molecular Breeding in Plants**, v. 3. Berlin- Heidelberg: Springer-Verlag.2007, p.271-296.

MINAG, C. P. **Instruções técnicas do cultivo do inhame**. Havana: SEDGRI/AGRINFOR, 2008, 18 p.

MITCHELL, S. A.; ASEMOTA, H. N.; AHMAD, M. H. Effects of explant source, culture medium strength and growth regulators of the *in vitro* propagation of three jamaican yams (*D. cayenensis*, *D. trifida* and *D. rotundata*). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Londres, v.67, p.173-180, 1995.

MONTALDO, A. **Cultivo de raíces y tubérculos tropicales**. Lima: Instituto Interamericano de Ciências Agrícolas de la OEA, 1972. p. 91-127.

MONTEIRO, D. A. Y.; PERESSIN, V. A. Culture do inhame. In: CEREDA, M. P. (Ed.). **Agricultura: tuberosas amiláceas Latino Americanas**. São Paulo: Fundação Cargil. 2002. p. 511-522.

MORINI, S.; MULEO, R. Effects of light quality on micropropagation of woody species. In: JAIN, S.M.; ISHII, K. (Ed.). **Micropropagation of woody trees and fruits**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2003. p.3-35.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. A revised medium for a rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, p. 473-479, 1962.

OLIVEIRA, A. P. Nutrição e época de colheita do inhame (*Dioscorea* sp.) e seus reflexos na produção e qualidade de túberas. In: SIMPÓSIO NACIONAL SOBRE AS CULTURAS DO INHAME E DO TARO, 2002. **Anais...** João Pessoa, PB: EMEPA-PB, 2002. p. 83-98.

OLIVEIRA, F. L. **Alternativas para o manejo orgânico do taro (*Colocasia esculenta* L. Schott) em condições edafoclimáticas no estado do Rio de Janeiro**. Seropédica, 2004. 90p. Tese (Doutorado em Fitotecnia ) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2004.

ONDO, P.; KEVERS, C.; DOMMES, J. Axillary proliferation and tuberization of *Dioscorea cayenensis*-*D. rotundata* complex. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, The Hague, v. 91, p. 107-109, 2007.

PEDRALLI, G. Dioscoreaceae e Araceae: aspectos taxonômicos, etnobotânicos e espécies nativas com potencial para melhoramento genético. In: SANTOS, E. S. SIMPÓSIO NACIONAL SOBRE AS CULTURAS DO INHAME E DO TARO, 2002. **Anais...** João Pessoa, PB: EMEPA-PB, 2002. p. 39-53.

PINTO, J.E.B.P.; CARDOSO, J.C.W.; CASTRO, E.M.; BERTOLUCCI, S.K.; MELO, L. A.; DOUSSEAU, S. Espectros morfofisiológicos e conteúdo de óleo

essencial de plantas de alfazema-do-Brasil em função de níveis de sombreamento. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.25, n.2, p.210-4, 2007.

RADMANN, E. B.; BRAGA, E. J. B.; KARAN, M. A. L.; POSADA, M. A. C.; PETERS, J. A. Influência da densidade de fluxo luminoso na qualidade de plantas micropropagadas de *Gypsophila paniculata* L. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.7, n.3, p.171-175, 2001.

REZENDE, R. K. S.; PAIVA, L. V.; PAIVA, R.; CHALFUN JÚNIOR, A.; TORGA, P. P.; CASTRO, E. M. DE. Organogênese em capítulos florais e avaliação de características anatômicas da folha de *Gerbera jamesoni* Adlam. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.32, n. 3, p. 821-827, 2008.

RUBATZKY, V.E.; YAMAGUCHI, M. Word vegetables. **Principles, production, and nutritive values**. 2 ed. New York: CHAPMAN & Hall 1997.843 p.

SCARCELLI, N.; DAÏNOU, O.; AGBANGLA, C.; TOSTAIN, S.; PHAM, J.L. Segregation patterns of isozyme loci and microsatellite markers show the diploidy of African yam *Dioscorea rotundata* ( $2n = 40$ ). **Theoretical and Applied Genetic**, Berlin, v.111, p.226-232, 2005.

SADIK, S.; OKEREKE, O. U. A new approach to improvement of yam *Dioscorea rotundata*. **Nature**, Londres, v.254, p.134-135, 1975.

SANTOS, E. S. dos. **Inhame (*Dioscorea* spp): aspectos básicos da cultura**. João Pessoa: EMEPA-PB, SEBRAE, 1996. 158p.

SANTOS, E. S. dos; MACÊDO, L. de S.; MATIAS, E. C.; MELO, A. S. de. **Contribuição tecnológica para a cultura do inhame no Estado da Paraíba**. João pessoa: EMEPAPB/ MMA-PRONAF, 1998. 84p.

SANTOS, E. S; Manejo Sustentável da cultura do inhame (*Dioscorea* sp.) no nordeste do Brasil. In: II SIMPÓSIO NACIONAL SOBRE AS CULTURAS DE INHAME E TARO. **Anais...** João Pessoa, PB: EMEPA-PB, 2002, p. 181-195.

SANTOS, E. S. dos; MACÊDO, L. de S. Tendências e perspectivas da cultura do inhame (*Dioscorea* sp.) no Nordeste do Brasil. In: II SIMPÓSIO NACIONAL SOBRE AS CULTURAS DO INHAME E DO TARO. **Anais...** João Pessoa, PB: EMEPA-PB, 2002. p. 21-31.

SANTOS, E. S. DOS; CAZÉ FILHO, J.; LACERDA, J. T. DE; CARVALHO, R. A; FONTINELLI, I. S. C.; SILVA, J. B. da; BARBOSA, M. M. ; CASSIMIRO, C. M. **Inhame e preservação ambiental.** João Pessoa: EMEPAPB /Embrapa, 2006.6p.

SCARCELLI, N.; DAINOU, O.; AGBANGLA, C.; TOSTAIN, S.; PHAM, J.L. Segregation patterns of isozyme loci and microsatellite markers show the diploidy of African yam *Dioscorea rotundata* ( $2n = 40$ ). **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.111, p.226-232, 2005.

SITA, L. G.; BAMMI, R. K.; RAKDHAWA. Clonal propagation of *Dioscorea floribunda* by tissue culture. **Journal of Horticultural Science**, Ashford, v.51, p.551-554, 1976.

SILVA, A. A. da. **Cultura do cará-da-costa: *Dioscorea cayennensis* Lam. Var. *Rotundata* Poir.** 2 ed. Fortaleza: BNB,1983. 72p.

SILVA, S. O. : CARVALHO, P. C. L., MOREIRA, R. F. C., CARNEIRO, J. L. S. **Orientações técnicas para o cultivo do inhame.** Cruz das Almas: SILVA SO, 2012. 40p.

SOUZA, A. V. de; BERTONI, B. W.; FRANÇA, S. de C.; PEREIRA, A. M. S. Micropropagação de *Dioscorea multiflora* Griseb. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 1, p. 92-98, 2011.

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas.** Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPq, v. 1,1998. 509 p.



VEGA, C. M. E. G. El Ñame (*Dioscorea* spp.). Características, usos y valor medicinal. Aspectos de importancia en el desarrollo de su cultivo. **Cultivos Tropicales**, Mayabeque, v.33, n. 4, p. 5-15, 2012.

ZOUNDJIHEKPON, J.; HAMON, P.; NOIROT, M .et al. Flowering synchronization between male and female Wes African cultivated yams (*Dioscorea caynensis* – *rotundata* complex). **Euphytica**, Wageningen, v.95, n.1, p. 371-375,1997.

## **CAPÍTULO 1**

### **AJUSTE DAS CONCENTRAÇÕES DO MEIO MS E DO ÁGAR PARA A MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DE INHAME DA COSTA (*Dioscorea rotundata* POIR.)<sup>1</sup>**

---

<sup>1</sup> Artigo a ser ajustado e submetido ao Comitê Editorial do periódico científico Ciência Rural.

# AJUSTE DAS CONCENTRAÇÕES DO MEIO MS E DO ÁGAR PARA A MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DE INHAME DA COSTA (*Dioscorea rotundata* POIR.)

Autora: Karine da Silva Simões  
Orientador: Sebastião de Oliveira e Silva  
Co-orientadora: Lucymeire Souza Morais Lino

**Resumo** - O inhame desempenha importante papel sócio-econômico nas regiões Sudeste e Nordeste do Brasil, onde presta grande contribuição ao desenvolvimento rural regional. Dentre as limitações para uma melhor exploração desse cultivo está o uso de túberas semente de qualidade inferior. A micropropagação pode ser uma alternativa interessante para contornar esse problema. O objetivo deste trabalho foi avaliar o desenvolvimento *in vitro* do inhame em diferentes concentrações de sais e vitaminas do meio de cultura MS e concentrações de ágar. Gemas apicais e laterais retiradas de brotos originados de túberas semente cultivadas em areia lavada foram estabelecidas *in vitro* em meio de cultura contendo sais e vitaminas do MS, suplementado com 100 mg L<sup>-1</sup> de inositol, 20 mg L<sup>-1</sup> de cisteína, 0,20 mg L<sup>-1</sup> de ANA, 0,15 mg L<sup>-1</sup> de BAP, 0,08 mg L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub>, 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 7,5 g L<sup>-1</sup> de ágar e cultivados em sala de crescimento sob temperatura de 27 ± 1 °C, densidade de fluxo de fótons de 30 μmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> e fotoperíodo de 16 horas, durante 90 dias, sendo as plantas geradas subdivididas em microestacas. Nesse experimento as microestacas provenientes da fase de estabelecimento foram inoculadas em tubos de ensaio contendo o meio MS em diferentes concentrações de sais e vitaminas (MS, MS/2, MS/3 e MS/4) suplementado com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e solidificado com diferentes concentrações de ágar (5, 7 e 9 g L<sup>-1</sup>). Aos 30, 60, 90 e 120 dias foram avaliados altura de planta, número de folhas, brotos, raízes, nós e gemas/nós percentagem de plantas sobreviventes, de contaminação e de oxidação. Os resultados indicaram que o meio MS/3 suplementado com 7 g L<sup>-1</sup> de ágar promoveu os melhores resultados para o desenvolvimento das plantas *in vitro*, demonstrando a viabilidade da técnica de micropropagação para a produção de mudas *in vitro* das espécies em estudo.

**Palavras chave:** Túberas, meio de cultura MS, micropropagação.

## ADJUSTING OF CONCENTRATIONS THE MEDIUM MS AND AGAR FOR *IN VITRO* MULTIPLICATION OF YAM COAST (*Dioscorea rotundata* Poir.)

Author: Karine da Silva Simões  
Adviser: Sebastião de Oliveira e Silva  
Co-adviser: Lucymeire Souza Morais Lino

**Abstract** - The yam plays an important socio-economic role in the Southeast and Northeast regions of Brazil, where pays great contribution to regional rural development. Among the limitations for a better exploitation of this cultivation is the use of tubers-seed of lower quality. The micropropagation can be an interesting alternative to circumvent this problem. The objective of this work was to evaluate the *in vitro* development of yam in different concentrations of salts and vitamins of MS medium and agar concentrations. Lateral buds withdrawals of sprouts originated from tubers seed grown in washed sand were established *in vitro* culture medium containing salts and vitamins of MS medium supplemented with 100 mg L<sup>-1</sup> of Inositol, 20 mg L<sup>-1</sup> of cysteine, 0.20 mg L<sup>-1</sup> NAA, 0.15 mg L<sup>-1</sup> BA, 0.08 mg L<sup>-1</sup> of GA<sub>3</sub>, 30g L<sup>-1</sup> sucrose and 7.5 g L<sup>-1</sup> of agar and grown in a growth room under a temperature of 27 ± 1 ° C, density of photon flux of 30 μmol m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> and photoperiod of 16 hours, during 90 days, later the plants generated were fragmented in microcuttings. In this experiment, the microcuttings from the establishment phase were inoculated in test tubes on MS medium containing different concentrations of salts and vitamins (MS, MS / 2, MS / MS and 3/4) supplemented with 30 g L<sup>-1</sup> sucrose and solidified with agar at different concentrations (5, 7, and 9 g L<sup>-1</sup>). At 30, 60, 90 and 120 days were evaluated: plant height, number of leaves, shoots, roots, buds and buds/node percentage of surviving plants, contamination and oxidation. The results indicated that the MS/ 3 supplemented with 7 g L<sup>-1</sup> agar provide the best results for plant development *in vitro*, demonstrating the viability of micropropagation techniques for the production of *in vitro* plants of the species under study.

**Key Words:** Tubers, MS culture medium, micropropagation.

## INTRODUÇÃO

O inhame (*Dioscorea* spp.) é uma monocotiledônea da Família Dioscoreaceae, que se desenvolve bem em zonas com precipitações pluviométricas em torno de 1.300 mm anuais (SANTOS,1996). O seu cultivo ocorre em regiões de altas temperaturas, sendo a África Ocidental e África Central responsáveis por aproximadamente 95% da produção mundial (MESQUITA, 2002). No desenvolvimento da agricultura brasileira, especialmente a nordestina, a cultura do inhame merece atenção por ser uma planta tropical de grande potencial e pode contribuir na solução do problema da demanda de alimentos, sobretudo nas regiões tropicais subdesenvolvidas (SANTOS, 1996). Essa espécie produz túberas de alto valor nutritivo e energético, constituindo-se em um alimento básico para o consumo humano, que vem sendo utilizado na alimentação de todas as classes da sociedade brasileira (MESQUITA, 2002). Em virtude do valor alimentício, grande parte da produção é destinada ao mercado interno e a outra parte para exportação, principalmente para Europa (SANTOS; MACEDO, 2002).

Contudo, os reduzidos investimentos em ciência e tecnologia têm ameaçado a posição do Brasil no cenário Sul Americano (MESQUITA, 2001). A baixa produtividade brasileira é justificada pelo reduzido nível tecnológico, empregado no manejo da cultura. Este fato também é observado em outros países, a exemplo da Jamaica, onde Sue e Wickham (1998) atribuem a baixa produtividade alcançada nas lavouras, o reduzido nível tecnológico empregado no cultivo do inhame.

A Biotecnologia vem contribuindo para as pesquisas realizadas com o uso de diferentes técnicas, dentre elas destaca-se a micropropagação, cujo objetivo principal é a produção em larga escala de material propagativo sadio. Essa técnica pode ser empregada quando se pretende multiplicar algum material promissor de uma determinada espécie, com as vantagens de prevenir a disseminação de pragas e doenças de uma geração para outra, obter um número elevado de plantas num curto espaço de tempo e assegurar estabilidade genética do material (SOUZA et al., 2008).

Embora o meio de cultura MS completo seja o mais utilizado em cultura de tecidos vegetais, para algumas espécies uma diluição dos macronutrientes desse

meio pode ser mais indicada (Caldas et al.,1998). Vários autores têm relatado a possibilidade de reduzir a concentração de sais do meio MS, para diversas espécies, visando ao melhor desenvolvimento das plantas e redução nos custos como em *Amarilis* (AMARAL, 2005), abacaxi, (BALZON et al., 2008) e *Aechmea* (MOREIRA, 2008). Paiva et al. (1997) utilizaram 50% dos sais do meio MS e obtiveram um bom desenvolvimento *in vitro* de gloxínia. Concentrações de sais do meio básico MS, reduzidas a 1/2, 1/3 ou 1/4, possibilitaram melhor enraizamento *in vitro* de amoreira-preta, cultivar Caiguangue (DANTAS et al., 2000).

Diante desse contexto o presente trabalho teve por objetivo avaliar o desenvolvimento *in vitro* do inhame em diferentes concentrações de sais e vitaminas do meio de cultura MS e concentrações de ágar.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Material vegetal**

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Mandioca e Fruticultura, em Cruz das Almas, BA. Túberas de Inhame da Costa (*Dioscorea rotundata* Poir.) foram tratadas com os fungicidas Furadan (3 mL L<sup>-1</sup>) e Ridomil (2 g L<sup>-1</sup>) por 10 minutos, após esse tratamento as túberas foram colocadas em um ambiente fresco para secar por dois dias. Posteriormente, foram seccionadas em quatro partes (Figura 1A) e estabelecidas em bandejas de polietileno contendo areia lavada para germinação (Figura 1B).

Depois de 70 dias do plantio, as plantas formadas (Figura 1C e 1D) foram cortadas em pedaços de 2 cm contendo gemas apicais ou laterais, e colocadas em recipiente com água destilada (Figura 1E). Em condições assépticas os explantes foram desinfestados com álcool 70% por quatro minutos e hipoclorito de sódio 60% contendo 1% de cloro ativo com duas gotas de Tween- 20, por oito minutos, seguido da tripla lavagem em água destilada autoclavada.

### **Estabelecimento *in vitro***

Os explantes desinfestados em condições assépticas foram reduzidos e inoculados em tubos de ensaio (Figura 1F e 1G) contendo aproximadamente 10 mL do meio de cultura constituído de sais e vitaminas do MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), acrescido de 100 mg L<sup>-1</sup> de Inositol, 20 mg L<sup>-1</sup> de cisteína, 0,20 mg L<sup>-1</sup> de ácido naftalenoacético (ANA), 0,15 mg L<sup>-1</sup> de benzilaminopurina (BAP), 0,08 mg L<sup>-1</sup> de ácido giberélico (GA<sub>3</sub>), 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, solidificado com 7,5 g L<sup>-1</sup> de ágar e pH ajustado em 5,8 antes da autoclavagem. O meio utilizado na fase de estabelecimento foi desenvolvido pelo International Institute of Tropical Agriculture (IITA), porém foram feitas modificações para adequar as necessidades da espécie em estudo. Os tubos foram mantidos em sala de crescimento, sob condições de temperatura de 27 ± 1 °C, densidade de fluxo de fótons de 30 μmol m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> e fotoperíodo de 16 horas, durante 90 dias para servirem de fontes de explantes para o estabelecimento dos experimentos (Figura 1H e 1I).



**Figura 1.** Procedimentos para o estabelecimento de gemas apicais e laterais de inhame: (A) seccionamento das túberas; (B) estabelecimento em bandejas de polietileno contendo areia lavada para posterior germinação; (C) túberas germinadas em areia; (D) ramos formadas sendo cortadas em pedaços de 2 cm contendo gemas apicais ou laterais; (E) desinfestação dos explantes em câmara de fluxo; (F) redução dos explantes; (G) inoculação dos explantes no meio de cultura; (H) microestacas em meio de cultivo já em fase de crescimento; (I) plantas de inhame após 7 meses do estabelecimento *in vitro*.

### **Ajuste das concentrações dos sais e vitaminas do meio MS e ágar**

Microestacas de plantas de Inhame da Costa, contendo pelo menos uma gema com aproximadamente 1 cm de tamanho, pré-estabelecidas *in vitro*, foram inoculadas em tubos de ensaio com 10 mL dos meios de cultura: T1 – MS com a concentração total de sais e vitaminas (MS); T2 – MS com metade da concentração de sais e vitaminas (MS/2); T3 – MS com 1/3 da concentração total



de sais e vitaminas (MS/3); T4 – MS com 1/4 da concentração total de sais e vitaminas (MS/4). Todos os meios de cultura foram suplementados com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, solidificado com diferentes concentrações de ágar (5, 7 e 9 g L<sup>-1</sup>) e pH ajustado em 5,8 antes da autoclavagem. As microestacas foram inoculadas em tubos de ensaio contendo as diferentes combinações de meio de cultura e concentração de ágar, com 15 repetições para cada combinação. As culturas foram mantidas em sala de crescimento, sob condições de temperatura de 27±1°C, densidade de fluxo de fótons de 30 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> e fotoperíodo de 16 horas.

Aos 30, 60, 90 e 120 dias após a inoculação, avaliaram-se a altura da planta [AP (cm)], número de folhas (NF), de raízes (NR), de broto (NB), de nó (NN) e número de gema por nó (NGN), percentagem de plantas sobreviventes, de contaminação e de oxidação.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 4x3 (4 tipos de meio de cultura e 3 concentrações de ágar) com 15 repetições por tratamento e quatro períodos de avaliação.

A variável altura da planta foi submetida à análise da variância considerando o delineamento inteiramente casualizado em esquema de parcelas subdivididas no tempo, em que a parcela foi composta pelos tratamentos e a subparcela composta pelas épocas de avaliação e suas interações com os tratamentos da parcela. As médias das concentrações do meio MS foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Para as médias dos períodos de avaliação foram ajustados modelos de regressão linear.

As variáveis números de folhas, de raízes, de brotos, de nós e números de gemas por nós, percentagem de plantas sobreviventes, de contaminação e de oxidação foram analisados pelo teste de igualdade de proporção de qui-quadrado ( $\chi^2$ ).

