

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

**SACAROSE, TEMPERATURA E LUMINOSIDADE NO
CULTIVO *IN VITRO* DO INHAME**

LAECIO FERNANDES SOUZA SAMPAIO

**CRUZ DAS ALMAS - BAHIA
JUNHO - 2017**

SACAROSE, TEMPERATURA E LUMINOSIDADE NO CULTIVO *IN VITRO* DO INHAME

LAECIO FERNANDES SOUZA SAMPAIO

Engenheiro Agrônomo

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2015

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

Orientador: Prof. Dr. Sebastião de Oliveira e Silva

Coorientador: MSc. Honorato Pereira da Silva Neto

Coorientadora: Profa. Dra. Mariane de Jesus da Silva de Carvalho

CRUZ DAS ALMAS - BAHIA

JUNHO - 2017

FICHA CATALOGRÁFICA

S192s	<p>Sampaio, Laecio Fernandes Souza. Sacarose, temperatura e luminosidade no cultivo <i>in vitro</i> do inhame / Laecio Fernandes Souza Sampaio. _ Cruz das Almas, BA, 2017. 65f.; il.</p> <p>Orientador: Sebastião de Oliveira e Silva. Coorientador: Honorato Pereira da Silva Neto.</p> <p>Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas.</p> <p>1.Inhame – Cultivo in vitro. 2.Inhame – Micropropagação. 3.Aclimatização – Avaliação. I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II.Carvalho, Mariane de Jesus da Silva de. III.Título.</p> <p>CDD: 635.23</p>
-------	--

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

SACAROSE, TEMPERATURA E LUMINOSIDADE NO CULTIVO *IN VITRO* DO INHAME

**COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE LAECIO
FERNANDES SOUZA SAMPAIO**

Realizada em 30 de Junho de 2017

Prof. Dr. Sebastião de Oliveira e Silva
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia – UFRB
Examinador Interno (Orientador)

Profa. Dra. Maria Angélica Pereira de Carvalho Costa
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - UFRB
Examinador Interno

Profa. Dra. Daniela Garcia Silveira
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Baiano – IFBA
Examinador Externo

*Dedico esta dissertação aos meus pais
Laecio Machado Sampaio e Gilmaria
Fernandes Souza Sampaio por todo amor,
dedicação e sacrifício para que eu pudesse
alcançar esse sonho. Vocês são tudo para
mim!*

AGRADECIMENTOS

A Deus, Nossa Senhora e a Santo Antônio, por ter me dado força e coragem para executar o desafio que foi proposto e vencer todos os obstáculos da minha vida.

Aos meus pais, Laécio e Gilmaria, pela vida, amor, dedicação e por sempre me incentivarem e torcerem pela minha vitória.

À minha namorada Ingrid e sua família, pelo apoio, admiração e por todos os momentos de alegria.

Aos meus irmãos, Lucas e Giovanna, pelo amor e carinho.

À minha família, pelo apoio e por torcer pelo meu sucesso.

Aos meus grandes amigos, pombos e domesticados, Bruno, Carlos, Gabriel, João Guilherme, Devison, Vinicius, Fábio, Lourival, André, Luti, Felipe e Pedro, pela constante motivação, ajuda e amizade, sempre me incentivando e torcendo por mim.

Ao meu orientador Dr. Sebastião, por compartilhar seus conhecimentos, pela dedicação, amizade e, principalmente, pelos desafios propostos que me fizeram amadurecer e me tornar um profissional cada vez mais capacitado.

Ao Dr. Antônio Souza, pelos ensinamentos, pela atenção, dedicação, paciência, amizade e por toda ajuda para me fazer superar os obstáculos que surgiram durante os experimentos.

Aos meus co-orientadores, MSc. Honorato e Dra. Marianne, pela amizade, ensinamentos, incentivo, sugestões e orientações.

Aos pesquisadores, estagiários e funcionários do Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Mandioca e Fruticultura, em especial aos amigos Meire, Maria Inês, Viviane, Karen, Murilo, Jackson, Tânia e Jessica, pela amizade e contribuição no desenvolvimento do trabalho.

À Embrapa Mandioca e Fruticultura, pela oportunidade desde o período de graduação, por disponibilizar toda estrutura física e apoio financeiro, imprescindíveis para o desenvolvimento dos trabalhos.

À CAPES, pelo auxílio financeiro à bolsa de estudos.

À UFRB, pela minha formação como Eng. Agrônomo.

Ao BNB pelo suporte financeiro da pesquisa.

A todos com os quais convivi e tive oportunidade de conhecer durante o mestrado e que de alguma forma contribuíram para a elaboração desta dissertação e minha formação profissional.

Muito obrigado!

SUMÁRIO

Página

RESUMO

ABSTRACT

REFERÊNCIAL TEÓRICO.....1

ARTIGO 1

SACAROSE E TEMPERATURA NO CULTIVO *IN VITRO* DE
INHAME.....22

ARTIGO 2

LUZ NATURAL NO CULTIVO *IN VITRO* E ACLIMATIZAÇÃO DE 'Inhame da
Costa'.....39

CONSIDERAÇÕES FINAIS.....51

ANEXOS.....53

SACAROSE, TEMPERATURA E LUMINOSIDADE NO CULTIVO *IN VITRO* DO INHAME

Autor: Laécio Fernandes Souza Sampaio

Orientador: Sebastião de Oliveira e Silva

RESUMO: Fatores como a concentração de sacarose, temperatura do ambiente de cultivo e luminosidade são importantes para o desenvolvimento e crescimento das plantas *in vitro*. Nesse sentido, o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito da sacarose, temperatura e luz natural na micropropagação de 'Inhame da Costa'. Foram realizados dois experimentos, sendo o primeiro com microestacas de plantas de 'Inhame da Costa' inoculadas em frascos com meio de cultura MS suplementado com 0; 15; 30; 45 e 60 g L⁻¹ de sacarose e mantidas sob quatro regimes de temperatura do ambiente (22; 25; 28 e 31 °C), com as demais condições controladas, densidade de fluxo de fótons de 16 μmol m⁻² s⁻¹ e foto período de 16 horas em BOD. No segundo experimento, microestacas de 'Inhame da Costa', inoculadas em frascos de vidro contendo o meio de cultura MS suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, solidificado com 8 g L⁻¹ de ágar e mantidas em diferentes ambientes de cultivo (sala de conservação, sala de crescimento, casa de vegetação, telado e estufa) por 90 dias. Após esse período, metade das plantas foram avaliadas e a outra metade foi transplantada para copos descartáveis de plástico transparente de 300 mL contendo o substrato comercial Maxfertil para serem aclimatizadas em casa de vegetação, onde permaneceram por 60 dias até serem avaliadas. As plantas de 'Inhame da Costa' quando cultivadas em meio MS suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose na temperatura de 22 °C apresentaram melhor desenvolvimento. As plantas de 'Inhame da Costa' apresentaram melhor crescimento e desenvolvimento *in vitro* e *ex vitro* quando cultivadas sob luz natural, principalmente nas condições de telado utilizadas neste trabalho.

Palavras chave: *Dioscorea rotundata*, cultura de tecidos, micropropagação, luz natural, aclimatização.

SACAROSE, TEMPERATURE AND LUMINOSITY IN YAM *IN VITRO* CULTURE

Author: Laecio Fernandes Souza Sampaio
Advisor: Sebastião de Oliveira e Silva

ABSTRACT: Factors such as sucrose concentration, temperature and luminosity of the growth environment are important for *in vitro* plant development and growth. In this sense, the objective of this work was to evaluate sucrose, temperature and natural light effect on the 'Inhame da Costa' micropropagation. Two experiments were carried out, the first with micro-plants of 'Inhame da Costa' inoculated in flasks with MS culture medium and supplemented with 0; 15; 30; 45 and 60 g L⁻¹ of sucrose and kept under four ambient temperature regimes (22; 25, 28 and 31 ° C), with the other conditions controlled, photon flux density of 16 μmol m⁻² s⁻¹ and photo period of 16 hours in BOD. In the second experiment, 'Inhame da Costa' micro-plants inoculated in glass flasks containing the MS culture medium supplemented with 30 g L⁻¹ of sucrose, solidified with 8 g L⁻¹ of agar and kept in different culture environments (conservation room, growth room, plant house, weaver and greenhouse) for 90 days. After this period, half of the plants were evaluated and the other half was transplanted into 300 mL clear plastic disposable cups containing commercial Maxfertil substrate to be acclimatized in a greenhouse, where they remained for 60 days until evaluated. The 'Inhame da Costa' plants when grown in MS medium supplemented with 30 g L⁻¹ sucrose at a temperature of 22 ° C showed better development. The 'Inhame da Costa' plants presented better *in vitro* and *ex vitro* growth and development when cultivated under natural light, mainly in the soil conditions used in this work.