A análise de variância foi realizada com auxílio do programa estatístico Sisvar (FERREIRA, 2010) e o teste não paramétrico de qui-quadrado foi realizado com auxílio do programa SAS – Statistical Analysis System (SAS INSTITUTE, 2004).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 encontra-se o resumo da análise de variância de altura de plantas. As plantas diferiram significativamente quanto à concentração do meio MS (CMS), e períodos de avaliação (PA). Também houve efeito significativo para interações MC x TE para variável altura da planta ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 1.** Resumo da análise de variância para altura de planta, em cm, em função do meio de cultivo, concentrações de ágar e períodos de avaliações para o Inhame da Costa.

| FV                             | GL    | QM                 |
|--------------------------------|-------|--------------------|
|                                |       | Altura de planta   |
| Concentrações do meio MS (CMS) | 3     | 6,42**             |
| Concentrações de Ágar (CA)     | 2     | 2,60 <sup>ns</sup> |
| Erro 1                         | 168   | 0,93               |
| Períodos de avaliação (PA)     | 3     | 45,62**            |
| CMSx CA                        | 6     | 1,93 <sup>ns</sup> |
| CMS x PA                       | 9     | 1,50**             |
| CA x PA                        | 6     | 0,24 <sup>ns</sup> |
| CMS x CA x PA                  | 18    | 0,43 <sup>ns</sup> |
| Erro 2                         | 502   | 0,20               |
| CV (%)                         | 26,70 |                    |
| Média Geral                    | 1,68  |                    |

\*\* significativo a 1% de probabilidade pelo teste de F. <sup>ns</sup> não significativo a 5% de probabilidade.

Variações nas diluições dos sais e vitaminas do MS agem de forma significativa no comprimento da parte aérea para a maioria das espécies. Os resultados mostraram que quando as plantas foram cultivadas nos meios de cultura durante os períodos de avaliação de 30 e 60 dias não houve diferença estatística entre os tratamentos, porém quando a avaliação foi realizada aos 90 e 120 dias o meio MS/3 foi mais eficiente para o desenvolvimento da altura das plantas de inhame (Tabela 2). A possibilidade da redução dos sais do meio MS, para o melhor desenvolvimento das plantas e a redução de custos em diferentes espécies tem sido sugerida por autores como Pasqual et al. (1997) e Araújo et al. (2004). Concentrações dos sais no meio MS básico, reduzidas a 1/2, 1/3 ou 1/4, possibilitaram melhor enraizamento *in vitro* de amoreira preta, cultivar 'Caiquanguê' (DANTAS et al., 2000).

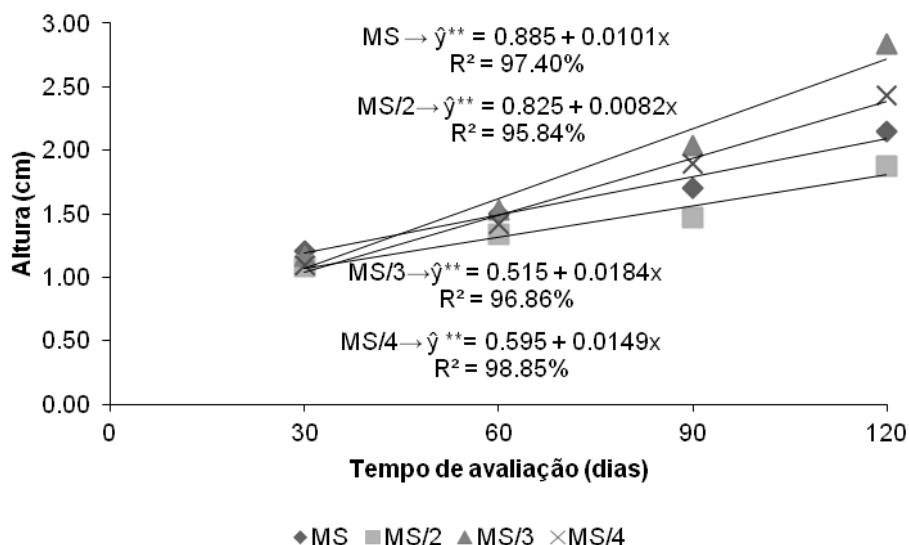
**Tabela 2.** Valores médios para altura das plantas de inhame da Costa em função das concentrações dos sais e vitaminas do meio Murashige & Skoog (MS) e dos períodos de avaliação.

| Meios de cultura | Períodos de avaliação (dias) |        |         |         |
|------------------|------------------------------|--------|---------|---------|
|                  | 30                           | 60     | 90      | 120     |
| MS               | 1,21 a                       | 1,50 a | 1,70 bc | 2,15 bc |
| MS/2             | 1,09 a                       | 1,34 a | 1,47 b  | 1,87 c  |
| MS/3             | 1,17 a                       | 1,53 a | 2,04 a  | 2,84 a  |
| MS/4             | 1,10 a                       | 1,44 a | 1,90 ab | 2,43 b  |

Médias seguidas pelas mesmas letras minúscula nas colunas, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

A altura da planta é uma variável importante, pois reflete, juntamente com a produção de folhas, o desenvolvimento da planta *in vitro*, na resposta ao meio de cultura e às condições de incubação impostas. No entanto, quando o objetivo do trabalho for cultivo *in vitro* essa variável deve ser avaliada em conjunto com a produção de microestacas, que é o fator que determina, no final, as taxas de multiplicação de cada variedade.

Quando comparou-se os períodos de avaliação em função das concentrações do meio de cultura, verificou-se que o meio MS/3 com 120 dias de cultivo *in vitro* proporcionou o melhor resultado com a altura de 2,84 cm, já para os outros meios testado embora não tenham sido tão eficientes quanto ao meio MS/3, o período de avaliação de 120 dias também foi o melhor para altura das plantas (Figura 2).



**Figura 2.** Efeito dos períodos de avaliação em função dos meios de cultura na altura de plantas de inhame da Costa cultivadas *in vitro*.

Variáveis como a altura da planta, número de folhas, desenvolvimento de raízes, denotam uma morfologia normal e bom estado fisiológico, sendo indicativos importantes para um sistema eficiente de micropropagação (OLIVEIRA et al., 2008).

Na Tabela 3 estão apresentados os resultados referentes ao número de folhas no desenvolvimento de plantas de inhame. As plantas apresentaram uma resposta favorável do número de folhas quando foram cultivadas no meio MS/3 + 7 g L<sup>-1</sup> de ágar. Já as plantas que foram cultivadas no meio MS/3+ 5 g L<sup>-1</sup> não responderam de forma positiva com relação ao incremento do número de folhas das plantas micropropagadas. A concentração de sais do meio MS influencia na formação de folhas, porém, a direção da resposta é intrínseca da espécie. De acordo com Ribeiro et al. (2008) foi possível encontrar maior número de folhas em meio MS com 150% de seus sais e vitaminas (4,13) e com 100% dos sais e vitaminas (3,98) em copo-de-leite.

**Tabela 3.** Teste de qui-quadrado, frequência observada (fo), frequência esperada (fe) e contribuição para o valor de qui-quadrado (cq) do número de folhas em função dos sais e vitaminas do meio de cultura MS e das concentrações de ágar em plantas de inhame da Costa (*Dioscorea rotundata* Poir.).

| Meio de cultura                   | Concentrações de ágar (g L <sup>-1</sup> ) |                      |        |
|-----------------------------------|--|----------------------|--------|
|                                   | 5  | 7                    | 9      |
| MS                                | 174 <sup>1</sup>                           | 241                  | 155    |
|                                   | 181,49 <sup>2</sup>                        | 157,43               | 231,08 |
|                                   | 0,30 <sup>3</sup>                          | 44,36                | 25,05  |
| MS/2                              | 139 <sup>1</sup>                           | 11                   | 190    |
|                                   | 108,25 <sup>2</sup>                        | 93,09                | 137,84 |
|                                   | 8,73 <sup>3</sup>                          | 73,19                | 19,74  |
| MS/3                              | 228 <sup>1</sup>                           | 322                  | 463    |
|                                   | 322,54 <sup>2</sup>                        | 279,78               | 410,68 |
|                                   | 27,71 <sup>3</sup>                         | 6,37                 | 6,66   |
| MS/4                              | 319 <sup>1</sup>                           | 172                  | 287    |
|                                   | 247,72 <sup>2</sup>                        | 214,88               | 315,41 |
|                                   | 20,51 <sup>3</sup>                         | 8,56                 | 2,55   |
| Qui-quadrado ( $\chi^2$ ): 243,76 |  | Probabilidade: 0,001 |        |

<sup>1</sup> FO: frequência observada; <sup>2</sup> FE: frequência esperada; <sup>3</sup> CQ: valor do qui-quadrado.

Avaliando-se o cultivo das plantas de inhame de forma isolada nas diluições do meio MS, foi possível verificar que, quando as plantas foram micropropagadas no meio MS/4 aos 120 dias de cultivo apresentaram resposta favorável ao desenvolvimento do número de folhas. Já quando foram cultivadas no meio MS/3 com o mesmo período de cultivo, observou-se que não houve contribuição de forma positiva na formação do número de folhas (Tabela 4).

O cultivo das plantas de inhame no meio MS/4 + 7 g L<sup>-1</sup> de ágar corroboram com Pasqual et al. (2002), que ao cultivar embriões de tangerineira 'Poncã' no meio MS/4 solidificado com 7,4 g L<sup>-1</sup> de ágar obtiveram o maior número de folhas (10,06) por planta.

**Tabela 4.** Teste de qui-quadrado, frequência observada (fo), frequência esperada (fe) e contribuição para o valor de qui-quadrado (cq) do número de folhas em função dos sais e vitaminas do meio de cultura MS e dos períodos de avaliação nas plantas de inhame da Costa cultivadas *in vitro* (*Dioscorea rotundata* Poir.).

| Meio de cultura                  | Períodos de avaliação (dias) |                      |        |        |
|----------------------------------|------------------------------|----------------------|--------|--------|
|                                  | 30                           | 60                   | 90     | 120    |
| MS                               | 16 <sup>1</sup>              | 54                   | 105    | 395    |
|                                  | 17,30 <sup>2</sup>           | 71,33                | 119,02 | 362,34 |
|                                  | 0,09 <sup>3</sup>            | 4,21                 | 1,65   | 2,94   |
| MS/2                             | 15 <sup>1</sup>              | 46                   | 85     | 194    |
|                                  | 10,32 <sup>2</sup>           | 42,55                | 70,99  | 216,14 |
|                                  | 2,12 <sup>3</sup>            | 0,28                 | 2,76   | 2,26   |
| MS/3                             | 30 <sup>1</sup>              | 147                  | 218    | 618    |
|                                  | 30,75 <sup>2</sup>           | 126,77               | 211,53 | 643,95 |
|                                  | 0,01 <sup>3</sup>            | 3,22                 | 0,20   | 1,05   |
| MS/4                             | 21 <sup>1</sup>              | 91                   | 156    | 510    |
|                                  | 23,62 <sup>2</sup>           | 97,36                | 162,46 | 494,57 |
|                                  | 0,29 <sup>3</sup>            | 0,41                 | 0,26   | 0,48   |
| Qui-quadrado ( $\chi^2$ ): 22,73 |                              | Probabilidade: 0,008 |        |        |

<sup>1</sup> FO: frequência observada; <sup>2</sup> FE: frequência esperada; <sup>3</sup> CQ: valor do qui-quadrado.

As plantas de inhame quando foram cultivadas no meio MS/3 + 5 g L<sup>-1</sup> de ágar não apresentaram resposta satisfatória do número de folhas. Esses resultados contrastaram com Villa et al. (2006) que observaram comportamento quadrático para o número de folhas em *Vitis vinifera* (uva), com a maior média (2,51) no meio de cultivo diluído à metade dos sais de MS.

Com relação ao número de raízes, pode-se ressaltar que as plantas de inhame cultivadas em MS/3 suplementadas com 5 e 7 g L<sup>-1</sup> de ágar foram mais eficientes para o número de raízes. Já o meio MS/3 + 9 g L<sup>-1</sup> de ágar foi o que menos contribuiu na formação das raízes (Tabela 5). Porém quando avaliou-se a interação concentrações dos meios x períodos de avaliação, o meio MS/3 foi o mais favorável na formação das raízes aos 120 dias de cultivo *in vitro* (Tabela 6). Esse resultado foi semelhante ao de Bandinelli et al. (2013) que observaram durante o cultivo *in vitro* de batata que houve diferença estatística na redução das concentrações dos sais e vitaminas do MS/2 + 6,75 g L<sup>-1</sup> de ágar promovendo o aumento do número de raízes. Uma das explicações para o aumento do número de raízes com a redução da concentração dos sais pode estar associada à

variação na quantidade de N do meio de cultura, pois o aumento da concentração deste nutriente favorece o crescimento da parte aérea em detrimento das raízes (HUIMEI et al., 2007).

**Tabela 5.** Teste de qui-quadrado, frequência observada (fo), frequência esperada (fe) e contribuição para o valor de qui-quadrado (cq) do número de raízes em função dos sais e vitaminas do meio de cultura MS e das concentrações de ágar nas plantas de inhame da Costa cultivadas *in vitro* (*Dioscorea rotundata* Poir.).

| Meio de cultura                   | Concentrações de ágar (g L <sup>-1</sup> ) |                      |        |
|-----------------------------------|--|----------------------|--------|
|                                   | 5  | 7                    | 9      |
| MS                                | 112 <sup>1</sup>                           | 122                  | 88     |
|                                   | 123,04 <sup>2</sup>                        | 99,59                | 99,36  |
|                                   | 0,50 <sup>3</sup>                          | 5,04                 | 1,30   |
| MS/2                              | 75 <sup>1</sup>                            | 56                   | 132    |
|                                   | 81,39 <sup>2</sup>                         | 65,88                | 65,72  |
|                                   | 0,50 <sup>3</sup>                          | 0,43                 | 9,52   |
| MS/3                              | 189 <sup>1</sup>                           | 189                  | 108    |
|                                   | 185,71 <sup>2</sup>                        | 150,32               | 149,97 |
|                                   | 13,63 <sup>3</sup>                         | 13,63                | 7,79   |
| MS/4                              | 154 <sup>1</sup>                           | 112                  | 100    |
|                                   | 139,86 <sup>2</sup>                        | 113,20               | 112,94 |
|                                   | 1,433 <sup>3</sup>                         | 0,01                 | 1,48   |
| Qui-quadrado ( $\chi^2$ ): 153,66 |  | Probabilidade: 0,001 |        |

<sup>1</sup> FO: frequência observada; <sup>2</sup> FE: frequência esperada; <sup>3</sup> CQ: valor do qui-quadrado.

**Tabela 6.** Teste de qui-quadrado, frequência observada (fo), frequência esperada (fe) e contribuição para o valor de qui-quadrado (cq) do número de raízes em função dos sais e vitaminas do meio de cultura MS e dos períodos de avaliação nas plantas de inhame da Costa cultivadas *in vitro* (*Dioscorea rotundata* Poir.).

| Meio de cultura            | Períodos de avaliação (dias) |       |                      |        |
|----------------------------|------------------------------|-------|----------------------|--------|
|                            | 30                           | 60    | 90                   | 120    |
| MS                         | 8 <sup>1</sup>               | 42    | 96                   | 176    |
|                            | 13,46 <sup>2</sup>           | 55,72 | 97,27                | 155,54 |
|                            | 2,22 <sup>3</sup>            | 3,38  | 0,01                 | 2,69   |
| MS/2                       | 11 <sup>1</sup>              | 37    | 62                   | 103    |
|                            | 8,91 <sup>2</sup>            | 36,86 | 64,35                | 102,89 |
|                            | 0,49 <sup>3</sup>            | 0,00  | 0,09                 | 0,00   |
| MS/3                       | 13 <sup>1</sup>              | 83    | 151                  | 239    |
|                            | 20,32 <sup>2</sup>           | 84,10 | 146,82               | 234,77 |
|                            | 2,64 <sup>3</sup>            | 0,01  | 0,11                 | 0,07   |
| MS/4                       | 26 <sup>1</sup>              | 78    | 110                  | 152    |
|                            | 15,31 <sup>2</sup>           | 63,33 | 110,57               | 176,80 |
|                            | 7,47 <sup>3</sup>            | 3,40  | 0,00                 | 3,48   |
| Qui-quadrado ( $\chi^2$ ): |                              | 26,08 | Probabilidade: 0,002 |        |

<sup>1</sup> FO: frequência observada; <sup>2</sup> FE: frequência esperada; <sup>3</sup> CQ: valor do qui-quadrado.

Para Royero et al. (2007) plantas *in vitro* de *Dioscorea alata* cultivadas em meio MS/5 apresentaram grande quantidade de raízes depois de quatro meses de cultivo. No presente estudo, os resultados mostraram ser possível cultivar plantas *in vitro* de *Dioscorea rotundata* Poir em meio MS/3 apresentando uma boa quantidade de raízes com 120 dias de cultivo.

De acordo com o teste do qui-quadrado com 1% de probabilidade, o meio de cultura MS/3 foi o mais favorável para a formação de brotações das plantas *in vitro* de inhame da Costa (Tabela 7). Este resultado concorda com Preece (1995), o qual afirmou que meios de cultura baseados em formulações básicas diluídas têm possibilitado melhores resultados para a multiplicação de diversas espécies. Resultados semelhantes foram obtidos por Chang et al. (2003), com a espécie *Zantedeschia albomaculata* (copo-de-leite) que apresentou maior número de brotos (2,0) em meio MS/2.



**Tabela 7.** Teste de qui-quadrado para número de brotos em função dos sais e vitaminas do meio de cultura MS nas plantas de inhame da Costa cultivadas *in vitro* (*Dioscorea rotundata* Poir.).

| Tipo de meio                     | Frequência           |
|----------------------------------|----------------------|
| MS                               | 188                  |
| MS/2                             | 154                  |
| MS/3                             | 227                  |
| MS/4                             | 186                  |
| Qui-quadrado ( $\chi^2$ ): 14,19 | Probabilidade: 0,002 |

Pessoa et al. (2004) verificaram que para cultivares de samambaia (*Nephrolepis exaltata*), não houve diferença significativa quanto ao número de brotações, variando esse valor entre 2,0 e 2,2 brotos, sob diferentes concentrações (25, 50 e 100%) de sais do meio de cultura MS. No entanto, no estudo de amoreira-preta (*Rubus* sp.) cultivar Ébano o número de brotos foi estimulado pelo aumento da concentração de sais do MS e maior número de brotos (3,9) foi observado em meio MS com 150% dos sais (VILLA et al., 2005).

Por outro lado, resultados satisfatórios foram obtidos por Erig et al. (2004), estudando o efeito de agentes solidificantes na multiplicação *in vitro* de macieira (cv. Galaxy), que obtiveram melhores resultados para número médio de brotos com a utilização do meio WPM de Lloyd e Mccown (1980) + 6 g L<sup>-1</sup> de ágar. O ágar, agente solidificante mais utilizado, pode ter um efeito sobre o crescimento e desenvolvimento das culturas *in vitro*, sendo que a maioria das espécies tem demonstrado bons resultados na multiplicação *in vitro* utilizando essa substância (SCHOLTEN; PIERIK, 1998). Paiva et al. (1999) ao estudarem a relação entre concentrações de ágar (0,0; 0,35; 0,7 e 1,05%) no meio MS para o desenvolvimento de plantas de crisântemo (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev. cv. Orange Reagen) *in vitro*, observaram que o número e o tamanho de brotos não foram afetados pela consistência do meio de cultura.

Para a variável número de nós observou-se diferença estatística entre as concentrações de sais e vitaminas do meio de cultura MS e do ágar pelo teste do qui-quadrado. Assim, as plantas cultivadas em MS/3 + 7 g L<sup>-1</sup> de ágar apresentaram contribuições superiores do número de nós em relação aos demais tratamentos (Figura 3). Já o meio MS/2 + 7 g L<sup>-1</sup> de ágar foi o que menos contribuiu no número de nós (Tabela 8).



**Figura 3.** Plantas de inhame da Costa cultivadas *in vitro* no meio MS/3 + 7 g L<sup>-1</sup> de ágar: (A) plantas com 120 dias de cultivo; (B) plantas enraizadas.

A variável número de nós é de extrema importância, uma vez que ela determina o número de explantes de partida para a fase de multiplicação sendo, portanto, determinante para a obtenção de boas taxas de multiplicação. Esses resultados foram mais esclarecedores quando avaliados aos 120 dias de cultivo *in vitro* (Tabela 9).

**Tabela 8.** Teste de qui-quadrado, frequência observada (fo), frequência esperada (fe) e contribuição para o valor de qui-quadrado (cq) do número de nós em função dos sais e vitaminas do meio de cultura MS e das concentrações de ágar nas plantas de inhame da Costa cultivadas *in vitro* (*Dioscorea rotundata* Poir.).

| Meio de cultura | Concentrações de ágar (g L <sup>-1</sup> ) |       |        |
|-----------------|--|-------|--------|
|                 | 5  | 7     | 9      |
| MS              | 64 <sup>1</sup>                            | 80    | 86     |
|                 | 73,05 <sup>2</sup>                         | 61,24 | 95,71  |
|                 | 1,12 <sup>3</sup>                          | 5,75  | 0,99   |
| MS/2            | 65 <sup>1</sup>                            | 20    | 90     |
|                 | 55,58 <sup>2</sup>                         | 46,59 | 72,83  |
|                 | 1,60 <sup>3</sup>                          | 15,18 | 4,05   |
| MS/3            | 93 <sup>1</sup>                            | 115   | 125    |
|                 | 105,76 <sup>2</sup>                        | 88,66 | 138,58 |
|                 | 1,54 <sup>3</sup>                          | 7,82  | 1,33   |
| MS/4            | 81 <sup>1</sup>                            | 39    | 96     |
|                 | 68,60 <sup>2</sup>                         | 57,51 | 89,89  |
|                 | 2,24 <sup>3</sup>                          | 5,96  | 0,42   |

Qui-quadrado ( $\chi^2$ ): 47,99

Probabilidade: 0,0001

<sup>1</sup>FO: frequência observada; <sup>2</sup>FE: frequência esperada; <sup>3</sup>CQ: valor do qui-quadrado.