Key words: *Dioscorea rotundata*, tissue culture, micro propagation, natural light, acclimatization.

REFERÊNCIAL TEÓRICO

1. A cultura do inhame

1.1. Origem e aspectos botânicos

A planta conhecida vulgarmente como inhame faz parte de um grupo de plantas tuberosas, pertencentes ao gênero *Dioscorea*. Esse gênero é o maior e mais importante da família *Dioscoreaceae*, que apresenta cerca de 600 espécies, embora talvez ainda existam algumas que ainda não foram catalogadas (SILVA et al., 2012). De acordo com Santos (1996), a maior parte das espécies de inhame que são cultivadas originaram-se no Sudeste da Ásia, Oeste da África e América Tropical. Essas regiões são consideradas centros de diversidade e domesticação da cultura (ASIEDU et al., 1997), de onde houve grande dispersão entre os continentes, sendo a cultura encontrada em regiões tropicais, subtropicais e temperadas (MONTALDO, 1991). O gênero *Dioscorea* teve uma dispersão mundial ampla no final do período Cretáceo e mais tarde durante o Mioceno, tendo evoluído em diferentes direções no Novo e Velho Mundo, originando assim espécies distintas (COURSEY, 1976).

Quanto aos aspectos botânicos, o inhame de modo geral é uma planta monocotiledônea, trepadeira, de porte herbáceo, cujo o órgão de reserva é uma estrutura subterrânea, também conhecido como túbera (PEDRALLI, 1998; VEGA, 2012). Grande parte das espécies possuem caule volúvel que podem ou não conter espinhos. As folhas são alternadas ou opostas, com pecíolos longos e talos alados ou de secção transversal ovalada (MONTALDO, 1991). As inflorescências são em racemos ou panículas, com flores pequenas de três sépalas e três pétalas, no entanto, em quase todas as variedades cultivadas, com finalidades alimentícias, as florações são escassas. O fruto é uma cápsula séssil, de forma plana ou circular, apresentando coloração verde no início de seu desenvolvimento e, quando maduro, é marrom.

A depender da espécie pode haver a formação de uma única ou de várias túberas (MATU; CORTÉS, 2000). A túbera e as raízes principais do inhame brotam do rizoma que aparece no início do ciclo da planta e está localizado na base do caule (MONTALDO, 1991). Estas túberas, predominantemente,

apresentam forma cilíndrica e são ricas em carboidratos, principalmente amido (MANDAL, 1993).

A espécie *D. rotundata* é uma planta anual com túberas subterrâneas de coloração marrom e polpa branca. O caule é cilíndrico, volúvel e com espinhos, tendo as folhas opostas, longamente pecioladas e ovaladas de base arredondada. Quanto ao seu sistema reprodutivo, apresenta predominância de alogamia. As plantas são dióicas, com flores pequenas e frutos capsulados. Sua propagação é feita, quase que exclusivamente, por meio das túberas (MONTALDO, 1991).

1.2. Aspectos edafoclimáticos

Adaptada ao clima tropical e subtropical (MONTEIRO; PERESSIN, 2002), a espécie apresenta plantas que se desenvolvem, satisfatoriamente, em clima quente e úmido, sob condição de regime pluvial de 1.000 mm a 1.600 mm anuais, com temperatura ótima diária de 24 °C 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 Central responsáveis por aproximadamente 95% da produção mundial (MESQUITA, 2002; FAOSTAT, 2017).

1.3. Importância socioeconômica

Para Coursey (1976), mais de 60 espécies do gênero *Dioscorea* possuem algum valor econômico. Embora seja elevado o número de espécies desse gênero, apenas 25 são citadas como alimentícias, 15 como medicinais e 6 espécies como ornamentais. No entanto, as informações taxonômicas sobre a família são escassas e a maioria das espécies é pouco estudada, podendo haver mais espécies de relevante valor econômico no gênero, que ainda são desconhecidas (PEDRALLI, 1998; 2002).