**Tabela 9.** Teste de qui-quadrado para número de nós em função dos períodos de avaliação em plantas de inhame da Costa cultivadas *in vitro* (*Dioscorea rotundata* Poir.).

| Períodos de avaliação (dias)      | Frequência           |
|-----------------------------------|----------------------|
| 30                                | 105                  |
| 60                                | 200                  |
| 90                                | 241                  |
| 120                               | 408                  |
| Qui-quadrado ( $\chi^2$ ): 201,43 | Probabilidade: 0,000 |

Para número de gemas/nós, o MS/3 + 7g L<sup>-1</sup> de ágar foi o meio que mais contribuiu no desenvolvimento das plantas de inhame *in vitro*. Entretanto, quando o meio MS/2 foi suplementado com 7 g L<sup>-1</sup> observou-se que a redução da consistência do meio de cultura afetou a formação do número de gemas/nó (Tabela 10). A maior quantidade de gemas/nó foi observada aos 120 dias de cultivo *in vitro* das plantas de inhame (Tabela 11).

**Tabela 10.** Teste de qui-quadrado, frequência observada (fo), frequência esperada (fe) e contribuição para o valor de qui-quadrado (cq) das gemas/nó em função dos sais e vitaminas do meio de cultura MS e das concentrações de ágar nas plantas de inhame da Costa cultivadas *in vitro* (*Dioscorea rotundata* Poir.).

| Meio                             | Concentrações de ágar (g L <sup>-1</sup> ) |       |       |
|----------------------------------|--|-------|-------|
|                                  | 5  | 7     | 9     |
| MS                               | 47 <sup>1</sup>                            | 46    | 54    |
|                                  | 48,34 <sup>2</sup>                         | 38,62 | 60,05 |
|                                  | 0,04 <sup>3</sup>                          | 1,41  | 0,61  |
| MS/2                             | 38 <sup>1</sup>                            | 13    | 53    |
|                                  | 34,20 <sup>2</sup>                         | 27,32 | 42,48 |
|                                  | 0,42 <sup>3</sup>                          | 7,51  | 2,60  |
| MS/3                             | 57 <sup>1</sup>                            | 65    | 70    |
|                                  | 63,13 <sup>2</sup>                         | 50,44 | 78,43 |
|                                  | 0,60 <sup>3</sup>                          | 4,20  | 0,91  |
| MS/4                             | 52 <sup>1</sup>                            | 31    | 64    |
|                                  | 48,34 <sup>2</sup>                         | 38,62 | 60,05 |
|                                  | 0,28 <sup>3</sup>                          | 1,50  | 0,26  |
| Qui-quadrado ( $\chi^2$ ): 20,34 | Probabilidade: 0,002                       |       |       |

<sup>1</sup> FO: frequência observada; <sup>2</sup> FE: frequência esperada; <sup>3</sup> CQ: valor do qui-quadrado.

**Tabela 11.** Teste de qui-quadrado para número de gemas/nós em função dos períodos de avaliação nas plantas de inhame da Costa cultivadas *in vitro* (*Dioscorea rotundata* Poir.).

| Períodos de avaliação (dias)     | Frequência           |
|----------------------------------|----------------------|
| 30                               | 87                   |
| 60                               | 137                  |
| 90                               | 140                  |
| 120                              | 226                  |
| Qui-quadrado ( $\chi^2$ ): 67,72 | Probabilidade: 0,000 |

Em maça, Erig et al. (2004), obtiveram os melhores resultados para o número médio de gemas utilizando o meio de cultura MS solidificado com 6 g L<sup>-1</sup> ágar (testemunha) ou sua substituição parcial pelo amido de milho. No entanto, Silveira et al. (2001) conseguiram as melhores respostas no cultivo de porta-enxertos do gênero *Prunus*, para variável número de gemas, nos meios de cultura MS normal e com concentração de sais reduzida para 3/4 MS.

No presente trabalho, ao final do experimento foi possível constatar que a combinação do meio de cultura MS/3 + 9 g L<sup>-1</sup> de ágar foi a que apresentou a maior percentagem de plantas sobreviventes (93%). Nenhum dos tratamentos estudados apresentaram contaminação, já o meio de cultura contendo a concentração normal de sais e vitaminas do MS + 9 g L<sup>-1</sup> de ágar apresentou uma percentagem de oxidação de 33%. Ahmed e Anjum (2010), estudando a cultura *in vitro* da pêra (*Pyrus* sp.), observaram boas taxas de sobrevivência com a redução de sais por um período de seis meses, sendo que após esse período foi observada a morte das brotações devido a escassez de nutrientes no meio de cultivo. Este mesmo resultado foi observado no presente estudo onde foi constatada uma alta taxa de sobrevivência por um período de quatro meses. Após esse período, observou-se que as plantas começaram a morrer, devido à carência dos nutrientes fornecidos através do meio de cultivo.

## CONCLUSÃO

Os resultados deste trabalho demonstram a viabilidade da técnica do cultivo *in vitro* para a produção de mudas do Inhame da Costa, onde pode-se concluir que:

A redução da concentração dos sais e vitaminas no meio de cultura MS para 1/3 com adição de 7 g L<sup>-1</sup> de ágar foi mais eficiente para o desenvolvimento das plantas *in vitro* aos 120 dias.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED, M.; ANJUM, M. A. *In vitro* storage of some pear genotypes with the minimal growth technique. **Turkish Journal Agriculture and Forestry**, Ankara, v. 34, p. 25-32, 2010.

AMARAL, L. **Conservação e propagação *in vitro* de três cultivares híbridas de amarílis**. Campinas, 2005. 94p. Dissertação (Mestrado em Melhoramento Genético vegetal), Instituto Agronômico (IAC), 2005.

ARAÚJO, A.G.; FIORINI, C. V. A.; PASQUAL, M.; SILVA, A. B.; VILLA, F. Multiplicação *in vitro* de gloxínia (*Sinningia speciosa* Lood. Hiern.). **Revista Ceres**, Viçosa, v. 51, n. 293, p. 117-127, 2004.

BALZON, T. A.; CARDOSO, L. D.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Conservação *in vitro* de germoplasma de abacaxi (*Ananas* sp.) sob regime de crescimento mínimo. In: XX Congresso Brasileiro de Fruticultura 54th Annual Meeting of the Interamerican Society for Tropical Horticulture. Vitória, ES. **Anais...** 2008.

BANDINELLI, M. G.; BISOGNIN, D. A.; GNOCATO, F. S.; MAMBRIN, R. B.; SAUSEN, D.; NICOLOSO, F. T. Concentração dos sais e da sacarose do meio MS na multiplicação *in vitro* e na aclimatização de batata. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.31, n.2, p. 242-247, 2013.

CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, C. A.; CALDAS, S. L.; BUSO, A. J. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI / EMBRAPA-CNPH, 1998, v. 1, p. 87-132.

CHANG, H. S.; CHAKRABARTY, D.; HAHN, E. J.; PAEK, K. Y. Micropropagation of Calla lily (*Zantedeschia albomaculata*) via *in vitro* shoot proliferation. ***In vitro Cellular & Developmental Biology – Plant***, Colômbia, v. 39, n. 02, p. 129-134, 2003.

DANTAS, A.C. de M.; CERETTA, M.; FORTES, G.R. de L.; COUTINHO, E.F. Enraizamento *in vitro* da amoreira-preta (*Rubus* sp.), cultivar Caigangue. ***Agropecuária Clima Temperado***, Pelotas, v. 3, p. 123-130, 2000.

ERIG, A. C.; SCHUCH, M. W.; SILVA, L. C. da. Multiplicação *in vitro* de macieira (*Malus domestica* Borkh.) cv. Galaxy: meio de cultura e agentes solidificantes alternativos. ***Revista Brasileira de Agrociência***, Pelotas, v. 10, n. 3, p. 297-302, 2004.

FERREIRA, D. F. Programa computacional Sisvar - UFLA, versão 5.3, 2010.

FLÔRES, A. V.; REINIGER, L. R. S.; CURTIA, A. R.; PAIM, A.; BASSAN, J. S.; CUNHA, A. C. M. C. M. Estabelecimento *in vitro* de *Peltophorum dubium* ((Spreng.) Taub.) em função das concentrações do meio MS. ***Cerne***, Lavras, v. 17, n. 4, p. 549-553, 2011.

HUIMEI, W.; YUANGANG, Z.; HONGMEI, L. Efficient rooting and root development after transfer of regenerated plantlets of *Camptotheca acuminata*. ***Eurasian Journal of Forest Research***, Hokaido, v.10, p.179-184, 2007.

LLOYD, G.; MCCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. ***International Plant Propagators Society Proceedings***, Seattle, n. 30, p. 421-427, 1980.

MESQUITA, A. S. Inhame na Bahia: a produção a caminho da competitividade. ***Bahia Agrícola***, Salvador, v.4, n.2, p.39-48, 2001.

MESQUITA, A. S. Inhame na Bahia – a produção no caminho certo. 2002. In: CARMO, C. A. S. do. (Ed.). **Inhame e taro: sistemas de produção familiar**. Vitória, ES: Incaper. 2002. p. 33-49.

MOREIRA, M. J. S. **Conservação *in vitro* de bromeliáceas**. Cruz das Almas, 2008. 68p. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2008.

MURASHIGE T, SKOOG F. A. A revised medium for a rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, p. 473-479, 1962.

OLIVEIRA, M. K. T.; NETO, F. B.; CÂMARA, F. A.; DOMBROSKI, J. L. D.; FREITAS, R. M. O. Multiplicação *in vitro* de batata-doce (*Ipomoea batatas* Lam). **Revista Caatinga**, Mossoró, v.21, n.4, p.129-134, 2008.

PAIVA, P.D.O.; MAYER, M. B. D.; CAMPOS, R. J. C.; RODRIGUES, V. A.; PASQUAL, M. Propagação *in vitro* de gloxínia. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v. 3, n. 2, p. 29-41, 1997.

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

PASQUAL, M. Propagação *in vitro* de gloxínia. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v. 3, n. 2, p. 29-41, 1997.

PASQUAL, M.; FINOTTI, D. R.; DUTRA, L. F.; CHAGAS, E. A.; RIBEIRO, L DE O. Cultivo *in vitro* de embriões imaturos de tangerineira ‘poncã’ em função do ph e da concentração de ágar. **Revista brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 8, n. 3, p. 199-202, 2002.

PESSOA, C. C.; SILVA, A. L. L.; FRANCO, E. T. H.; BISOGNIN, D. A. Propagação *in vitro* de *Nephrolepis exaltata* (L.) Schott. **Caderno de Pesquisa Série Biologia**, Santa Cruz do Sul, v. 16, n. 1, p. 43-49, 2004.

PREECE, J. E. Can nutrient salts partially substitute for plant growth regulators? **Plant, Tissue Culture and Biotechnology**, Rehovot, v. 1, n. 1, p. 26-37, 1995.

RIBEIRO, M de. N.; PASQUAL, M.; BORTOLOTTI, A. da S.; RODRIGUES, V. A. Diferentes concentrações de sais do meio MS e de sacarose na multiplicação *in vitro* de *Zantedeschia aethiopica* L. Spreng. (copo-de-leite). **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 39, n. 01, p. 101-106, 2008.

ROYERO, M.; VARGAS, T. E.; OROPEZA, M. Micropropagación y organogénesis de *Dioscorea alata* (ÑAME). **Interciência**, Caracas, v.32, p.247-252, 2007.

SANTOS, E. S. dos. **Inhame (*Dioscorea* spp): aspectos básicos da cultura**. João Pessoa: EMEPA-PB, SEBRAE, 1996. 158p.

SANTOS, E. S. dos; MACÊDO, L. de S. Tendências e perspectivas da cultura do inhame (*Dioscorea* sp.) no Nordeste do Brasil. In: II Simpósio nacional sobre as culturas do inhame e do taro. **Anais...** João Pessoa, PB: EMEPA-PB, 2002. p. 21-31.

SAS INSTITUTE. **SAS user's guide**: statistic: version 9.1.3. Cary: SAS Institute, 2004. 846 p.

SCHOLTEN, H.J.; PIERIK, R.L.M. Ágar as a gelling agent: differential biological effects *in vitro* . **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.77, p.109-116, 1998.

SILVEIRA, C. A. P.; FACHINELLO, J. C.; LUCES, G. R.; CITADIN, I.; RODRIGUES, A. C.; QUEZEDA, A. C.; SILVA, J. B. Multiplicação *in vitro* de porta-enxertos do gênero *Prunus* sob diferentes concentrações de BAP em dois meios de cultura. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 23, n. 3, p.488-492, 2001.



SOUZA, A. da S.; SOUZA, F. V. D.; SANTOS-SEREJO, J. A. dos; JUNGHANS, T. G.; SILVA NETO, H. P. da. **Micropropagação da mandioca mediante ápices caulinares e segmentos nodais**. Cruz das Almas, BA: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2008. 11p. (Embrapa mandioca e Fruticultur. Circular Técnica, 88).

SUE, H. C.; WICKHAM, L. D. Improving traditional yam production systems: The case of yellow yams in Jamaica. **Tropical Agriculture**, Tobago, v.75, n.1-2, p.252-256, 1998.

VILLA, F.; ARAÚJO, A. G.; PIO, L. A. S.; PASQUAL, M. Multiplicação *in vitro* da amoreira-preta 'Ébano' em diferentes concentrações de meio MS e BAP. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 29, n. 3, p. 582-589, 2005.

VILLA, F.; PASQUAL, M.; PIO, L. A. S.; ASSIS, F. A. Multiplicação *in vitro* de porta-enxerto de videira em variações do meio MS. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 28, n. 3, p. 345-349, 2006.

## **CAPÍTULO 2**

### **MICROPROPAGAÇÃO DE INHAME DA COSTA (*Dioscorea rotundata* POIR.) SOB DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE BAP EM DOIS MEIOS DE CULTURA<sup>1</sup>**

---

<sup>1</sup> Artigo a ser ajustado e submetido ao Comitê Editorial do periódico científico Ciência e Agrotecnologia.

# MICROPROPAGAÇÃO DE INHAME DA COSTA (*Dioscorea rotundata* POIR.) SOB DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE BAP EM DOIS MEIOS DE CULTURA

Autora: Karine da Silva Simões  
Orientador: Sebastião de Oliveira e Silva  
Co-orientadora: Lucymeire Souza Morais Lino

**Resumo** - A multiplicação do inhame ocorre vegetativamente através das túberas sementes inteiras ou por parte das túberas semente. A brotação desuniforme tem acarretado perdas consideráveis aos produtores devido à morte dos tubérculos. A micropropagação apresenta várias vantagens sobre os métodos convencionais de propagação, pois permite a obtenção de um grande número de mudas em um curto período de tempo e em espaço físico reduzido. Nesse sentido, este trabalho teve como objetivo avaliar o desenvolvimento *in vitro* do inhame nos meios MS e MS com modificações em diferentes concentrações de BAP. Gemas laterais retiradas de brotos originados de túberas semente cultivadas em areia lavada foram estabelecidas *in vitro* em meio de cultura contendo sais e vitaminas do MS, suplementado com 100 mg L<sup>-1</sup> de inositol, 20 mg L<sup>-1</sup> de cisteína, 0,20 mg L<sup>-1</sup> de ANA, 0,15 mg L<sup>-1</sup> de BAP, 0,08 mg L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub>, 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 7,5 g L<sup>-1</sup> de ágar e cultivados em sala de crescimento sob temperatura de 27 ± 1 °C, densidade de fluxo de fótons de 30 μmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> e fotoperíodo de 16 horas, durante 90 dias, posteriormente as plantas geradas foram seccionadas em microestacas. Para, isso microestacas provenientes da fase de estabelecimento foram inoculadas nos meios de cultura: MS1 (sais e vitaminas do MS) e MS2 (MS1 acrescido com 100 mg L<sup>-1</sup> de inositol, 20 mg L<sup>-1</sup> de cisteína, 0,20 mg L<sup>-1</sup> de ANA, 0,08 mg L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub>), com diferentes concentrações de BAP (0; 0,05; 0,15; 0,45; 1,35 e 4,05 mg L<sup>-1</sup>) suplementados com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, solidificados com 7,5 g L<sup>-1</sup> de ágar e pH ajustado para 5,8. Aos 30, 60, 90 e 120 dias foram avaliados altura de planta, número de folhas, brotos, raízes, nós e gemas/nós, percentagem de plantas sobreviventes, de contaminação e de oxidação. Os resultados obtidos demonstram ser viável a técnica da multiplicação *in vitro* da espécie em estudo por 120 dias em meio de cultura MS2 suplementado com 0,00 ou 0,05 mg L<sup>-1</sup> de BAP.

**Palavras chave:** Multiplicação, BAP, plantas *in vitro*.

## MICROPROPAGATION YAM COAST (*Dioscorea rotundata* Poir.) UNDER DIFFERENT CONCENTRATIONS OF BAP ON TWO CULTURE MEDIUM

Author: Karine da Silva Simões

Adviser: Sebastião de Oliveira e Silva

Co-adviser: Lucymeire Souza Morais Lino

**Abstract** - The multiplication of yam happens vegetatively through tuber-seeds whole or part of the tuber-seeds. The uneven budding has caused considerable losses to producers due to the death of the tubers. The micropropagation has many advantages over the conventional methods of propagation, because it allows obtaining a large number of plants in a short period of time and space reduced. In this sense, this study aimed to evaluate the *in vitro* development of yam in the medium MS and MS with modifications in different concentrations of BAP. Lateral buds withdrawals of sprouts originated from tubers seed grown in washed sand were established *in vitro* culture medium containing salts and vitamins of MS medium supplemented with 100 mg L<sup>-1</sup> of Inositol, 20 mg L<sup>-1</sup> of cysteine, 0,20 mg L<sup>-1</sup> NAA, 0,15 mg L<sup>-1</sup> BA, 0,08 mg L<sup>-1</sup> of GA<sub>3</sub>, 30g L<sup>-1</sup> sucrose and 7,5 g L<sup>-1</sup> of agar and grown in a growth room under a temperature of 27 ± 1 ° C, density of photon flux of 30 μmol m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> and photoperiod of 16 hours, during 90 days, later the plants generated were fragmented in microcuttings. For, that this microcuttings establishment phase were inoculated in culture medium: MS1 (MS salts and vitamins) and MS2 (MS1 plus 100 mg L<sup>-1</sup> inositol, 20 mg L<sup>-1</sup> cysteine, 0.20 mg L<sup>-1</sup> NAA, 0.08 mg L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub>) with different concentrations of BA (0, 0.05, 0.15, 0.45, 1.35 and 4.05 mg L<sup>-1</sup>) supplemented 30 g L<sup>-1</sup> sucrose, solidified with 7.5 g L<sup>-1</sup> agar and pH adjusted to 5.8. At 30, 60, 90 and 120 days were evaluated: plant height, number of leaves, shoots, roots, buds and buds/node percentage of surviving plants, contamination and oxidation. The results show the technique is viable *in vitro* multiplication of the species under study for 120 days in culture medium supplemented with MS2 0.00 or 0.05 mg L<sup>-1</sup> BAP.

**Key Words:** Multiplication, BA, *in vitro* plants.

## INTRODUÇÃO

O inhame é uma planta monocotiledônea da família das *Dioscoreaceae*, herbácea, trepadeira, pertencente ao gênero *Dioscorea*, que produz túberas ricas em diversas vitaminas do complexo B, vitamina A, Vitamina C e carboidratos, o qual é a principal reserva energética dos vegetais, como também a principal fonte de carboidratos na dieta humana, além de apreciáveis teores de proteína e de gordura (OLIVEIRA et al., 2007).

Nacionalmente, o nordeste é o maior produtor de inhame, sendo o Estado da Paraíba responsável pela maior produção, seguido por Pernambuco e Bahia. Os três estados juntos são responsáveis por 90% da produção nacional (SANTOS, 2002). A cultura do inhame alcança no Nordeste brasileiro grande importância sócio-econômica, e suas túberas poderá contribuir na solução do problema da demanda reprimida de alimentos, como também na geração de emprego e renda aos pequenos produtores (OLIVEIRA, 2002).

A multiplicação do inhame ocorre vegetativamente através das túberas-sementes inteiras ou por parte das túberas-semente. A brotação desuniforme tem acarretado perdas consideráveis aos produtores, devido à morte dos tubérculos, ocasionada por ataques de insetos e de patógenos no solo e pelas intempéries que danificam as gemas de brotação (SANTOS, 1998).

A micropropagação apresenta várias vantagens sobre os métodos convencionais de propagação, pois permite a obtenção de um grande número de mudas em um curto período de tempo e em espaço físico reduzido, além de possibilitar a produção de plantas isentas de patógenos (TORRES et al., 1998). As técnicas de cultura de tecidos vegetais e a produção de microtubérculos *in vitro*, também são alternativas interessantes, em relação aos métodos convencionais, adotadas para diferentes espécies de *Dioscorea*, uma vez que ajudam a resolver, a propagação vegetativa e a conservação de germoplasma (JEAN; CAPPADOCIA, 1991).

Na multiplicação *in vitro*, os fatores concentração de citocinina e tipo de meio usado são extremamente importantes para obter bons resultados. Vários meios básicos têm sido utilizados na multiplicação de plantas, sendo que a maioria se baseia no meio MS (Murashige e Skoog, 1962).

As citocininas são utilizadas em cultura de tecidos para estimular a divisão celular e atuam, conseqüentemente, no processo de morfogênese (GEORGE, 1996). Das citocininas comercialmente disponíveis, o BAP é a que, em geral, apresenta melhores resultados (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Segundo Krikorian (1991), o BAP é muito utilizado por causa de sua eficiência e baixo custo em relação às outras citocininas e, de acordo com Hu e Wang (1983), induz à formação de grande número de brotos e alta taxa de multiplicação em muitos sistemas de micropropagação.

Diante desse contexto o presente trabalho teve por objetivo avaliar o desenvolvimento *in vitro* do inhame nos meios MS e MS com modificações em diferentes concentrações de BAP.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Material vegetal**

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Mandioca e Fruticultura, em Cruz das Almas, BA. Túberas de Inhame da Costa (*Dioscorea rotundata* Poir.) foram tratadas com os fungicidas Furadan (3 mL L<sup>-1</sup>) e Ridomil (2 g L<sup>-1</sup>) por 10 minutos, após esse tratamento as túberas foram colocadas em um ambiente fresco para secar por dois dias. Posteriormente, foram seccionadas em quatro partes e estabelecidas em bandejas de polietileno contendo areia lavada para germinação.

Depois de 70 dias do plantio, as plantas formadas foram cortadas em pedaços de 2 cm contendo gemas apicais ou laterais, e colocadas em recipiente com água destilada. Em condições assépticas os explantes foram desinfestados com álcool 70% por quatro minutos e hipoclorito de sódio 60% contendo 1% de cloro ativo com duas gotas de Tween-20, por oito minutos, seguido da tripla lavagem em água destilada autoclavada.

### **Estabelecimento *in vitro***

Os explantes desinfestados em condições assépticas foram reduzidos e inoculados em tubos de ensaio contendo aproximadamente 10 mL do meio de cultura constituído de sais e vitaminas do MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), acrescido de 100 mg L<sup>-1</sup> de inositol, 20 mg L<sup>-1</sup> de cisteína, 0,20 mg L<sup>-1</sup> de ácido naftalenoacético (ANA), 0,15 mg L<sup>-1</sup> de benzilaminopurina (BAP), 0,08 mg L<sup>-1</sup> de ácido giberélico (GA<sub>3</sub>), 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, solidificado com 7,5 g L<sup>-1</sup> de ágar e pH ajustado em 5,8 antes da autoclavagem. O meio utilizado na fase de estabelecimento foi desenvolvido pelo International Institute of Tropical Agriculture (IITA), porém foram feitas modificações para adequar as necessidades da espécie em estudo. Os tubos foram mantidos em sala de crescimento, sob condições de temperatura de 27 ± 1 °C, densidade de fluxo de fótons de 30 μmol m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> e fotoperíodo de 16 horas, durante 90 dias para servirem de fontes de explantes para o estabelecimento dos experimentos.

### **Estudo das concentrações de BAP**

Microestacas provenientes da fase de estabelecimento com aproximadamente 1 cm de tamanho foram inoculadas em tubos de ensaio com dois tipos de meio de cultura; M1- Sais e vitaminas do MS com diferentes concentrações de BAP (0; 0,05; 0,15; 0,45; 1,35 e 4,05) suplementados com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, solidificados com 7,5 g L<sup>-1</sup> de ágar e pH ajustados em 5,8 antes da autoclavagem. E o meio de cultura M2- sais e vitaminas do meio MS, acrescido de 100 mg L<sup>-1</sup> de Inositol, 20 mg L<sup>-1</sup> de cisteína, 0,20 mg L<sup>-1</sup> de ácido naftalenoacético (ANA), 0,08 mg L<sup>-1</sup> de ácido giberélico (GA<sub>3</sub>), com diferentes concentrações de BAP (mesmas doses do M1) suplementados com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, solidificados com 7,5 g L<sup>-1</sup> de ágar e pH ajustados em 5,8 antes da autoclavagem. As culturas foram mantidas em sala de crescimento, sob condições de temperatura de 27±1°C, densidade de fluxo fótons de 30 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> e fotoperíodo de 16 horas.

Aos 30, 60, 90 e 120 dias após a inoculação, avaliaram-se a altura da planta [AP (cm)], número de folhas (NF), de raízes (NR), de broto (NB), de nó

(NN) e de gema por nó (NGN), percentagem de plantas sobreviventes, de contaminação e de oxidação.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 2x6 (2 tipos de meio de cultura e 6 concentrações de BAP) com 16 repetições por tratamento e quatro períodos de avaliação.

A variável altura da planta foi submetida à análise da variância considerando o delineamento inteiramente casualizado em esquema de parcelas subdivididas no tempo, em que a parcela foi composta pelos tratamentos e a subparcela composta pelas épocas de avaliação e suas interações com os tratamentos da parcela. As médias das concentrações do meio MS foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Para as médias das concentrações de BAP foram ajustados modelos de regressão polinomial. Já para as médias dos períodos de avaliação foram ajustados modelos de regressão linear.

As variáveis números de folhas, de raízes, de brotos, de nós e número de gemas por nós, percentagem de plantas sobreviventes, de contaminação e de oxidação foram analisados pelo teste de igualdade de proporção de qui-quadrado ( $\chi^2$ ).

A análise de variância foi realizada com auxílio do programa estatístico Sisvar Ferreira (2010) e o teste não paramétrico de qui-quadrado foi realizado com auxílio do programa SAS – Statistical Analysis System (SAS INSTITUTE, 2004).

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

De acordo com a análise de variância (Tabela 1), as plantas diferiram significativamente quanto ao meio de cultura (MC), concentrações de BAP (CB), e períodos de avaliação (PA). As interações MC x CB, MC x TE e CB x TE, apresentaram significância para a variável altura de plantas.

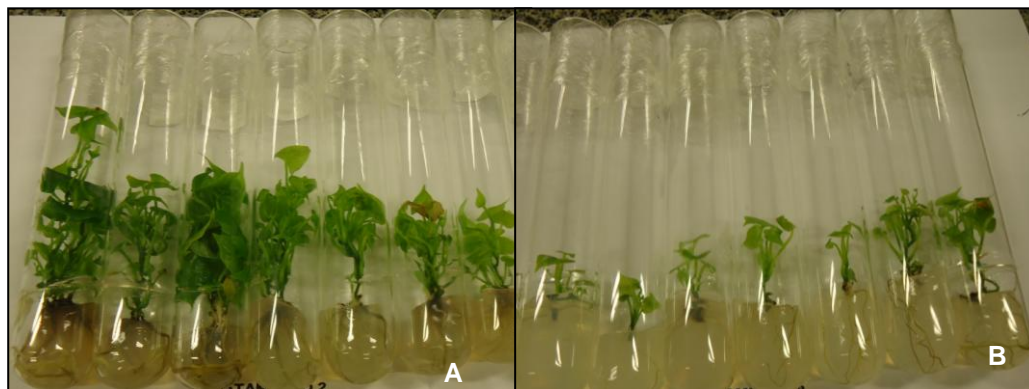


**Tabela 1.** Resumo da análise de variância para altura de planta, em cm, em função do meio de cultura, concentrações de BAP e períodos de avaliação para o Inhame da Costa cultivadas *in vitro*.

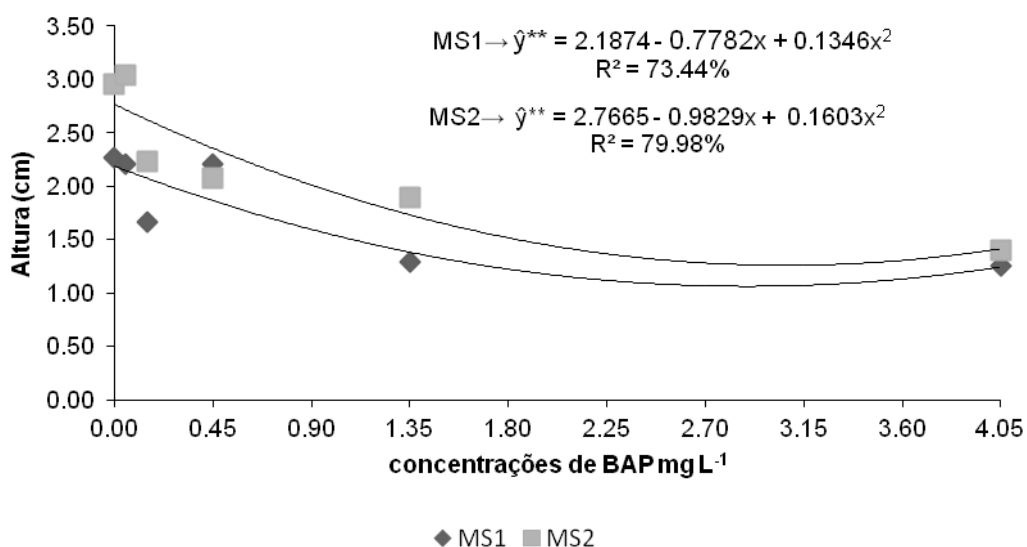
| FV                         | GL    | QM                 |
|----------------------------|-------|--------------------|
|                            |       | Altura de planta   |
| Meios de cultura (MC)      | 1     | 37,90**            |
| Concentrações de BAP (CB)  | 5     | 34,30**            |
| Períodos de avaliação (PA) | 3     | 56,82**            |
| Erro 1                     | 172   | 1,30               |
| MC x CB                    | 5     | 4,09 **            |
| MC x PA                    | 3     | 2,85 **            |
| CB x PA                    | 15    | 3,05 **            |
| MC x CB x PA               | 15    | 0,44 <sup>ns</sup> |
| Erro 2                     | 500   | 0,17               |
| CV (%)                     | 20,25 |                    |
| Média Geral                | 2,06  |                    |

\*\* significativo a 1% de probabilidade pelo teste de F. <sup>ns</sup> não significativo a 5% de probabilidade.

Ao comparar as concentrações de BAP em função dos meios de cultura, verificou-se que a concentração de 0,00 mg L<sup>-1</sup> de BAP proporcionou os melhores resultados para a altura de plantas, com valores de 2,27 e 3,04 cm para os meios MS1 e MS2, respectivamente (Figura 1). A partir da concentração de 1,35 mg L<sup>-1</sup> de BAP as plantas de inhame não apresentaram uma boa resposta *in vitro* para os meios MS2 e MS1. Assim 79 e 73% da variância foram explicadas pelo modelo quadrático da regressão (Figura 2). Esse contrasta com de Malaurie et al. (1995) onde em meio MS com a combinação de 0,20 mg L<sup>-1</sup> BAP + ANA 1,0 mg L<sup>-1</sup>, promoveu as maiores percentagens de enraizamento (81%) e desenvolvimento da parte aérea (73%) em *D. cayenensis*, complexo *D. rotundata* e *D. praeheensis*.



**Figura 1.** Plantas de inhame com 120 dias do cultivo *in vitro* em meio MS2 + 0,05 mg L<sup>-1</sup> de BAP (A), e em meio de cultura MS1 + 0,00 mg L<sup>-1</sup> de BAP (B).



**Figura 2.** Efeito das concentrações de BAP em função dos meios de cultura MS1 e MS2 na altura de plantas de inhame da Costa cultivadas *in vitro*.

Antonio et al. (2012) estudando o cultivo de *D. remotiflora* (Kunth), constataram que a cinetina foi mais adequada que o BAP para a formação de brotos, número de nós, número de folhas e altura das plantas em meio de cultura MS. Behera et al. (2008) relataram que para *D. hispida* a combinação de 2,0 mg L<sup>-1</sup> BAP + 0,5 mg L<sup>-1</sup> de ANA em meio MS, promoveu uma resposta ótima com comprimento da parte aérea de 5,0 ± 0,29 cm por explante.

Ao analisar os meios de cultura em função dos períodos de avaliação foi possível verificar que aos 30 dias de cultivo *in vitro* não houve diferença

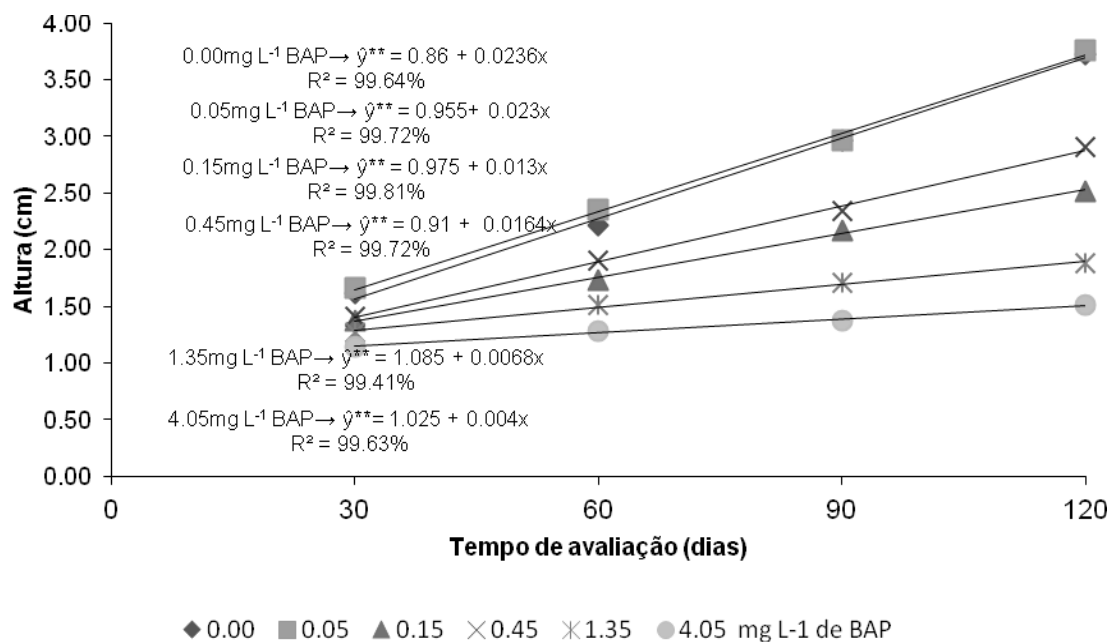
estatística entre os meios avaliados. Porém, a partir dos 60 dias de cultivo, o meio de cultura MS2 foi o mais eficiente para promover aumento na altura das plantas de inhame (Tabela 2). Estes resultados são semelhantes aos obtidos por Ahanhazo et al. (2010) que observaram aumentos na altura de plantas, cultivadas *in vitro*, do inhame da variedade Kounondakou, depois dos 30 dias de cultivo.

**Tabela 2.** Valores médios de altura de plantas em cm, de inhame da Costa em função dos meios de cultura MS1 e MS2 e os períodos de avaliação nas plantas de inhame da Costa cultivadas *in vitro* (*Dioscorea rotundata* Poir.).

| Meios de cultura | Períodos de Avaliação (dias) |       |       |       |
|------------------|------------------------------|-------|-------|-------|
|                  | 30                           | 60    | 90    | 120   |
| MS1              | 1,31a                        | 1,65b | 2,02b | 2,34b |
| MS2              | 1,51a                        | 2,00a | 2,52a | 3,13a |

Médias seguidas pelas mesmas letras minúscula nas colunas, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Para altura de plantas, os resultados mostraram que tanto na ausência como com a utilização de  $0,05 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP nos meios de cultura, as maiores médias (3,73 e 3,76 cm, respectivamente) foram obtidas aos 120 dias de cultivo. No entanto, vale ressaltar que é necessário a utilização da concentração ideal de BAP para não prejudicar o desenvolvimento das plantas. Esse regulador de crescimento não deve ser adicionado em grande quantidade, uma vez que, a partir da utilização da concentração de  $1,35 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP, observa-se prejuízos ao desenvolvimento das plantas, como foi observado aos 120 dias de cultivo *in vitro* (Figura 3).



**Figura 3.** Efeito dos períodos de avaliação em função das concentrações de BAP na altura de plantas de inhame da Costa cultivadas *in vitro*.

Madeira et al. (2005), ao estudar o efeito do BAP no meio B5 em mandioquinha perceberam que a medida que se elevou a concentração de BAP para  $0,40\text{ mg L}^{-1}$ , observou-se a formação de plantas com menor altura, porém com maior número de brotações. Para Chen et al. (2007), o meio MS contendo apenas o regulador de crescimento BAP promoveu uma maior taxa de indução de brotações e altura da parte aérea para *D. nipponica*, utilizando-se a concentração de até  $2,0\text{ mg L}^{-1}$ . Nesse caso, ao aumentar essa concentração para  $4,0\text{ mg L}^{-1}$  de BAP, houve uma menor taxa de brotações. De acordo com os resultados apresentados no presente trabalho, a menor concentração do BAP utilizada favoreceu o aumento da multiplicação, provavelmente por constituir um balanço hormonal mais adequado.

Observou-se que o meio MS2 +  $0,05\text{ mg L}^{-1}$  de BAP foi o que contribuiu de forma mais favorável para o número de folhas. Já o meio MS1 +  $1,35\text{ mg L}^{-1}$  BAP teve uma contribuição negativa no número de folhas das plantas de inhame da Costa cultivadas *in vitro* (Tabela 3).

**Tabela 3.** Teste de qui-quadrado, frequência observada (fo), frequência esperada (fe) e contribuição para o valor de qui-quadrado (cq) do número de folhas em função do meio de cultura e das concentrações de BAP em plantas de inhame da Costa (*Dioscorea rotundata* Poir.) cultivadas *in vitro*.

| Meio de cultura            | Concentrações de BAP (mg L <sup>-1</sup> ) |        |        |        |        |       |                      |
|----------------------------|--|--------|--------|--------|--------|-------|----------------------|
|                            | 0,00                                       | 0,05   | 0,15   | 0,45   | 1,35   | 4,05  |                      |
| MS1                        | 346 <sup>1</sup>                           | 284    | 271    | 309    | 100    | 60    |                      |
|                            | 302,84 <sup>2</sup>                        | 340,42 | 262,94 | 259,74 | 159,60 | 49,87 |                      |
|                            | 6,15 <sup>3</sup>                          | 9,35   | 0,25   | 9,34   | 22,26  | 2,06  |                      |
| MS2                        | 413 <sup>1</sup>                           | 569    | 388    | 342    | 300    | 65    |                      |
|                            | 456,16 <sup>2</sup>                        | 512,78 | 396,06 | 391,26 | 240,40 | 75,13 |                      |
|                            | 4,08 <sup>3</sup>                          | 6,21   | 0,16   | 6,20   | 14,76  | 1,37  |                      |
| Qui-quadrado ( $\chi^2$ ): |  | 95,76  |        |        |        |       | Probabilidade: 0,000 |

<sup>1</sup> FO: frequência observada; <sup>2</sup> FE: frequência esperada; <sup>3</sup> CQ: valor do qui-quadrado

Quando avaliou-se as concentrações de BAP de forma isolada, averiguou-se que, com 0,00 mg L<sup>-1</sup> de BAP, a formação de folhas respondeu de forma positiva aos 120 dias de cultivo *in vitro* (Tabela 4). Comportamento contrário foi observado por de Ahanhanzo et al. (2010), que observaram que 0,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP no meio de cultura MS induziu um aumento significativo no número de folhas para os genótipos de inhame Kounondakou e Gnon-boya.