O cultivo do inhame possui considerável importância socioeconômica, em especial para os países em desenvolvimento situados nos trópicos, visto que, na maioria das vezes a cultura é realizada por pequenos e médios agricultores, sendo utilizada como fonte de alimento, trabalho e renda na comunidade rural (SANTOS et al., 2007). As túberas de inhame possuem alta qualidade nutritiva e energética, por apresentar na sua composição química, carboidratos, proteínas,

sais minerais (cálcio, ferro e fósforo) e vitaminas (A, C, D e complexo B). O inhame é um alimento de fácil digestão e dispõe de propriedades medicinais que garantem seu uso na farmacologia, principalmente na síntese de cortisona e outros hormônios sexuais (CHU; FIGUEIREDO-RIBEIRO, 1991; MESQUITA, 2002). Além disso, a cultura tem alto potencial para ser usada na fabricação de amido, bem como nas indústrias alimentícias e de cosméticos (SILVA et al. 2012; VEGA, 2012).

Segundo a FAOSTAT (2017), a área produzida com inhame no mundo foi de 6.978.594,97 hectares em 2014, com um aumento de 5,85% em relação a 2011 e uma produção de aproximadamente 68,2 milhões de toneladas para este mesmo ano (2014), com aumento de 8,53% em relação a 2011, o que corresponde a um rendimento de 9,77 t ha⁻¹. Cerca de 96,1% desta produção é proveniente da África, sendo Nigéria, Gana, Costa do Marfim, Benin e Etiópia os países responsáveis por mais de 55.847.139,25 toneladas ano⁻¹. O Brasil ocupa a 14ª posição no ranking mundial de produção de inhame, com uma área cultivada de aproximadamente 23.302 ha e uma produção de 247.000 toneladas em 2014, o que equivale a um rendimento de 10,6 t ha⁻¹ (FAO, 2017), sendo os Estados da Paraíba, Pernambuco, Bahia, Alagoas e Piauí os maiores produtores (SILVA et al., 2012).

No Brasil, as dioscóreas mais importantes economicamente são *D. alata* L., *D. cayenensis* Lam., *D. rotundata* Poir, *D. bulbifera* L. e *D. trifida* L. (PEDRALLI, 1998; VEASEY et al., 2010), sendo que, as mais cultivadas são a *Dioscorea alata* (cultivares Cará, São Tomé, Cará Mandioca e Cará Florida) e *Dioscorea rotundata* (cultivares Cará, Tabica, Cará Negro, Cará da Costa e 'Inhame da Costa') (MESQUITA, 2002). A cultura do inhame vem sendo explorada comercialmente há décadas no Brasil, em especial, na região Nordeste, onde ocorre a maior produção e, a cultura desempenha importante papel socioeconômico e contribuição ao desenvolvimento rural da região (MESQUITA, 2002; SANTOS et al., 2007).

As espécies *D. rotundata* e *D.alata* são reconhecidas como as hortaliças mais cultivadas no Brasil, em sistema de agricultura familiar. Na região Nordeste aproximadamente 90% do inhame produzido é oriundo de pequenos produtores, carentes de informações tecnológicas, fundamentais para elevar o rendimento da cultura e reduzir os custos de produção (OLIVEIRA, 2002).

A produção brasileira é destinada em grande parte ao mercado interno, sendo também exportada, principalmente, para a Europa (MENDES et al., 2003). No Estado da Bahia, os principais municípios produtores de inhame são Maragojipe, Cruz das Almas, São Felipe e São Félix, localizados na região do Recôncavo, com destaque para o município de Maragojipe, atualmente maior produtor de inhame do Estado. Nesse Município, a cultura do 'Inhame da Costa' é responsável por 37% da renda dos pequenos produtores (SILVA et al., 2012).

Apesar da importância que o inhame representa para o Brasil e, essencialmente, para agronegócio nordestino, a cultura apresenta baixa produtividade, resultado do uso de mudas caras, de baixa qualidade e que necessita de mão de obra especializada para ser produzida (SILVA, 2002; SANTOS; MACÊDO, 2002; SANTOS et al., 2007). A baixa fertilidade do solo, o manejo inadequado do solo, da água e da cultura, bem como as irregularidades climáticas são outros fatores que resultam em baixo rendimento da cultura (SANTOS, 1996; OLIVEIRA et al., 2007).

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, o que possibilita maior produção e aumento na exportação para os grandes centros consumidores do Sul do País, ou para o mercado externo.

1.4. Propagação do inhame

A determinação do custo de produção é um importante instrumento na tomada de decisões no meio rural. Na cultura do inhame, quando se avalia os custos de implantação é comprovado que um dos fatores que mais o elevam é a aquisição de túberas sementes, chegando a constituir, em média, de 25 a 50% do custo total de produção (RAJYALAKSHMI; GEERVANI, 1999; SILVA et al., 2012).