**Tabela 4.** Teste de qui-quadrado, frequência observada (fo), frequência esperada (fe) e contribuição para o valor de qui-quadrado (cq) do número de folhas em função das concentrações de BAP e dos períodos de avaliação em plantas de inhame da Costa (*Dioscorea rotundata* Poir.) cultivadas *in vitro*.

| Concentrações de BAP       | Períodos de avaliação (dias) |        |                      |        |
|----------------------------|------------------------------|--------|----------------------|--------|
|                            | 30                           | 60     | 90                   | 120    |
| 0,0                        | 48 <sup>1</sup>              | 113    | 210                  | 388    |
|                            | 51,17 <sup>2</sup>           | 133,08 | 221,14               | 353,61 |
|                            | 0,20 <sup>3</sup>            | 3,03   | 0,57                 | 3,34   |
| 0,05                       | 61 <sup>1</sup>              | 159    | 240                  | 393    |
|                            | 57,52 <sup>2</sup>           | 149,60 | 248,59               | 397,05 |
|                            | 0,21 <sup>3</sup>            | 0,59   | 0,30                 | 0,05   |
| 0,15                       | 51 <sup>1</sup>              | 124    | 192                  | 292    |
|                            | 44,43 <sup>2</sup>           | 115,55 | 192,01               | 307,02 |
|                            | 0,97 <sup>3</sup>            | 0,62   | 0,02                 | 0,73   |
| 0,45                       | 44 <sup>1</sup>              | 120    | 189                  | 298    |
|                            | 43,89 <sup>2</sup>           | 114,14 | 189,68               | 303,29 |
|                            | 0,00 <sup>3</sup>            | 0,30   | 0,00                 | 0,09   |
| 1,35                       | 21                           | 71     | 130                  | 178    |
|                            | 26,97                        | 70,14  | 116,54               | 186,35 |
|                            | 1,32                         | 0,01   | 1,55                 | 0,37   |
| 4,05                       | 8                            | 19     | 37                   | 61     |
|                            | 8,43                         | 21,92  | 36,42                | 58,24  |
|                            | 0,02                         | 0,39   | 0,00                 | 0,13   |
| Qui-quadrado ( $\chi^2$ ): |                              | 36,70  | Probabilidade: 0,005 |        |

<sup>1</sup> FO: frequência observada; <sup>2</sup> FE: frequência esperada; <sup>3</sup> CQ: valor do qui-quadrado

As plantas que foram cultivadas no tratamento que continham MS2+ 0,05 mg L<sup>-1</sup> de BAP apresentaram as maiores médias de número de raízes quando comparadas ao meio MS1 + 0,00 mg L<sup>-1</sup> de BAP, no entanto o meio MS1 sem a adição do regulador de crescimento contribuiu de forma negativa na formação de raízes (Tabela 5). Ao comparar a frequência do número de raízes em função dos períodos de avaliação foram encontrados os maiores valores aos 120 dias do cultivo *in vitro* (Tabela 6). Esses resultados divergem de Malaurie et al. (1995) onde o meio MS com a combinação de 0,09 mg L<sup>-1</sup> de BAP + 0,50 mg L<sup>-1</sup> de ANA aumentaram significativamente a produção de raízes aos 3 meses de idade na micropropagação do complexo *D. cayenensis*, *D. rotundata* e *D. praeheensis*.

**Tabela 5.** Teste de qui-quadrado, frequência observada (fo), frequência esperada (fe) e contribuição para o valor de qui-quadrado (cq) do número de raízes em função do meio de cultura e das concentrações de BAP em plantas de inhame da Costa (*Dioscorea rotundata* Poir.) cultivadas *in vitro*.

| Meio de cultura                   | Concentrações de BAP (mg L <sup>-1</sup> ) |        |                      |        |       |      |
|-----------------------------------|--|--------|----------------------|--------|-------|------|
|                                   | 0,00                                       | 0,05   | 0,15                 | 0,45   | 1,35  | 4,05 |
| MS1                               | 75 <sup>1</sup>                            | 223    | 162                  | 211    | 35    | 7    |
|                                   | 152,27 <sup>2</sup>                        | 212,79 | 166,53               | 155,35 | 22,74 | 5,78 |
|                                   | 39,21 <sup>3</sup>                         | 0,49   | 0,12                 | 19,93  | 6,61  | 0,26 |
| MS2                               | 320 <sup>1</sup>                           | 329    | 270                  | 192    | 24    | 8    |
|                                   | 242,73 <sup>2</sup>                        | 329,21 | 265,47               | 247,65 | 36,26 | 9,22 |
|                                   | 24,60 <sup>3</sup>                         | 0,31   | 0,07                 | 12,51  | 4,14  | 0,16 |
| Qui-quadrado ( $\chi^2$ ): 114,78 |  |        |                      |        |       |      |
|                                   |  |        | Probabilidade: 0,000 |        |       |      |

<sup>1</sup>FO: frequência observada; <sup>2</sup>FE: frequência esperada; <sup>3</sup>CQ: valor do qui-quadrado

**Tabela 6.** Teste de qui-quadrado para número de raízes em função dos períodos de avaliação em plantas de inhame da Costa (*Dioscorea rotundata* Poir.) cultivadas *in vitro*.

| Períodos de avaliação (dias)      | Frequência |
|-----------------------------------|------------|
| 30                                | 78         |
| 60                                | 307        |
| 90                                | 587        |
| 120                               | 888        |
| Qui-quadrado ( $\chi^2$ ): 792,77 |            |
| Probabilidade: 0,000              |            |

De acordo com Ahanhanzo et al. (2010) não foi observada a formação de raízes na presença das citocininas (BAP ou zeatina), em genótipos de inhame (*Dioscorea* spp.). Em *D. alata* Royero et al. (2007) observaram ainda que, em meio de cultura MS, a formação das raízes não foi favorecida possivelmente devido a alta concentração de BAP (2 mg L<sup>-1</sup>) usada.

Mahesh et al. (2010) estudando a micropropagação em *D. wightii*, revelaram que a percentagem de indução de raízes diminui com adição de citocininas no meio de cultura, enquanto que o número de gemas axilares anormais aumentou usando altos níveis desses reguladores de crescimento. Em contraste ao resultado anterior, a adição de AIB tem mostrados melhores efeitos

sobre a percentagem de enraizamento e número de raízes por segmento em *D. oppositifolia* e *D. pentaphylla* (POORNIMA; RAVISHANKAR 2007).

Segundo Souza e Pereira (2007), o desenvolvimento do sistema radicular a partir da formação de raízes adventícias em plantas propagadas vegetativamente sob condições *in vitro* ou *in vivo*, é um processo de grande complexidade e envolve diversos fatores que ainda não estão completamente elucidados.

O teste de qui-quadrado ( $\chi^2$ ), não evidenciou diferenças significativas entre as interações MC x CB x TE para a variável número de brotos. Sendo possível observar que o meio MS2 apresentou a formação de um maior número de brotos, quando comparado ao meio MS1 (Tabela 7).

**Tabela 7.** Teste de qui-quadrado para número de brotos em função do tipo de meio de cultura em plantas de inhame da Costa (*Dioscorea rotundata* Poir.) cultivadas *in vitro*.

| Meio de cultura                 | Frequência           |
|---------------------------------|----------------------|
| MS1                             | 399                  |
| MS2                             | 487                  |
| Qui-quadrado ( $\chi^2$ ): 8,74 | Probabilidade: 0,003 |

No intervalo de 0,00 – 0,15 mg L<sup>-1</sup> de BAP houve um efeito satisfatório na formação de brotos para o cultivo das plantas de inhame *in vitro*, e a medida que foi aumentando a concentração de BAP a frequência de brotos foi decrescendo (Tabelas 8). Ao comparar a frequência do número de brotos em função dos períodos de avaliação foi possível constatar os maiores valores aos 120 dias do cultivo *in vitro* (Tabela 9). Geralmente, o número de brotações é inibido com o aumento da concentração de BAP no meio de cultura. Isso ocorre porque, em alguns casos, o aumento da concentração da citocinina induz a um aumento do número de brotações formadas por explante, as quais competem entre si pela absorção de sais minerais e vitaminas do meio de cultura (ROCHA et al., 2007).



**Tabela 8.** Teste de qui-quadrado para número de brotos em função das concentrações de BAP em plantas de inhame da Costa (*Dioscorea rotundata* Poir.) cultivadas *in vitro*.

| Concentrações de BAP (mg L <sup>-1</sup> ) | Frequência           |
|--|----------------------|
| 0,00                                       | 156                  |
| 0,05                                       | 158                  |
| 0,15                                       | 160                  |
| 0,45                                       | 148                  |
| 1,35                                       | 147                  |
| 4,05                                       | 116                  |
| Qui-quadrado ( $\chi^2$ ): 155,86          | Probabilidade: 0,000 |

**Tabela 9.** Teste de qui-quadrado para número de brotos em função dos períodos de avaliação em plantas de inhame da Costa (*Dioscorea rotundata* Poir.) cultivadas *in vitro*.

| Períodos de avaliação (dias)     | Frequência           |
|----------------------------------|----------------------|
| 30                               | 183                  |
| 60                               | 204                  |
| 90                               | 225                  |
| 120                              | 274                  |
| Qui-quadrado ( $\chi^2$ ): 20,57 | Probabilidade: 0,000 |

Tratamentos em concentrações menores de BAP são os mais indicados para serem adicionados ao meio de cultura devido à maior facilidade de individualização dos brotos (MACÊDO et al., 2003). De forma semelhante, Shin et al. (2004) relataram que a combinação entre BAP e ANA desempenha importante papel para a propagação *in vitro* de explante nodal para indução de brotações múltiplas, em *D. opposita* sendo o meio MS suplementado com 1,0 mg L<sup>-1</sup> de ANA e 0,5 -1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP é o melhor para a indução de brotações múltiplas .

Resultados satisfatórios foram obtidos por Costa et al. (2007) estudando o efeito da multiplicação *in vitro* de bananeira, que obtiveram melhores resultados para altura das brotações utilizando-se 0 e 2 mg L<sup>-1</sup> de BAP com altura de 4,6 e 3,0 cm respectivamente e para as concentrações de 4 e 6 mg L<sup>-1</sup> de BAP a altura das brotações regeneradas foram 2,5 e 2,3 repectivamente.

Da mesma forma, Silva et al. (2002) estudando o efeito do BAP em abacaxizeiro, perceberam que a aplicação de BAP aumentou o número total de brotos até a concentração máxima de 2,52 mg L<sup>-1</sup>, a partir dessa concentração

houve um efeito negativo. Esses resultados contrastam com os de Ribeiro et al. (2008) que encontraram o maior número de brotos (3,5) em meio MS na presença de 5 mg L<sup>-1</sup> de BAP em copo-de-leite (*Zantedeschia aethiopica* L. Spreng). Já para Royero et al. (2007) a maior média de brotos (4,92) por explante foi obtida no meio MS suplementado com 0,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP em *D. alata*.

Adeniyil et al. (2008) relataram a regeneração de plantas a partir de gemas e ápices caulinares de *D. rotundata* e *D. alata* em meio MS + 0,01 mg L<sup>-1</sup> de ANA + 0,045 mg L<sup>-1</sup> de BAP com 75% de indução das brotações. Malaurie et al. (1995) já haviam relatado diferenças entre as auxinas e níveis de citocininas em *D. praehensilis*, e no complexo *D. cayenensis* - *D. rotundata*. É provável que os diferentes gêneros e espécies tenham diferente exigência de hormônios para regeneração ótima.

A maior percentagem de explantes brotados (80%) foi obtida em meio MS + 0,1 mg L<sup>-1</sup> de BAP. Concentrações de BAP superiores a 1,0 mg L<sup>-1</sup> podem ter causado um efeito fitotóxico nos explantes, e por isso, a percentagem de brotações foi significativamente menor quando comparada ao resultado obtido em 0,1 mg L<sup>-1</sup> de BAP (SOUZA et al., 2011). Cabrera et al. (2003), no estudo da micropropagação de *D. rotundata* Poir, observaram que o meio de cultura MS + 1 mg L<sup>-1</sup> BAP atingiu um número médio 2,66 brotos por explante.

Alguns autores relatam que o BAP, por ter um efeito mais expressivo na multiplicação *in vitro* quando comparado às outras citocininas, pode apresentar fitotoxicidade em algumas espécies quando utilizado em concentrações relativamente altas, acarretando um efeito negativo quando o objetivo é a indução de múltiplos brotos (PASQUAL, 2001; SOUZA et al., 2007).

Em estudos realizados por Chen et al. (2003), Kadota e Niimi (2004) e Poornima e Ravishankar (2007), sobre o efeito do BAP na multiplicação *in vitro* de *D. zingiberensis*, *D. japonica*, *D. oppositifolia* e *D. pentaphylla*, respectivamente, os autores observaram que melhores respostas, quanto à multiplicação *in vitro*, também ocorreram quando menores concentrações dessa citocinina foram adicionadas ao meio de cultura, corroborando com os resultados obtidos neste trabalho.

A determinação de uma concentração máxima vem sendo relatada em vários trabalhos, a partir da qual se observa um decréscimo no número de brotações, como o que foi observado nesse trabalho utilizando-se uma

concentração de 1,35 mg L<sup>-1</sup>. (PASQUAL; HOSHIKA, 1992; POORNIMA; RAVISHANKAR, 2007; ROYERO et al., 2007). O efeito negativo se dá, provavelmente, pela fitotoxidez causada pelo regulador de crescimento e, portanto, o ajuste dos protocolos deve buscar as melhores concentrações (RECH FILHO et al., 2005).

Para a variável número de nós, o meio de cultura MS2 + 0,05 mg L<sup>-1</sup> de BAP foi o que promoveu a melhor contribuição na formação do número de nós em plantas de inhame cultivadas *in vitro*, apresentando resultados superiores em relação aos demais tratamentos estudados. Já o meio de cultura MS1 na concentração de 0,05 de BAP não contribuiu de forma positiva na formação do número de nós em plantas de inhame cultivadas *in vitro* (Tabelas 10). A maior frequência do número de nós foi observada aos 120 dias de cultivo *in vitro* nas plantas de Inhame da Costa (Tabela 11).

Este resultando está de acordo com Antonio et al. (2012) que, ao estudarem o efeito dos meios de cultura: MS, B5 e WPM em *D. remotiflora*, observaram que o meio MS formou o maior número médio de brotos (2,0), número de nós (2,9) e número de folhas por segmento (5,2), bem como o maior comprimento da parte aérea (2,4 cm).

**Tabela 10.** Teste de qui-quadrado, frequência observada (fo), frequência esperada (fe) e contribuição para o valor de qui-quadrado (cq) do número de nós em função do meio de cultura e das concentrações de BAP em plantas de inhame da Costa (*Dioscorea rotundata* Poir.) cultivadas *in vitro*.

| Meio de cultura            | Concentrações de BAP (mg L <sup>-1</sup> ) |        |        |        |       |       |
|----------------------------|--|--------|--------|--------|-------|-------|
|                            | 0,00                                       | 0,05   | 0,15   | 0,45   | 1,35  | 4,05  |
| MS1                        | 138 <sup>1</sup>                           | 115    | 85     | 119    | 37    | 25    |
|                            | 129,56 <sup>2</sup>                        | 139,50 | 81,71  | 93,86  | 50,06 | 16,56 |
|                            | 0,55 <sup>3</sup>                          | 4,30   | 0,13   | 2,76   | 3,41  | 4,30  |
| MS2                        | 214 <sup>1</sup>                           | 264    | 137    | 145    | 99    | 20    |
|                            | 222,44 <sup>2</sup>                        | 239,50 | 140,29 | 161,10 | 85,94 | 28,44 |
|                            | 0,32 <sup>3</sup>                          | 2,51   | 0,07   | 1,62   | 1,98  | 2,50  |
| Qui-quadrado ( $\chi^2$ ): | 27,90                                      |        |        |        |       |       |
|                            | Probabilidade: 0,000                       |        |        |        |       |       |

<sup>1</sup>FO: frequência observada; <sup>2</sup>FE: frequência esperada; <sup>3</sup>CQ: valor do qui-quadrado

**Tabela 11.** Teste de qui-quadrado para número de nós em função dos períodos de avaliação em plantas de inhame da Costa (*Dioscorea rotundata* Poir.) cultivadas *in vitro*.

| Períodos de avaliação (dias)      | Frequência           |
|-----------------------------------|----------------------|
| 30                                | 135                  |
| 60                                | 212                  |
| 90                                | 374                  |
| 120                               | 670                  |
| Qui-quadrado ( $\chi^2$ ): 483,75 | Probabilidade: 0,000 |

Em trabalho realizado com segmentos nodais de *D. oppositifolia*, Behera et al. (2009) notaram uma alta taxa de proliferação de brotos utilizando duas citocininas de uma só vez (cinetina e BAP), combinadas com ANA em meio de cultura MS. Admite-se que estas diferentes expressões morfogênicas podem ser reflexos da natureza e do grau de diferenciação dos tecidos testados (TORRES et al., 1999). Além disso, a indução e expressão das possíveis respostas morfogênicas em culturas de células, tecidos e órgãos *in vitro*, são dependentes de fatores externos, químicos e físicos, como o meio de cultura, concentrações dos reguladores de crescimento vegetais além das condições de cultivo como temperatura e luminosidade e também de fatores inerentes ao material vegetal, como os hereditários ou genéticos e o estado fisiológico da planta mãe doadora do explante (GRATTAPAGLIA; MACHADO 1998)

O meio MS2 + 0,05 mg L<sup>-1</sup> de BAP proporcionou resultados significativos na formação de gemas/nó, já o meio MS2 suplementado com 0,45 mg L<sup>-1</sup> de BAP não respondeu de forma favorável a essa característica (Tabelas 12). Ao comparar a frequência do número de gemas/nó em função dos períodos de avaliação foi possível verificar os maiores valores aos 120 dias do cultivo *in vitro* (Tabela 13). Esses resultados discordam com os de Souza et al. (2011) quando adicionaram 3,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP ao meio de multiplicação MS e não observaram desenvolvimento de gemas *in vitro* para *D. multiflora*, ou seja, a concentração de 3,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP parece ter se tornado um fator limitante no desenvolvimento das gemas. Alguns estudos no gênero *Dioscorea* têm mostrado que o BAP é melhor que a cinetina na indução de um maior número de gemas (POORNIMA; RAVISHANKAR, 2007; YAN et al., 2011).

**Tabela 12.** Teste de qui-quadrado, frequência observada (fo), frequência esperada (fe) e contribuição para o valor de qui-quadrado (cq) do número de gemas/nó em função do meio de cultura e das concentrações de BAP em plantas de inhame da Costa (*Dioscorea rotundata* Poir.) cultivadas *in vitro*.

| Meio de cultura                 | Concentrações de BAP (mg L <sup>-1</sup> ) |        |                      |        |       |       |
|---------------------------------|--|--------|----------------------|--------|-------|-------|
|                                 | 0,00                                       | 0,05   | 0,15                 | 0,45   | 1,35  | 4,05  |
| MS1                             | 96 <sup>1</sup>                            | 83     | 58                   | 77     | 32    | 20    |
|                                 | 88,89 <sup>2</sup>                         | 89,28  | 65,21                | 67,93  | 40,76 | 15,14 |
|                                 | 0,57 <sup>3</sup>                          | 0,44   | 0,80                 | 1,21   | 1,88  | 1,56  |
| MS2                             | 133 <sup>1</sup>                           | 147    | 110                  | 98     | 73    | 19    |
|                                 | 140,11 <sup>2</sup>                        | 140,72 | 102,78               | 107,07 | 64,24 | 23,86 |
|                                 | 0,36 <sup>3</sup>                          | 0,28   | 0,51                 | 0,77   | 1,19  | 0,99  |
| Qui-quadrado ( $\chi^2$ ):13,71 |  |        | Probabilidade: 0,033 |        |       |       |

<sup>1</sup> FO: frequência observada; <sup>2</sup> FE: frequência esperada; <sup>3</sup> CQ: valor do qui-quadrado

**Tabela 13.** Teste de qui-quadrado para número de gemas/nós em função dos períodos de avaliação em plantas de inhame da Costa (*Dioscorea rotundata* Poir.) cultivadas *in vitro*.

| Períodos de avaliação (dias)     | Frequência |
|----------------------------------|------------|
| 30                               | 139        |
| 60                               | 200        |
| 90                               | 264        |
| 120                              | 345        |
| Qui-quadrado ( $\chi^2$ ): 98,59 |            |
| Probabilidade: 0,000             |            |

Silveira et al. (2001) obtiveram as melhores respostas para o número de gemas no estudo de porta-enxertos do gênero *Prunus* no meio de cultura MS + 0,34 mg L<sup>-1</sup> BAP. Os meios ricos em sais dificultam a proliferação de gemas e este fato se agrava ainda mais quando maiores concentrações de BAP forem adicionadas aos meios de cultura.

Uma característica importante a ser observada durante a micropropagação refere-se ao tamanho do explante, pois explantes pequenos, normalmente apresentam crescimento mais lento quando comparados aos maiores (PEREIRA et al., 2000).

O teste de qui-quadrado ( $\chi^2$ ), evidenciou que o meio de cultura MS2 apresentou uma maior quantidade de plantas oxidadas, quando comparado ao meio MS1 (Tabela 14). A concentração de 20 mg L<sup>-1</sup> de cisteína adicionada ao

meio MS2 não foi eficiente para controlar a oxidação das plantas de inhame *in vitro*. Provavelmente, outros fatores estejam relacionados aos altos níveis de oxidação encontrada nos diferentes tratamentos, como a época do ano, a idade do explante, ou os mecanismos de defesa da planta, expressos através da produção de polifenóis, os quais sofrem ação das polifenases provocando o escurecimento do explante e/ou do meio (MARINHO et al., 2011). Com isso, tornase necessária à realização de novos ensaios a fim de se testar outros antioxidantes para a cultura do inhame.

**Tabela 14.** Teste de qui-quadrado para percentagem de oxidação em função do tipo de meio de cultura em plantas de inhame da Costa (*Dioscorea rotundata* Poir.) cultivadas *in vitro*.

| Tipo de meio                     | Percentagem (%)      |
|----------------------------------|----------------------|
| MS1                              | 39                   |
| MS2                              | 48                   |
| Qui-quadrado ( $\chi^2$ ): 33,99 | Probabilidade: 0,000 |

Avaliando-se as concentrações de BAP de forma isolada, foi possível observar que a concentração de 1,35 mg L<sup>-1</sup> de BAP foi mais expressiva na oxidação das plantas (Tabela 15). O teste do qui-quadrado evidenciou que o cultivo *in vitro* do inhame aos 90 dias proporcionou a maior percentagem de plantas oxidadas (Tabela 16).

**Tabela 15.** Teste de qui-quadrado para percentagem de oxidação em função das concentrações de BAP em plantas de inhame da Costa (*Dioscorea rotundata* Poir.) cultivadas *in vitro*.

| Concentrações de BAP (mg L <sup>-1</sup> ) | Percentagem (%)      |
|--|----------------------|
| 0,00                                       | 6                    |
| 0,05                                       | 4                    |
| 0,15                                       | 2                    |
| 0,45                                       | 7                    |
| 1,35                                       | 27                   |
| 4,05                                       | 19                   |
| Qui-quadrado ( $\chi^2$ ): 45,30           | Probabilidade: 0,000 |

**Tabela 16.** Teste de qui-quadrado para percentagem de oxidação em função dos períodos de avaliação em plantas de inhame da Costa (*Dioscorea rotundata* Poir.) cultivadas *in vitro*.

| Períodos de avaliação (dias)    | Percentagem (%)     |
|---------------------------------|---------------------|
| 30                              | 6                   |
| 60                              | 17                  |
| 90                              | 22                  |
| 120                             | 30                  |
| Qui-quadrado ( $\chi^2$ ): 9,40 | Probabilidade: 0,02 |

Os meios MS2 acrescido de 0,00 ou de 0,15 mg L<sup>-1</sup> BAP apresentaram percentagem de plantas sobreviventes de 100%. Foi observado que no meio MS2+ 0,05 mg L<sup>-1</sup> de BAP a taxa de contaminação foi maior do que para os outros tratamentos, sendo que a percentagem de contaminação foi de 13%.

Estudos têm mostrado que a presença de BAP afeta a sobrevivência do explante para espécies de *Dioscorea* e também pode diminuir a produção de microtubérculos (ISLAM et al., 2008).

Sabe-se que citocininas desempenham papel importante em vários processos durante crescimento e desenvolvimento das plantas, tais como estímulo à divisão celular, inibição da senescência, e aumento da dominância apical, e transmissão de sinais nutricionais. No entanto, as respostas do tecido dependem da espécie da planta, bem como da fase de desenvolvimento da estrutura considerada (SAKAKIBARA, 2010).

## CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos nas condições experimentais em que este trabalho foi estabelecido, pode-se concluir que:

O meio de cultura MS com modificações sem adição ou adicionando 0,05 mg L<sup>-1</sup> de BAP, proporcionou o melhor desenvolvimento das plantas de inhame com maior número de nós.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADENIYI, O. J.; ADETIMIRIN, V. O.; INGELBRECHT, I.; ASIEDEU, R. Shoot and plantlet regeneration from meristems of *Dioscorea rotundata* Poir and *Dioscorea alata* L. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v.7,n. 8, p. 1003-1008, 2008.

AHANHANZO,C.; GANDONOU, CH.B.; AGBIDINOUKOUN, A.; DANSI, A.; AGBANGLA, C. Effect of two cytokinins in combination with acetic acid  $\alpha$ -naphthalene on yams (*Dioscorea* spp.) genotypes' response to in vitro morphogenesis. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v.9, n.5,p.8837-8843, 2010.

ANTONIO, A. B.; RUVALCABA, F. S. C.; SOSA, F. C. Effect of plant growth regulators on plant regeneration of *Dioscorea remotiflora* (Kunth) through nodal explants. **Plant Growth Regul**, New York, v. 68, p.293-301, 2012.

BEHERA, K. K.; SAHOO ,S.; PRUSTI, A. B. Effect of plant growth regulator on invitro micropropagation of Bitter Yam (*Dioscorea hispida* Dennst.). **International Journal of Integrative Biology**, Naples, v.4, n.1, p.50-54, 2008.

BEHERA, K.K.; SAHOO, S.; PRUSTI, A. Regeneration of Plantlet of Water Yam (*Dioscorea oppositifoliaa* L.) through *In vitro* Culture from Nodal Segments. **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici**, Clu-Napocaj, v. 37, n.1, p.94-102, 2009.

CABRERA, M.; TORRES, Y.; SANTOS, A.; BASAIL, M.; RAYAS, A.; MEDERO, V.; ROBAINA, A.;LÓPEZ, J.; GARCÍA, M.; VENTURA, J. C.; GUTIÉRREZ, V.; OTERO, E.; BAUTA, M. M. Establecimiento y multiplicación *in vitro* del clon de ñame blanco de guinea (*Dioscorea rotundata* Poir). Villa Clara, Cuba: INIVIT. 2003. 7p.

CHEN, Y.; JINYU, F.; FEI, Y.; ZHONGXUN, L.; YUNSHENG, F. Rapid clonal propagation of *Dioscorea zingiberensis*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, The Hague, v.73, n.1, p.75-80, 2003.



CHEN, F. Q.; FU, Y.; WANG, D. L.; GAO, X.; WANG, L. The effect of plant growth regulators and sucrose on the micropropagation and microtuberization of *Dioscorea nipponica* Makino. **Journal of plant growth regulation**, Netherlands, v. 26, p.38-45, 2007.

COSTA, F. H da S.; PEREIRA, M. A. A.; OLIVEIRA, J. P de O.; PEREIRA, J. E. S. Efeito de agentes geleificantes alternativos no meio de cultura no cultivo *in vitro* de abacaxizeiro e bananeira. **Ciência e agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n.1, p. 41-46, 2007.

FERREIRA, D. F. Programa computacional Sisvar - UFLA, versão 5.3, 2010.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture – the technology**. 2. ed. Edington: Exegetics Limited, 1996.1574p.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI; EMBRAPA-CNPH, 1998. p. 183-260.

HU, C. Y.; WANG, P. J. Meristem, shoot tip and budcultures. In: EVANS, D. A.; SHARP, W. R.; AMMIRATO, P. V.; YAMADA, Y. (Ed.). **Handbook of plant cell culture**, 1983. v. 1, p. 177-227.

ISLAM, M. T.; KELLER, E. R. J.; DEMBELE, D. P. Effects of growth regulators on *in vitro* propagation and tuberization of four *Dioscorea* species. **Plant Tissue Culture and Biotechnology**, Bangladesh, v.18, p.25-35, 2008.

JEAN, M.; CAPPADOCIA, M. In vitro tuberization in *Dioscorea alata* L. “Brazo Forte” and “Florido” and *D. abyssinica* Hoch. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Lodon, v. 26, p.147-152, 1991.

KADOTA, M.; NIIMI, Y. Improvement of micropropagation of Japanese yam using liquid and gelled medium culture. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam v.102, p.461-466, 2004.

MACÊDO, C. E. C.; SILVA, M. G.; NÓBREGA, F. S.; MARTINS, C. P.; BARROSO, P. A. V.; ALLOUFA, M. A. I. Concentrações de ANA e BAP na micropropagação de abacaxizeiro L. Merrill (*Ananas comosus*) e no cultivo hidropônico das plântulas obtidas *in vitro*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal v.25, n.3, p.501-504, 2003.

MADEIRA, N. R.; TEXEIRA, J. B.; ARIMURA, C. T.; JUNQUEIRA, C. S. Influência da concentração de BAP e AG<sub>3</sub> no desenvolvimento *in vitro* de mandioquinha-salsa. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.23, n.4, p.982-985,2005.

MAHESH, R.; MUTHUCHELIAN, K.; MARIDASS, M.; RAJU, G. *In vitro* propagation of wild yam, *Dioscorea wightii* through nodal cultures. **International Journal of Biological Technology**, Switzerland v.1, p.111-113, 2010.

MALAUURIE, B.; PUNGU, O.; TROUSLOT, M. Effect of growth regulators concentrations on morphological development of meristem-tips in *Dioscorea cayenensis-D. rotundata* complex and *D. praehensilis*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, London, v.4, p. 229-235. 1995.

MARINHO, M. J. M.; ALBUQUERQUE, C. C.; MORAIS, M. B.; SOUZA, M.C.G.; SILVA, K.M.B. Estabelecimento de protocolo para micropropagação de *Lippia gracilis* Schauer. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.13, n.2, p.246-252, 2011.

MURASHIGE T, SKOOG F. A. A revised medium for a rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures. **Physiologia Plantarum**,Copenhagen, v. 15,p. 473-479, 1962.

PASQUAL, M.; HOSHIKA, E. Efeitos do ácido naftaleno acético e 6 benzilaminopurina sobre a proliferação *in vitro* de cactos *Gymnocalidium buldiamur* L. e *Mammillaria bocassana* L. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 27, n. 4, p. 589-593, 1992.

PASQUAL, M. **Cultura de tecidos**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2001.165p.

PEREIRA, J.E.S.; FORTES, G.R.L. Avaliação da posição dos explantes e diferentes concentrações de BAP na regeneração *in vitro* da batata. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.18, p.177-178, 2000.

POORNIMA G.N.; RAVISHANKAR RAI, V. *In vitro* propagation of wild yams, *Dioscorea oppositifolia* (Linn) and *Dioscorea pentaphylla* (Linn). **African Journal of Biotechnology**, Pretoria, v.6, n.20, p.2348- 2352, 2007.

OLIVEIRA, A. P. Nutrição e época de colheita do inhame (*Dioscorea* sp.) e seus reflexos na produção e qualidade de túberas. In: SIMPÓSIO NACIONAL SOBRE AS CULTURAS DO INHAME E DO TARO, 2. 2002. João Pessoa, PB. **Anais...** João Pessoa, PB: EMEPA-PB, v.1, 2002. p. 83-98.

OLIVEIRA, A. P.; BARBOSA, L. J. N; PEREIRA, W. E.; SILVA, J. E. L.; OLIVEIRA, A. N. P. Produção de túberas comerciais de inhame em função de doses de nitrogênio. **Horticultura Brasileira**, Brasília,v. 25,p. 73-76, 2007.

RECH FILHO, A.; DAL VESCO, L. L.; NODARI, R. O.; LISCHKA, R. W.; MULLER, C.V.; GUERRA, M. P. Tissue culture for the conservation and mass propagation of *Vriesea reitzii* Leme and Costa, a bromeliad threatened of extinction from the Brazilian Atlantic Forest. **Biodiversity and Conservation**, Paris, v.14, p.1799-1808, 2005.

RIBEIRO, M de. N.; PASQUAL, M.; BORTOLOTTI, A. da S.; RODRIGUES, V. A. Diferentes concentrações de sais do meio MS e de sacarose na multiplicação *in vitro* de *Zantedeschia aethiopica* L. Spreng. (copo-de-leite). **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 39, n. 01, p. 101-106, 2008.

ROCHA, P. S. G.; SCHUCH, M. W.; BIANCHI, V. J.; FACHINELLO, J. C. QUALIDADE DA LUZ NA MICROPROPAGAÇÃO DO PORTA-ENXERTO DE *Prunus* cv. Mr. S. 2/5. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 23, n. 3, p. 32-40, 2007

ROYERO, M.; VARGAS, T. E.; OROPEZA, M. Micropropagación y organogénesis de *Dioscorea alata* (ÑAME). **Interciência**, Caracas, v.32, p.247-252, 2007.

SAKAKIBARA, H. Cytokinin biosynthesis and metabolism. In: DAVIES, P.J. **Plant hormones**. Cornell University, New York, 2010. p. 95-114.

SANTOS, E. S. Sistemas de plantio e tamanhos de túberas-semente de inhame. In: **Contribuição tecnológica para a cultura do inhame no estado da Paraíba**. João Pessoa: EMEPA-PB, 1998.

SANTOS, E. S; MACÊDO, L. S. Tendências e perspectiva da cultura do inhame (*Dioscorea* sp.) no nordeste do Brasil. In: SIMPÓSIO NACIONAL SOBRE AS CULTURAS DE INHAME E TARO, 2. 2002. João Pessoa, PB. **Anais...** João Pessoa, PB: EMEPA-PB, v.1, 2002, p. 19-32.

SAS INSTITUTE. **SAS user's guide**: statistic: version 9.1.3. Cary: SAS Institute, 2004. 846 p.

SHIN, J. H.; KIM, S. K.; KWON, J. B.; LEE, B. H.; SHON, J. K. Factors affecting the production of invitro plants from the Nodal Pieces of Chinese Yam (*Dioscorea opposita* Thunb). **Journal of Plant Biotechnology**, Coréia do Sul, v.6, n.2, p.97-102, 2004.

SILVA, A. B.; PASQUAL, M.; MACIEL, A. L de R.; MOREIRA, M. A.; DUTRA, L. F. Influência da benzilaminopurina e do benomyl na proliferação *in vitro* de abacaxizeiro. **Ciência e agrotecnologia**, Lavras, v.26, n.6, p.1190-1196, 2002.

SILVEIRA, C. A. P.; FACHINELLO, J. C.; LUCES, G. R.; CITADIN, I.; RODRIGUES, A. C.; QUEZEDA, A. C.; SILVA, J. B. Multiplicação *in vitro* de porta-enxertos do gênero *Prunus* sob diferentes concentrações de BAP em dois meios de cultura. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 23, n. 3, p.488-492, 2001.

SOUZA, A.V.; PEREIRA, A.M.S. Enraizamento de plantas cultivadas *in vitro*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.9, n.4, p.103-117, 2007.

SOUZA, A.V.; PINTO, J.E.B.; BERTOLUCCI, S. *In vitro* Propagation of *Lychnophora pinaster* (Asteraceae): a threatened endemic medicinal plant. **Hortscience**, Amsterdam, v.42, n.7, p.1665-1669, 2007.

SOUZA, A. V.; BERTONI, B. W.; FRANÇA, S de C.; PEREIRA, A. M. S. Micropropagação de *Dioscorea multiflora* Grised. **Revista Ciência e agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 1, p. 92-98, 2011.

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPH, v. 1, 1998. 509p.

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI / Embrapa-CNPH, v.2, 1999. 524p.

YAN, H.; YANG, L.; LI ,Y. Axillary shoot proliferation and tuberization of *Dioscorea fordii* Prain et Burk. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Londonn,v. 104,p.193-198, 2011.

## **CAPÍTULO 3**

### **MICROPROPAGAÇÃO DE INHAME DA COSTA (*Dioscorea rotundata* POIR.) EM DIFERENTES INTENSIDADES DE LUZ<sup>1</sup>**

---

<sup>1</sup> Artigo a ser ajustado e submetido ao Comitê Editorial do periódico científico Ciência e Agrotecnologia.

## MICROPROPAGAÇÃO DE INHAME DA COSTA (*Dioscorea rotundata* POIR.) EM DIFERENTES INTENSIDADES DE LUZ

Autora: Karine da Silva Simões  
Orientador: Sebastião de Oliveira e Silva  
Co-orientadora: Lucymeire Souza Morais Lino

**Resumo** - As respostas da planta não dependem apenas de ausência ou presença de luz, mas também da variação em qualidade e intensidade de luz. Cada espécie responde de maneira distinta ao sombreamento. O trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de diferentes intensidades de luz na micropropagação do Inhame da Costa. Microestacas de plantas de Inhame pré-estabelecidas *in vitro* foram inoculadas em meio de cultura MS suplementado com 100 mg L<sup>-1</sup> de Inositol, 20 mg L<sup>-1</sup> de cisteína, 0,20 mg L<sup>-1</sup> de ANA, 0,15 mg L<sup>-1</sup> de BAP, 0,08 mg L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub>, 30g L<sup>-1</sup> de sacarose e 7,5 g L<sup>-1</sup> de ágar, e cultivadas em duas temperaturas e em quatro intensidades de luz: T1 - 100% de iluminação em sala de crescimento (SC); T2 - 70% de iluminação em SC; T3 - 50% de iluminação em SC; T4 - 30% de iluminação em SC; T5 - 100% de iluminação em BOD; T6 - 70% de iluminação em BOD; T7 - 50% de iluminação em BOD e T8 - 30% de iluminação em BOD. As culturas foram mantidas em caixas de madeira, com paredes de sombrite com diferentes percentuais de sombreamento correspondente a cada tratamento, em sala de crescimento com temperatura de 27 ± 1°C, luminosidade de 30 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> e fotoperíodo de 16 horas, e na câmara BOD com temperatura de 30 ± 1°C, luminosidade de 30 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> e fotoperíodo de 16 horas. As avaliações foram realizadas aos 30, 60 e 90 dias e os parâmetros avaliados foram altura de planta, número de folhas, de brotos, raízes, nós e gemas/nós, percentagem de plantas sobreviventes, de contaminação e de oxidação. Os resultados mostraram que as plantas de inhame cultivadas sob 30% de intensidade de luz na temperatura de 27 °C promoveu as melhores respostas *in vitro* quando comparadas aos outros tratamentos.

**Palavras chave:** Meio de cultura, brotos, cultura de tecidos.

## MICROPROPAGATION YAM COAST (*Dioscorea rotundata* POIR.) IN DIFFERENT LIGHT INTENSITIES.

Author: Karine da Silva Simões

Adviser: Sebastião de Oliveira e Silva

Co-adviser: Lucymeire Souza Morais Lino

**Abstract** - The plant responses do not only depend upon absence or presence of light, but also the variation in quality and intensity. Each species responds differently to shading. The objective of this work was to evaluate the effect of different light intensities on micropropagation of Yam Coast. Microcuttings of Yam plants pre-established *in vitro* were inoculated on MS.culture medium supplemented with 100 mg L<sup>-1</sup> Inositol, 20 mg L<sup>-1</sup> cysteine, 0,20 mg L<sup>-1</sup> NAA, 0,15 mg L<sup>-1</sup> BAP, 0,08 mg L<sup>-1</sup> of GA<sub>3</sub>, 30g L<sup>-1</sup> sucrose and 7,5 g L<sup>-1</sup> Agar, and cultivated in two cultivation environments with different light intensities: T1 - 100% of lighting in growth room (GR); T2 - 70% of lighting in GR; T3 - 50% of lighting in GR; T4 - 30% of lighting in GR; T5 - 100% of lighting in BOD; T6 - 70% of lighting in BOD; T7 - 50% of lighting in BOD and T8 - 30% of lighting in BOD. The Cultures were maintained in wooden boxes, with walls of metting with different percentages of shading corresponding to each treatment, in a growth room with a temperature of 27 ± 1°C, brightness of 30 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> and photoperiod of 16 hours, and in camera BOD with temperature of 30 ± 1°C, brightness of 30 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> and photoperiod of 16 hours. The evaluations were performed at 30, 60 and 90 days and the parameters evaluated were plant height, number of leaves, shoots, roots, buds and buds/node percentage of surviving plants, contamination and oxidation.

The results showed that the plants of yam grown under 30% of the luminous intensity at a temperature of 27 °C promoted the best responses *in vitro* when compared to other treatments.

**Key Words:** Culture medium, shoots, tissue culture.



## INTRODUÇÃO

Dentre as espécies de inhame cultivadas, as mais importantes, por suas túberas comestíveis são: *D. cayennensis* Lam. (inhame amarelo), *D. rotundata* Poir. (inhame branco), *D. alata* L. Many (inhame água), *D. trifida* L. e *D. esculenta* L. Schott (SANTOS, 1996).

Apesar da importância que a cultura representa para o agronegócio nordestino, a sua produtividade ainda continua baixa, em decorrência das condições inadequadas de manejo da cultura, baixa fertilidade do solo, uso de túberas sementes de qualidade inferior, métodos de propagação ineficazes e problemas fitossanitários. O desenvolvimento de novas tecnologias em complementação as atuais, pode vir a contribuir para a melhoria da produtividade e qualidade da cultura, possibilitando assim, a oferta de um produto de qualidade para atender as exigências dos mercados interno e externo (GARRIDO et al., 2003).

Para que a aplicação da micropropagação na produção de mudas torne-se viável comercialmente e possa competir com os métodos tradicionais de propagação, faz-se necessário reduzir os custos de produção Altman (1999), que se devem em grande parte às perdas causadas pela contaminação *in vitro*, por desordens fisiológicas e morfológicas nas plantas, baixa percentagem de sobrevivência das plantas no estágio de aclimatização às condições *ex vitro*, falta de mão-de-obra especializada para a intensiva manipulação dos frascos e das plantas Kozai e Kubota (2001) e, principalmente o elevado custo de funcionamento e manutenção das salas de crescimento com regime de luz artificial e temperatura controlada, onde as culturas *in vitro* são normalmente incubadas (KODYM; ZAPATA-ARIAS, 1998).

Kodym e Zapata-Arias (1999) afirmam que além dos reguladores de crescimento, a intensidade de luz também influencia consideravelmente a taxa de multiplicação e o crescimento de explantes cultivados *in vitro*. Esses autores observaram que o número de brotos por explante de bananeira foi maior sob luz natural, do que sob o cultivo convencional com iluminação artificial. Uma provável explicação para elevação nas taxas de multiplicação na luz solar, é que a intensidade de luz elevada poderia estar reduzindo as concentrações de auxinas

endógenas das gemas através da fotoxidação, provocando um deslocamento do balanço hormonal em direção às citocininas (RADMANN et al., 2001)

Segundo Felfili (1997) a intensidade da luz afeta o crescimento das plantas por efeitos sobre a fotossíntese, a abertura estomática e a síntese de clorofila. Suprimento inadequado de um desses fatores pode reduzir o vigor da planta e limitar seu desenvolvimento.