A planta de inhame se propaga quase que exclusivamente através de reprodução assexuada, por meio de túberas inteiras ou seccionadas, segmentos de caules e bulbilhos axilares (JANSSENS, 2001; KADOTA; NIIMI, 2004; SANTOS et al., 2007; SILVA et al., 2012). No entanto, a estrutura mais recomendada para o plantio consiste de túberas inteiras com menor tamanho (cerca de 200 g) que

além de não necessitar de seccionamento (o que dificulta a penetração de patógenos causadores de apodrecimento), apresentam a gema apical, que proporciona uma brotação mais rápida. Além disso, podem ser usados seguimentos de túberas com tamanho entre 150 g e 200 g. Contudo, o uso desse tipo de muda deve ser feito com os devidos cuidados, para evitar a transferência de doenças virais, bem como de patógenos do solo de geração em geração (SANTOS, 1996; SILVA et al., 2012).

A técnica mais utilizada pelos agricultores para obtenção das túberas semente é a capação, que se resume na retirada precoce da túbera comercial aos 210 dias após o plantio. Este método consiste em retirar a túbera realizando-se um corte exatamente no ponto de ligamento entre a protuberância (rizoma) e a túbera comestível, mantendo-se as raízes da planta, a qual produzirá novas túberas menores, que podem ser colhidas cerca de 90 dias após a realização da capação (SANTOS, 1996; SANTOS et al., 2007).

Além da técnica tradicional da capação, a obtenção de material para plantio pode ser feita por meio de métodos alternativos como, a técnica de plantio super adensado, de minitúberas e micropropagação (CAZÉ FILHO, 2002; POORNIMA; RAVISHANKAR, 2007; SANTOS et al., 2007; SOUZA et al., 2011; SIMÕES, 2013). Contudo, a introdução dessas novas tecnologias no cultivo do inhame ainda esbarra no tradicionalismo dos produtores.

Nas últimas décadas, vem se verificando acentuada diminuição da área plantada de inhame. Apresentam-se como principais causas a indisponibilidade de material propagativo de qualidade e o elevado custo das túberas semente existentes, desestimulando os produtores rurais a expandirem suas áreas de cultivo (OLIVEIRA et al., 2012).

1.4.1. Micropropagação de *Dioscorea* spp.

No cultivo do inhame, a propagação por túberas semente obtidas por métodos convencionais é um processo lento e não adequado para uma propagação rápida. Além disso, não garantem a produção de mudas com qualidade fisiológica, sanitária e genética. Este fato levou certos países produtores dessa tuberosa a recorrer à utilização de métodos biotecnológicos, em especial a produção de mudas micropropagadas (PEREA, 2001; TAMIRU et al., 2006).

Estudos visando o cultivo *in vitro* de *Dioscorea* spp., tem sido desenvolvidos em todo o mundo, principalmente visando selecionar genótipos livres de doenças e criação de bancos de germoplasma (VEGA, 2012; AGBIDINOUKOUN et al., 2013). No Brasil, embora os resultados de pesquisa sobre micropropagação do inhame ainda estejam no início, já foi provado que é possível desenvolver uma metodologia para produção de mudas de inhame *in vitro* que possibilite obter grande quantidade de plantas, de alta qualidade agrônômica, em qualquer época do ano, com o máximo de aproveitamento do propágulo vegetal e em curto espaço de tempo (SANTOS et al., 2002; SOUZA et al., 2011; SIMÕES, 2013).

A forma de propagação *in vitro* mais utilizada neste cultivo é a partir de segmentos nodais, que se baseia na formação de brotos oriundos de gemas laterais, os quais são subdivididos e subcultivados (AHANHANZO et al., 2010; MAHESH et al., 2010; SOUZA et al., 2011; SIMÕES, 2013).

A micropropagação de plantas do gênero *Dioscorea* spp. pelo cultivo de segmentos nodais tem sido bem-sucedida (BEHERA et al., 2009; SOUZA et al., 2011; SIMÕES, 2013), porém muitos são os fatores que podem afetar o crescimento das plantas *in vitro*, tais como, meio de cultura, reguladores de crescimento, fonte e quantidade de carboidrato, luz, temperatura, entre outros.