O sombreamento artificial realizado através do uso de telas do tipo “sombrite” é um método muito utilizado no estudo das necessidades luminosas das diferentes espécies, por ser uma prática capaz de isolar e quantificar o efeito da intensidade de luz e fornecer às parcelas experimentais condições uniformes de iluminação, quando comparadas aos estudos em condições naturais (RÊGO; POSSAMAI, 2006).

A capacidade de crescer rapidamente quando moderadamente sombreadas é um mecanismo importante de adaptação das espécies, constituindo uma estratégia de fuga à baixa e alta intensidade de luz. A adaptação às baixas intensidades de luz é uma característica genética, a qual faz com que as folhas apresentem estrutura anatômica e propriedades fisiológicas que as capacitem ao uso efetivo da radiação solar disponível. (LARCHER, 2000).

A luz é um fator fundamental para as plantas no processo de regulação de seu crescimento e desenvolvimento vegetativo e reprodutivo. As respostas morfofisiológicas das plantas não dependem apenas da presença, atenuação ou ausência da luz, mas também da variação em qualidade e intensidade de luz (LARCHER, 2004).

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de diferentes intensidades de luz na micropropagação do Inhame da Costa (*Dioscorea rotundata* Poir.).

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Origem do material vegetal**

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Mandioca e Fruticultura, em Cruz das Almas, BA. Túberas de Inhame da

Costa (*Dioscorea rotundata* Poir.) foram tratadas com os fungicidas Furadan (3 ml L<sup>-1</sup>) e Ridomil (2 g L<sup>-1</sup>) por 10 minutos foram colocadas em ambiente fresco para secar por dois dias. Posteriormente as túberas foram seccionadas em quatro partes e estabelecidas em bandejas de polietileno, contendo areia lavada, para germinação.

Depois de 70 dias do plantio, as plantas formadas foram cortadas em pedaços de 2 cm contendo gemas apicais ou laterais, e colocadas em recipiente com água destilada. Em condições assépticas os explantes foram desinfestados com álcool 70% por quatro minutos e hipoclorito de sódio 60% contendo 1% de cloro ativo com duas gotas de Tween-20, por oito minutos, seguido da tripla lavagem em água destilada autoclavada.

### **Estabelecimento *in vitro***

Os explantes desinfestados em condições assépticas foram reduzidos e inoculados em tubos de ensaio contendo aproximadamente 10 mL do meio de cultura constituído de sais e vitaminas do meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), acrescido de 100 mg L<sup>-1</sup> de Inositol, 20 mg L<sup>-1</sup> de cisteína, 0,20 mg L<sup>-1</sup> de ácido naftalenoacético (ANA), 0,15 mg L<sup>-1</sup> de benzilaminopurina (BAP), 0,08 mg L<sup>-1</sup> de ácido giberélico (GA<sub>3</sub>), 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, solidificado com 7,5 g L<sup>-1</sup> de ágar e pH ajustado em 5,8 antes da autoclavagem. O meio utilizado na fase de estabelecimento foi desenvolvido pelo International Institute of Tropical Agriculture (IITA), porém foram feitas modificações para adequar as necessidades da espécie em estudo. Os tubos foram mantidos em sala de crescimento, sob condições de temperatura de 27 ± 1 °C, densidade de fluxo de fótons de 30 μmol m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> e fotoperíodo de 16 horas, durante 90 dias para servirem de fontes de explantes para o estabelecimento dos experimentos.

### **Cultivo das microestacas em diferentes intensidades de luz**

Microestacas com tamanho de 1 cm de comprimento, de Inhame da Costa, foram inoculadas no mesmo meio de cultura da fase de estabelecimento e cultivadas em diferentes ambientes e intensidades de luz. Foram testadas diferentes intensidades de luz em dois ambientes de cultivo: T1 - 100% de

iluminação em sala de crescimento (SC); T2 - 70% de iluminação em SC; T3 - 50% de iluminação em SC; T4 - 30% de iluminação em SC; T5 - 100% de iluminação em BOD; T6 - 70% de iluminação em BOD; T7 - 50% de iluminação em BOD e T8 - 30% de iluminação em BOD. As culturas foram mantidas em caixas de madeira, com paredes de sombrite com diferentes intensidades de luz correspondente a cada tratamento, em sala de crescimento com temperatura de  $27 \pm 1^\circ\text{C}$ , na câmara BOD com temperatura de  $30 \pm 1^\circ\text{C}$  com luminosidade de  $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e fotoperíodo de 16 horas (Figura 1).



**Figura 1.** Detalhe da caixa de madeira com paredes revestidas por sombrite

Aos 30, 60 e 90 dias após a inoculação, avaliaram-se a altura da planta [AP (cm)], número de folhas (NF), raízes (NR), brotos (NB), nó (NN), e número de gema por nó (NGN), percentagem de plantas sobreviventes, de contaminação e de oxidação.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 4x2 (4 tipos de intensidades de luz e 2 temperaturas) com 20 repetições por tratamento e três períodos de avaliação.

A variável altura da planta foi submetida à análise da variância considerando o delineamento inteiramente casualizado em esquema de parcelas subdivididas no tempo, em que a parcela foi composta pelos tratamentos e a subparcela composta pelas épocas de avaliação e suas interações com os tratamentos da parcela. As médias das intensidades de luz e períodos de avaliação foram ajustadas para modelos de regressão linear.

As variáveis números de folhas, de raízes, de brotos, de nós e número de gemas por nós, percentagem de plantas sobreviventes, de contaminação e de

oxidação foram analisadas pelo teste de igualdade de proporção de qui-quadrado ( $\chi^2$ ).

A análise de variância foi realizada com auxílio do programa estatístico Sisvar Ferreira (2010) e o teste não paramétrico de qui-quadrado foi realizado com auxílio do programa SAS – Statistical Analysis System (SAS INSTITUTE, 2004).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 encontra-se o resumo da análise de variância. As plantas diferiram significativamente quanto às intensidades de luz (IL) e períodos de avaliações (PA) na variável altura da planta ( $p < 0,05$ ). Não houve diferença estatística entre as interações duplas e nem para interação tripla.

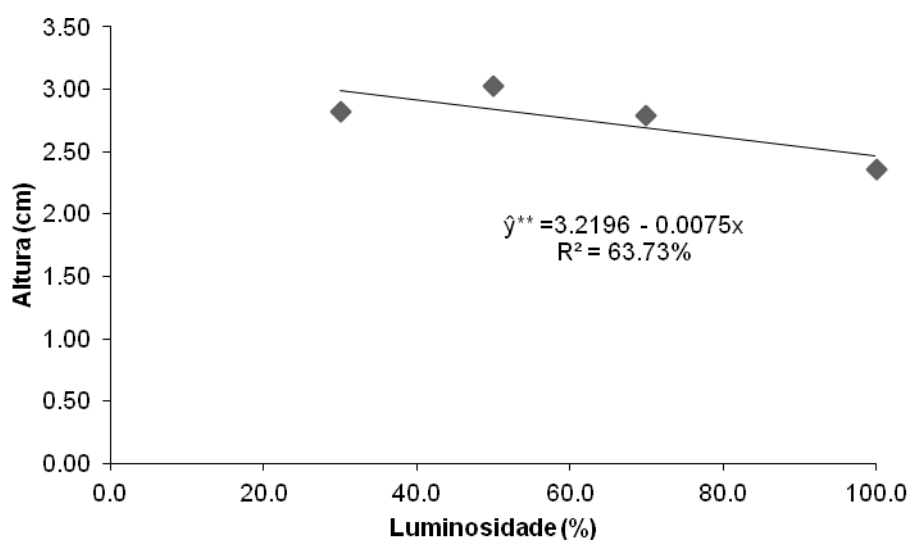
**Tabela 1.** Resumo da análise de variância para altura de planta (AP), em cm, em função da intensidade de luz, temperatura e períodos de avaliações para o inhame da Costa cultivado *in vitro*.

| Fontes de Variação          | GL    | QM                 |
|-----------------------------|-------|--------------------|
|                             |       | Altura de Planta   |
| Intensidades de luz (IL)    | 3     | 9,33**             |
| Temperatura (TP)            | 1     | 4,18 <sup>ns</sup> |
| Períodos de avaliações (PA) | 2     | 75,73**            |
| Erro 1                      | 152   | 3,47               |
| IL x TP                     | 3     | 4,02 <sup>ns</sup> |
| IL x PA                     | 6     | 0,46 <sup>ns</sup> |
| TP x PA                     | 2     | 0,53 <sup>ns</sup> |
| IL x TP x PA                | 6     | 0,30 <sup>ns</sup> |
| Erro 2                      | 304   | 0,39               |
| CV (%)                      | 22,97 |                    |
| Média Geral                 | 2,75  |                    |

\*\* significativo a 1% de probabilidade pelo teste de F. <sup>ns</sup> não significativo a 5% de probabilidade.

Entre os diversos componentes do ambiente, a luz é primordial para o crescimento das plantas, não só por fornecer energia para a fotossíntese, mas também, por fornecer sinais que regulam seu desenvolvimento por meio de receptores de luz sensíveis a diferentes intensidades e qualidade espectral. Dessa forma, modificações nos níveis de luminosidade ao qual uma espécie esteja adaptada podem condicionar diferentes respostas fisiológicas em suas características anatômicas e de crescimento (ATROCH et al., 2001).

Os resultados mostraram que a presença de 100% de intensidade de luz propiciou as menores alturas para o cultivo do inhame *in vitro* (2,36 cm). Já com a intensidade de 30% as alturas foram de 2,82 cm (Figura 2). Resultados diferentes foram encontrados por Dignart (2006) no estudo de orquídea, onde o comprimento da parte aérea foi maior em sala de crescimento com 100% de intensidade de luz, e por Araujo et al. (2007) que obtiveram o maior comprimento da parte aérea (3,0 cm) em plântulas de orquídeas sob condições de sala de crescimento com 100% da intensidade de luz. Apesar de Chu e Figueiro-Ribeiro (1991) afirmarem que crescimento do tubérculo, a floração, e produção de sementes estão correlacionados com a diminuição períodos de luz.



**Figura 2.** Efeito da intensidade de luz na altura de plantas de inhame da Costa cultivadas *in vitro*.

Matos et al. (2009) ao avaliarem o efeito da intensidade de luz sobre as características fisiológicas de pinhão manso obtiveram maiores altura das plantas, no tratamento cultivado sob telado com 40% da intensidade de luz. Resultados similares foram encontrados por Radmann et al. (2001) para *Gypsophila paniculata*, uma planta ornamental que respondeu com uma taxa de crescimento maior no tratamento de menor intensidade de luz. No entanto, resultados contrários para a altura da parte aérea em bananeira foram observados por Costa et al. (2009) onde a maior média dessa característica foi obtida ao utilizar ambiente com 100% da intensidade luminosa nas cultivares

‘Caipira’ e ‘Pacovan’.

Para Ventura (2007) as plantas *in vitro* de orquídeas apresentaram resposta positiva do crescimento com a elevação dos níveis de intensidade de luz. Isso demonstra a elevada plasticidade fotossintética destas plantas, quando cultivadas em diferentes condições luminosas. Resultados opostos foram encontrados por Regô e Possamar (2006), que estudando espécies lenhosas, observaram que a altura das plantas jovens apresentou os maiores valores quando submetidas ao nível de 63 % de luminosidade.

Kodym e Zapata-Arias (1998) afirmaram que além dos reguladores de crescimento, a luz também influencia consideravelmente a taxa de multiplicação e o crescimento de explantes cultivados *in vitro*. Assim como para Erig e Schuch (2005), as respostas promovidas pela qualidade da luz no crescimento e desenvolvimento das plantas, podem variar dependendo da espécie utilizada e do estágio de desenvolvimento do explante cultivado.

Dentre os parâmetros utilizados para avaliar as respostas de crescimento de plantas à intensidade de luz, o uso mais frequente é a altura da planta, visto que a capacidade em crescer rapidamente quando sombreadas é um mecanismo de adaptação, compreendendo em uma valiosa estratégia para escapar do sombreamento. Esse comportamento foi notado para as mudas de copaíba em presença de sombra, apresentando uma resposta linear crescente em espécies arbóreas com a elevação dos níveis de sombreamento (MORAES NETO et al., 2000).

O crescimento das plantas é controlado por uma série de hormônios de crescimento, tais como a auxina, que é sensível a elevadas intensidades de luz; as citocininas, que atuam junto às próprias auxinas na divisão celular em cultura de tecidos, e giberelinas, que controlam o alongamento dos brotos.

Quando se compara o efeito dos períodos de avaliação do Inhame da Costa obteve-se o melhor desenvolvimento da altura das plantas (3,49 cm) aos 90 dias de cultivo *in vitro* (Tabela 2).

**Tabela 2.** Valores médios da altura de plantas em cm, em função dos períodos de avaliação nas plantas de inhame da Costa cultivadas *in vitro* (*Dioscorea rotundata* Poir.).

| Períodos de avaliação | Médias |
|-----------------------|--------|
| 30                    | 2,13 c |
| 60                    | 2,64 b |
| 90                    | 3,49 a |

Médias seguidas pelas mesmas letras minúscula nas colunas, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Com 100% da intensidade de luz foi possível observar um maior número de folhas, quando comparados aos outros tratamentos (Tabela 3). A temperatura de 27 °C favoreceu mais o número de folhas quando comparada à temperatura de 30 °C (Tabela 4). Pasqual et al. (2011) ao analisarem o número de folhas para espécies nativas e híbridas de orquídeas, observaram que as duas espécies obtiveram melhores resultados na presença de 100% de intensidade de luz. Assim também Dignart (2006), em trabalho com *Cattleya walkeriana* observou que o número de folhas em sala de crescimento com 100% de intensidade de luz foi maior do que em casa de vegetação, além do que as malhas coloridas utilizadas em outros tratamentos não resultaram em diferenças significativas para essa variável.

**Tabela 3.** Teste de qui-quadrado para número de folhas em função da intensidade de luz nas plantas de inhame da Costa cultivadas *in vitro* (*Dioscorea rotundata* Poir.).

| Intensidades de luz (%)          | Frequência           |
|----------------------------------|----------------------|
| 30                               | 485                  |
| 50                               | 630                  |
| 70                               | 630                  |
| 100                              | 660                  |
| Qui-quadrado ( $\chi^2$ ): 30,97 | Probabilidade: 0,000 |



**Tabela 4.** Teste de qui-quadrado para número de folhas em função da temperatura nas plantas de inhame da Costa cultivadas *in vitro* (*Dioscorea rotundata* Poir.).

| Temperatura (°C)                | Frequência           |
|---------------------------------|----------------------|
| 27                              | 1273                 |
| 30                              | 1132                 |
| Qui-quadrado ( $\chi^2$ ): 8,27 | Probabilidade: 0,004 |

Aos 90 dias de cultivo *in vitro* foi observado um maior número de folhas nas plantas de inhame micropropagadas (Tabela 5). Matos et al. (2011) ao estudarem intensidade de luz para produção de mudas de pinhão manso constataram que o número de folhas, foi em média, 33% maior em 100% de intensidade de luz quando comparado a média dos tratamentos 50% e 25% de intensidade de luz.

**Tabela 5.** Teste de qui-quadrado para número de folhas em função dos períodos de avaliação nas plantas de inhame da Costa cultivadas *in vitro* (*Dioscorea rotundata* Poir.).

| Períodos de avaliação (dias)      | Frequência           |
|-----------------------------------|----------------------|
| 30                                | 508                  |
| 60                                | 801                  |
| 90                                | 1096                 |
| Qui-quadrado ( $\chi^2$ ): 215,64 | Probabilidade: 0,000 |

Para Ventura (2007), o número de folhas por planta em orquídeas do grupo *Catteleya* decresceu linearmente no ambiente com intensidade de luz de 50%. Isto corresponde com a resposta fisiológica das plantas, as quais, quando expostas às menores intensidades de luz, diminuem o número de folhas. Resultados contraditórios foram observados por Fonseca et al. (2002), em mudas de *Trema micrantha* (L.) Blume onde a permanência das plantas sob sombreamento de 48% de intensidade de luz afetou significativamente o número de folhas das mudas apenas na avaliação realizada aos 120 dias.

Carvalho e Rocha (1999) afirmaram que, em ambientes com níveis elevados de sombreamento, as plantas tendem a emitir maior número de folhas, a fim de garantir uma maior área exposta à luz, garantindo, assim, suas funções metabólicas, principalmente a fotossíntese. No entanto, nos resultados

encontrados nesse trabalho, observou-se que as plantas de inhame emitiram um maior número de folhas sob 100% da intensidade de luz.

Acredita-se que esta discordância, entre os resultados encontrados neste trabalho e a literatura, seja em função da espécie estudada e do manejo experimental. Deve-se considerar que cada espécie apresenta o seu nível ótimo de sombreamento adequado ao próprio desenvolvimento.

Com relação ao número de raízes, pode-se ressaltar que as plantas de inhame cultivadas com 100% da intensidade de luz na temperatura de 27°C apresentaram o maior número de raízes. Já a intensidade luminosa de 100% na temperatura de 30°C, não contribuiu de forma positiva para o aumento no número de raízes (Tabela 6). Esses resultados discordam de Radmann et al. (2001) onde observaram no estudo com *Gypsophila paniculata* que as diferentes intensidades de luz utilizadas, durante a fase de multiplicação, não afetaram o enraizamento. Resultados similares foram obtidos por Dignart (2006) que, fornecendo diferentes intensidades de luz em brotos de orquídeas, perceberam que os tratamentos de luz não influenciaram nem o número de raízes por plântulas, nem o seu comprimento.

**Tabela 6.** Teste de qui-quadrado, frequência observada (fo), frequência esperada (fe) e contribuição para o valor de qui-quadrado (cq) do número de raízes em função das intensidades de luz e da temperatura nas plantas de inhame da Costa cultivadas *in vitro* (*Dioscorea rotundata* Poir.).

| Intensidades de luz             | Temperatura        |                     |
|---------------------------------|--------------------|---------------------|
|                                 | 27°C               | 30°C                |
| 30%                             | 58 <sup>1</sup>    | 48                  |
|                                 | 67,20 <sup>2</sup> | 38,80               |
|                                 | 1,26 <sup>3</sup>  | 2,18                |
| 50%                             | 81                 | 46                  |
|                                 | 80,51              | 46,49               |
|                                 | 0,00               | 0,00                |
| 70%                             | 121                | 81                  |
|                                 | 128,06             | 73,94               |
|                                 | 0,39               | 0,67                |
| 100%                            | 147                | 60                  |
|                                 | 131,23             | 75,77               |
|                                 | 1,90               | 3,28                |
| Qui-quadrado ( $\chi^2$ ): 9,69 |                    | Probabilidade: 0,02 |

<sup>1</sup>FO: frequência observada; <sup>2</sup>FE: frequência esperada; <sup>3</sup>CQ: qui-quadrado (CQ).

Para o número de raízes, a temperatura de 27°C aos 90 dias do cultivo *in vitro* apresentou um desenvolvimento favorável para essa variável. Porém, quando as plantas foram cultivadas na temperatura de 30°C e avaliadas com 90 dias do cultivo *in vitro*, as raízes não continuaram apresentando um desenvolvimento satisfatório (Tabela 7).

Ventura (2007) observou que as irradiâncias compreendidas entre 50  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  com intensidade de luz de 30%, e 100  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e intensidade de 50% proporcionaram maior percentagem de plantas com bom desenvolvimento, com maiores quantidades e vigor de folhas e raízes. Estes resultados estão de acordo com Antonopoulou et al. (2004) que, ao estudarem o enraizamento *in vitro* de explantes de pêsego mantidos no escuro durante a fase de enraizamento, formaram o menor número de raízes (2,6). Depois de 7-10 dias, as folhas das plantas ficaram com pontas amarelas e começaram a morrer. Os autores observaram também que a maior média do número de raízes foi obtida com 100% de intensidade de luz na sala de crescimento.

O enraizamento *in vitro* depende de uma série de fatores. Para alguns casos, a intensidade de luz aumenta a taxa de enraizamento em outros, não afeta e, em algumas espécies, faz-se necessário manter os brotos por certo tempo no escuro, para que haja indução de raízes. Por isso, o genótipo é um fator primordial a ser considerado no processo de enraizamento *in vitro*. Plantas de inhame são, por sua própria constituição, de fácil enraizamento, não necessitando de uma fase específica de enraizamento na micropropagação, como ocorre para a maioria das espécies cultivadas por meio desta técnica. Por sua constituição genética particular, pode-se afirmar que o ambiente luminoso de cultivo não afeta o enraizamento *in vitro* de inhame de forma substancial, não se constituindo um entrave em aplicações de cultivo em luz natural.

**Tabela 7.** Teste de qui-quadrado, frequência observada (fo), frequência esperada (fe) e contribuição para o valor de qui-quadrado (cq) do número de raízes em função da temperatura e dos períodos de avaliação nas plantas de inhame da Costa cultivadas *in vitro* (*Dioscorea rotundata* Poir.).

| Temperatura                     | Períodos de avaliação (dias) |       |                     |
|---------------------------------|------------------------------|-------|---------------------|
|                                 | 30                           | 60    | 90                  |
| 27 °C                           | 41 <sup>1</sup>              | 128   | 238                 |
|                                 | 48,18 <sup>2</sup>           | 134,4 | 224,42              |
|                                 | 1,07 <sup>3</sup>            | 0,30  | 0,82                |
| 30°C                            | 35                           | 84    | 116                 |
|                                 | 27,82                        | 77,60 | 129,58              |
|                                 | 1,86                         | 0,53  | 1,42                |
| Qui-quadrado ( $\chi^2$ ): 6,00 |                              |       | Probabilidade: 0,04 |

<sup>1</sup>FO: frequência observada; <sup>2</sup>FE: frequência esperada; <sup>3</sup>CQ: qui-quadrado (CQ).

O número de brotos formados não apresentou diferença estatística pelo teste do qui-quadrado entre a intensidade de luz testada nem para temperatura, sendo que o maior número de brotos formados ocorreu aos 90 dias de cultivo *in vitro* (Tabela 8). Já para Dignart et al. (2009), ao estudarem diferentes fatores de luz no cultivo de orquídeas, perceberam que o número de brotos foi maior para plantas mantidas em sala de crescimento e em casa de vegetação sem sombrite. Kodyn e Zapata-Arias (1998) afirmaram que, além dos reguladores de crescimento, a luz também influencia consideravelmente a taxa de multiplicação e o crescimento de explantes cultivados *in vitro*. Esses autores observaram que o número de brotos por explante de bananeira foi maior em casa de vegetação, sob luz natural, e em sala de crescimento, também recebendo luz natural através de uma janela, do que sob o cultivo convencional com iluminação artificial.

**Tabela 8.** Teste de qui-quadrado para número de brotos em função dos períodos de avaliação nas plantas de inhame da Costa cultivadas *in vitro* (*Dioscorea rotundata* Poir.).

| Períodos de avaliação (dias)     | Frequência |
|----------------------------------|------------|
| 30                               | 169        |
| 60                               | 214        |
| 90                               | 255        |
| Qui-quadrado ( $\chi^2$ ): 17,40 |            |
| Probabilidade: 0,000             |            |

De maneira geral uma provável explicação para a elevação nas taxas de multiplicação em luz natural seria que a intensidade de luz elevada poderia estar reduzindo as concentrações de auxinas endógenas das gemas por meio de fotooxidação, provocando um deslocamento do balanço hormonal em direção às citocininas (RADMANN et al., 2001). Esses resultados contrastam com Agra et al. (2009) onde encontram as menores percentagens de brotações em um estudo com violeta africana em sala com luz natural, incidente através de janelas de vidro e temperatura ambiente e em telado com 50% de intensidade de luz.

Radman et al. (2001) constataram maior número de brotos de *Gypsophila paniculata* L. no tratamento com menor intensidades de luz e explicaram que o maior crescimento dos brotos pode ser resultado do processo de estiolamento induzido pela intensidades de luz deficiente nas salas de crescimento, ocasionando maior crescimento dos entrenós com caules mais finos. Os autores explicaram que, apesar de ter sido observado maior comprimento de brotos, esses apresentaram-se mais finos e flexíveis (estiolamento) que àqueles oriundos de maiores intensidades de luz.

No cultivo de melão *in vitro*, em diferentes ambientes com distintas intensidades de luz, observaram-se que as plântulas cultivadas em casa de vegetação produziram brotos menores que as cultivadas em salas de crescimento, porém, sua qualidade era superior (ADELBERG et al., 1999).

De acordo com os resultados da Tabela 9 e Figura 4 pode-se observar que com 100% da intensidade de luz na temperatura de 27 °C foi onde se obteve respostas mais favoráveis para o número de nós para as plantas cultivadas *in vitro*. Quando as plantas foram cultivadas com 30% da intensidade de luz na temperatura de 30 °C, não houve resposta positiva para o número de nós (Tabela 9).

Ao comparar a frequência do número de nós em função dos períodos de avaliação foram encontrados os maiores valores aos 90 dias do cultivo *in vitro* (Tabela 10).



**Figura 4.** Plantas de inhame com 90 dias do cultivo *in vitro* com 100 % da intensidade de luz na temperatura de 27 ° C.

**Tabela 9.** Teste de qui-quadrado, frequência observada (fo), frequência esperada (fe) e contribuição para o valor de qui-quadrado (cq) do número de nós em função das intensidades de luz e da temperatura no ambiente de cultivo de plantas de inhame da Costa (*Dioscorea rotundata* Poir.).

| Intensidades de luz             | Temperatura         |                     |
|---------------------------------|---------------------|---------------------|
|                                 | 27°C                | 30°C                |
| 30%                             | 138 <sup>1</sup>    | 97                  |
|                                 | 124,21 <sup>2</sup> | 110,79              |
|                                 | 1,53 <sup>3</sup>   | 1,72                |
| 50%                             | 120                 | 128                 |
|                                 | 131,09              | 116,91              |
|                                 | 0,94                | 1,05                |
| 70%                             | 127                 | 137                 |
|                                 | 139,54              | 124,46              |
|                                 | 1,13                | 1,26                |
| 100%                            | 170                 | 133                 |
|                                 | 160,16              | 142,84              |
|                                 | 0,60                | 0,68                |
| Qui-quadrado ( $\chi^2$ ): 8,90 |                     | Probabilidade: 0,03 |

<sup>1</sup>FO: frequência observada; <sup>2</sup>FE: frequência esperada; <sup>3</sup>CQ: qui-quadrado (CQ).

**Tabela 10.** Teste de qui-quadrado para número de nós em função dos períodos de avaliação nas plantas de inhame da Costa cultivadas *in vitro* (*Dioscorea rotundata* Poir.).

| Períodos de avaliação (dias)     | Frequência           |
|----------------------------------|----------------------|
| 30                               | 256                  |
| 60                               | 349                  |
| 90                               | 455                  |
| Qui-quadrado ( $\chi^2$ ): 51,03 | Probabilidade: 0,000 |

Na temperatura de 27°C foi observada a maior frequência de gemas/nó quando comparada a temperatura de 30°C para as plantas de inhame micropropagadas *in vitro* (Tabela 11). O maior número de gemas/nó foi observado aos 90 dias de cultivo (Tabela 12).

**Tabela 11.** Teste de qui-quadrado para número de gemas/nó em função da temperatura nas plantas de inhame da Costa cultivadas *in vitro* (*Dioscorea rotundata* Poir.).

| Temperatura (°C)                | Frequência          |
|---------------------------------|---------------------|
| 27                              | 288                 |
| 30                              | 244                 |
| Qui-quadrado ( $\chi^2$ ): 3,64 | Probabilidade: 0,05 |

**Tabela 12.** Teste de qui-quadrado para número de gemas/nós em função dos períodos de avaliação nas plantas de inhame da Costa cultivadas *in vitro* (*Dioscorea rotundata* Poir.).

| Períodos de avaliação (dias)     | Frequência           |
|----------------------------------|----------------------|
| 30                               | 145                  |
| 60                               | 180                  |
| 90                               | 207                  |
| Qui-quadrado ( $\chi^2$ ): 10,90 | Probabilidade: 0,004 |

Não houve diferença significativa para a variável percentagem de contaminação nas diferentes intensidades de luz e nem para as temperaturas avaliadas, porém à medida que o período de avaliação foi aumentando a percentagem de contaminação também aumentou, embora os desenvolvimentos das plantas não tenham sido afetados (Tabela 13).

**Tabela 13.** Teste de qui-quadrado para percentagem de contaminação em função dos períodos de avaliação nas plantas de inhame da Costa cultivadas *in vitro* (*Dioscorea rotundata* Poir.).

| Períodos de avaliação (dias)     | Percentagem (%)      |
|----------------------------------|----------------------|
| 30                               | 10,78                |
| 60                               | 32,35                |
| 90                               | 56,86                |
| Qui-quadrado ( $\chi^2$ ): 32,53 | Probabilidade: 0,000 |

Ao comparar as intensidades de luz em função da percentagem de oxidação foi possível observar que quando foram utilizadas intensidades de luz de 30 e 50% ocorreram uma maior percentagem de plantas oxidadas (Tabela 14).

Embora a temperatura de 27°C tenha sido mais favorável para o desenvolvimento das plantas *in vitro*, também foi nessa temperatura onde foi encontrada a maior percentagem de plantas oxidadas (Tabela 15).

Ao final do experimento foi possível observar que a percentagem de plantas sobreviventes para a maioria dos experimentos foi de 100% com exceção para os tratamentos T7 e T8 que apresentaram uma percentagem de plantas sobreviventes de 90%.

Segundo Dutra et al. (2012) a redução da incidência de luz sobre as mudas de copaíba foi responsável por uma maior percentagem de sobrevivência das mesmas quando comparadas ao tratamento a pleno sol (0% de sombreamento), pois as mudas necessitaram de sombra em sua fase inicial de desenvolvimento, sendo o nível de 50% de intensidade de luminosidade uma alternativa viável para produção de suas mudas.

Embora a luz seja um importante fator na micropropagação, pesquisas sobre o efeito de intensidade de luz natural no crescimento das plantas são escassos. A intensidade e a duração da luz em quantidades satisfatórias podem fornecer melhores resultados. Neste contexto, consideram-se importantes os resultados obtidos por meio deste estudo, já que as plantas testadas responderam relativamente bem aos tratamentos com 100% de intensidade de luminosidade.



**Tabela 14.** Teste de qui-quadrado para percentagem de oxidação em função da intensidade de luminosidade nas plantas de inhame da Costa cultivadas *in vitro* (*Dioscorea rotundata* Poir.).

| Intensidades de luz (%)          | Percentagem de oxidação (%) |
|----------------------------------|-----------------------------|
| 30                               | 30,66                       |
| 50                               | 44,53                       |
| 70                               | 12,41                       |
| 100                              | 12,41                       |
| Qui-quadrado ( $\chi^2$ ): 40,02 | Probabilidade: 0,000        |

**Tabela 15.** Teste de qui-quadrado para percentagem de oxidação em função da temperatura nas plantas de inhame da Costa cultivadas *in vitro* (*Dioscorea rotundata* Poir.).

| Temperatura (°C)                 | Percentagem de oxidação (%) |
|----------------------------------|-----------------------------|
| 27                               | 80,29                       |
| 30                               | 19,71                       |
| Qui-quadrado ( $\chi^2$ ): 50,28 | Probabilidade: 0,000        |

## CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nesse estudo demonstram ser viável a técnica do cultivo *in vitro* de plantas de inhame da Costa (*Dioscorea rotundata* Poir.), sob diferentes condições de intensidade de luz, por um período de 90 dias de cultivo em meio de cultura MS com modificações, com 100% da intensidade de luminosidade na temperatura de 27°C.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADELBERG, J.; FUJIWARA, K.; KIRDMANEE, C.; KOZAI, T. Photoautotrophic shoot and root development for triploid melon. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.57, n.2, p.95-104, 1999.

AGRA, P. F. M.; SANTOS, M. S.; BARROS, H. M. M.; COSTA, C. M. G. R.; COSTA, N. P.; PERAZZO-NETO, A. Influência de ambientes e concentrações de sacarose na micropropagação de violeta africana em diferentes tempos de cultivo. **Tecnologia e Ciência Agropecuária**, João Pessoa, v.3, n.3, p.73-76, 2009.

ALTMAN, A. Plant biotechnology in the 21<sup>st</sup> century: the challenges ahead. **Electronic Journal of Biotechnology**, Valparaiso , v.2 , n.2, p.51-55, 1999.

ANTONOPOULOU, C.; DIMASSI, K.; THERIOS, I.; CHATZISSAVVIDIS, C. The influence of radiation quality on the *in vitro* rooting and nutrient concentrations of peach rootstock. **Biologia plantarum**, Prague, v. 48, n.4, p.549-553, 2004.

ATROCH, E. M. A. C.; SOARES, A. M.; ALVARENGA, A. A.; CASTRO, E. M. Crescimento, teor de clorofilas, distribuicao de biomassa e características anatômicas de plantas jovens de *Bauhinia forticata* Link submetidas a diferentes condições de sombreamento. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.25, p.853-862, 2001.

ARAUJO, A. G.; PASQUAL, M.; CASTRO, E. M.; RODRIGUES, F. A.; SANTOS, D. N.; DUTRA, L. F. Efeito da concentração de sacarose e qualidade de luz na propagação *in vitro* de plântulas de orquídea. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, Lavras, v.3, n.2, p.96-102, 2007.

CARVALHO, L.C.; ROCHA, C.F.D. Forma da bromélia depende da luz. **Ciência Hoje**, Rio de Janeiro, v 26, n.155, p.72-74, 1999.

CHU, E. P.; FIGUEIREDO, R. C. L. Native and exotic species of *Dioscorea* used as food in Brazil. **Economic Botany**, Lawrence, v.45, p.467- 479,1991.

COSTA, F. H. S.; PASQUAL, M.; ROCHA, H. S.; PEREIRA, J. E. S.; CASTRO, E. M.; MIYATA, L. Y. Crescimento e anatomia foliar de bananeiras submetidas a diferentes condições de cultivo *in vitro*. **Bragantia**, Campinas, v.68, n.2, p.303-311, 2009.

DIGNART, S. L. **Luz e sacarose na micropropagação de *Cattleya walkeriana*: alterações anatômicas e fisiológicas.** Lavras, 2006. 132 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, 2006.

DIGNART, S. L.; CASTRO, E. M.; PASQUAL, M.; FERRONATO, A.; BRAGAS, F. T.; PAIVA, R. Luz natural e concentrações de sacarose no cultivo *in vitro* de *Cattleya walkeriana*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.33, n.3, p.780-787, 2009.

DUTRA, T. R.; GRAZZIOTTI, P. H.; SANTANA, R. C.; MASSAD, M. D. Desenvolvimento inicial de mudas de copaíba sob diferentes níveis de sombreamento e substratos. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v.43, n.2, p.321-329, 2012.

ERGI, A. C.; SCHUCH, M. W. Tipo de luz na multiplicação *in vitro* de framboeseira (*Rubus idaeus* L.) 'Batum'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 27, n. 3, p. 448-490, 2005.

FELFILI, J. M. Diameter and heigth distributions in agalery forest tree community and some of its main speciesin Central Brasil over a six year period (1985-1991). **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v.20, p.155-162, 1997.

FERREIRA, D. F. Programa computacional Sisvar - UFLA, versão 5.3, 2010.

FONSECA, E. P.; VALERI, S. V.; MIGLIORANZA, E.; FONSECA, N. A. N.; COUTO, L. Padrão de qualidade de mudas de *Trema micrantha* (L.) Blume, produzidas sob diferentes períodos de sombreamento. **Revista Árvore**, Viçosa, v.26, n.4, p.515-523, 2002.

GARRIDO, M. S.; JESUS, O. N.; SOARES, A. C. F. Comparação da qualidade e produtividade de túberas de inhame (*Dioscorea cayennensis* Lam.) em três áreas de plantio no Município de Maragogipe BA. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA, 43, 2003, Recife, **Resumos...** Recife: S.B.O., 2003. CD-ROM.

KODYM, A.; ZAPATA-ARIAS, F.J. Natural light as an alternative light source for the *in vitro* culture of banana (*Musa acuminata* cv. 'Grande Naine'). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, The Hague, v.55, p.141-145, 1998.

KODYN, A.; ZAPATA-ARIAS, F. J. Natural light as an alternative light source for the in vitro culture of banana (*Musa acuminata* cv. 'Grand Naine1). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, The Hague, v. 55, p. 141-145, 1999.

KOZAI, T; KUBOTA, C. Developing a photoautotrophic micropropagation system for woody plants. **Journal of Plant Research**, Tokyo, v.114, p.525-537, 2001.

LARCHER, W. Ecofisiologia vegetal. São Carlos: Rima Artes e Textos, 2000. 531p.

MATOS, F. S.; MOREIRA, C. V.; MISSIO, R. F.; DIAS, L. A. S. Caracterização fisiologica de mudas de *Jatropha curcas* L. produzidas em diferentes níveis de irradiância. **Revista Colombiana de Ciências Hortícolas**, Bogotá, v.3, n.1, p.126-134, 2009.

MATOS, F. S.; GAMBOA, I.; RIBEIRO, R. P.; MAYER, M. L.; NEVES, T. G.; LEONARDO, B. R. L.; SOUZA, A. C. Influência da intensidade de luminosidade no desenvolvimento de mudas de *Jatropha curcas* L. **Revista Agrarian**, Dourados, v.4, n.14, p.265-272, 2011.

MORAES NETO, S. P.; GONÇALVES, J. L. M.; TAKAKI, M.; CENCI, S.; GONÇALVES, J. C. Crescimento de mudas de algumas espécies arbóreas que ocorrem na mata atlântica, em função do nível de luminosidade. **Revista Árvore**, Viçosa, v.24, n.1, p.35-45, 2000.

MURASHIGE T, SKOOG F. A. A revised medium for a rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15,p. 473-479, 1962.

PASQUAL, M.; SOARES, J. D. R.; RODRIGUES, F. A.; ARAUJO, A. G.; SANTOS, R. R. Influência da qualidade de luz e silício no crescimento *in vitro* de orquídeas nativas e híbridas. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.29, p.324-329, 2011.

RADMANN, E. B.; BRAGA, E. J. B.; KARAN, M. A. L.; POSADA, M. A. C.; PETERS, J. A. Influência da densidade de fluxo luminoso na qualidade de plantas micropropagadas de *Gypsophila paniculata* L. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.7, n.3, p.171-175, 2001.

REGÔ, G. M.; POSSAMAI, E. Efeito do sombreamento sobre o teor de clorofila e crescimento inicial do jequitibá-rosa. **Boletim de pesquisa Florestal**, Colombo, n.53, p.179-194, 2006.

SANTOS, E. S. dos. **Inhame (*Dioscorea* spp): aspectos básicos da cultura**. João Pessoa: EMEPA-PB, SEBRAE, 1996. 158p.

SAS INSTITUTE. **SAS user's guide**: statistic: version 9.1.3. Cary: SAS Institute, 2004. 846 p.

VENTURA, G. M. **Cultivo *in vitro* de orquídeas do grupo *Cattleya*, em diferentes meios de cultura e irradiâncias**. Viçosa, 2007. 122p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, 2007.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A cultura do inhame tem um importante papel no Brasil, tanto como fonte de energia para alimentação humana, quanto como fonte geradora de emprego e renda, notadamente nas áreas pobres da Região Nordeste. Entretanto, apesar de sua importância, o inhame apresenta algumas limitações, tais como manejo inadequado da cultura e o uso de túberas semente de baixa qualidade fitossanitária. O desenvolvimento de novas tecnologias em complementação às atualmente disponíveis contribuirá para a melhoria da produtividade e da qualidade do inhame, possibilitando assim, a oferta de um produto de qualidade que atenda as exigências dos mercados consumidores, o que poderá incrementar de forma significativa as exportações e a geração de emprego e de renda.

Como alternativa para tornar o inhame mais competitivo, é de fundamental importância o uso de técnicas biotecnológicas na produção material propagativo. Dentre estas técnicas pode-se destacar a micropropagação, pois permite superar o problema da baixa taxa de multiplicação, uma vez que proporciona um número elevado de plantas num curto espaço de tempo, produzindo material propagativo sadio, prevenindo a disseminação de pragas e doenças de uma geração para outra, além de permitir o rápido acesso dos agricultores às variedades selecionadas.

No presente trabalho, buscou-se avaliar e adequar as condições do meio de cultura para o desenvolvimento de um protocolo eficiente para micropropagação do inhame *Dioscorea rotundata* (Poir.).

O Primeiro Capítulo abordou os efeitos do cultivo *in vitro* do inhame em diferentes concentrações de sais e vitaminas do meio de cultura MS em diferentes concentrações de ágar. Os resultados mostraram que o meio MS na concentração de 1/3 de seus sais e vitaminas com 7 g L<sup>-1</sup> de ágar foram mais eficientes para o desenvolvimento das plantas *in vitro*.

No segundo capítulo foi abordado o desenvolvimento *in vitro* do inhame nos meios MS e MS com modificações em diferentes concentrações de BAP. E nele os resultados mostram que o meio MS com modificações + 0,05 mg L<sup>-1</sup> de BAP propiciou o melhor desenvolvimento, destacando que é necessário fazer a utilização da concentração ideal para não prejudicar o desenvolvimento das plantas.

A abordagem feita no Capítulo 3 buscou avaliar o efeito de diferentes intensidades de luz na micropropagação do Inhame da Costa. Nas condições estabelecidas, as plantas de inhame quando cultivadas com 100% da intensidade de luz na temperatura de 27°C foi o que respondeu de forma mais eficiente ao cultivo *in vitro*.

Finalmente, os resultados obtidos nos trabalhos realizados mostram que é possível fazer o cultivo *in vitro* do inhame, ainda que estudos complementares sejam necessários para resultados mais eficientes a partir de uma melhor adequação das condições de cultivo, principalmente, no aspecto de rapidez de obtenção de mudas.