O meio de cultura descrito por Murashige e Skoog (1962) é o mais comumente utilizado para propagação *in vitro* de várias espécies de *Dioscorea* (ALIZADEH et al., 1998; HUANG et al., 2009). Entretanto, a otimização e utilização de outros meios de cultura também tem sido estudada (AHANHANZO et al., 2010; BORGES et al., 2011). Nesse sentido, visando otimizar um protocolo de micropropagação para a produção de mudas de inhame (*D. rotundata*), Simões (2013) testou diferentes concentrações do meio MS e do ágar, e observou que a redução da concentração de sais e vitaminas do meio de cultura MS para um terço, com adição de 7 g L⁻¹ de ágar foi mais eficiente para o desenvolvimento das plantas *in vitro* aos 120 dias. Além disso, estudou-se a micropropagação de 'Inhame da Costa' em meio MS, com e sem modificações, sob diferentes concentrações de BAP e relatou-se que o meio de cultura MS com modificações, sem adição ou adicionado 0,05 mg L⁻¹ de BAP, proporcionou melhor desenvolvimento das plantas de inhame com maior número de nós. Apesar dos

resultados obtidos serem promissores, continuam os esforços para o aperfeiçoamento dos protocolos de micropropagação para *Dioscorea* spp.

1.4.2. Efeitos do fator sacarose nos meios de cultura

O crescimento da maioria das plantas *in vitro* é sustentado pela fonte de carboidratos adicionada ao meio de cultura. Sabe-se que os carboidratos atuam como fonte de energia metabólica e fornecem esqueletos carbônicos para a biossíntese de aminoácidos, proteínas e polissacarídeos estruturais, como a celulose (CALDAS et al., 1998). Segundo Hazarika (2003), o suprimento exógeno de carboidrato pode ampliar as reservas de amido e sacarose nas plantas micropropagadas e favorecer a aclimatização, bem como acelerar as adaptações fisiológicas.

A sacarose é um dos carboidratos mais utilizados na cultura de células e tecidos vegetais, em especial na técnica de micropropagação, pois tem efeito sobre a multiplicação, enraizamento e crescimento das plantas, visto que a fotossíntese da planta cultivada *in vitro*, ou do explante, é limitada. As concentrações mais frequentemente utilizadas variam de 2% a 3%; no entanto, concentrações mais elevadas podem ser usadas, de até 6%, como no caso de embriões, na indução de bulbilhos de alho ou na tuberização em raízes de mandioca (BARRUETO CID; TEXEIRA, 2010).

Capellades et al. (1991) trabalhando com roseira, observaram que a presença de concentrações mais elevadas de sacarose (5%) no meio de cultura, durante a fase de endurecimento, melhorou a função foliar. Carbonos assimilados, oriundos da sacarose no meio, foram estocados nas folhas, que agiram como órgãos de reserva, liberando energia durante a aclimatização. Ovono et al. (2007) relataram que o aumento da concentração de sacarose de 3% para 8%, no meio de cultura, proporciona maior número de raízes em plantas do complexo *D. cayenensis* - *D. rotundata*. Jasik e Mantell (2000) observaram que o meio de cultura suplementado com 20 g L⁻¹ de sacarose favoreceu a produção de um maior número de microtúberas e que o meio suplementado com 40 g L⁻¹, do mesmo carboidrato, proporcionou microtúberas de maior tamanho em três espécies de inhames comestíveis. Alizadeh et al. (1998), trabalhando com *D. composita*, encontraram melhores respostas para indução de microtúberas e desenvolvimento da parte aérea *in vitro*, quando utilizou sacarose na

concentração de 8%. Diferentemente, Souza et al. (2011), observaram que o número e comprimento das brotações de *D. multiflora* Griseb, diminuíram à medida que se aumentou as concentrações de sacarose.

1.4.3. Efeito da temperatura no cultivo *in vitro*

A temperatura é um fator ambiental que regula o crescimento das plantas e também afeta a sua eficiência fotossintética, podendo ser considerada tanto um fator limitante, como também estimulante dos processos fisiológicos (SHEN et al., 2004). Essa influência ocorre de diferentes maneiras e depende do tipo de planta, ou seja, se ela é de clima temperado ou tropical (BARRUETO CID; TEXEIRA, 2010).

Alterações da temperatura ambiental influenciam sensivelmente o crescimento das plantas. Mudanças em poucos graus ocorridas no ambiente natural geralmente levam a alterações significativas nas taxas de crescimento, sendo a temperatura mínima definida como aquela abaixo da qual não há crescimento; temperatura ótima, aquela onde se atinge o máximo de crescimento e temperatura máxima, o valor, acima do qual, não há crescimento e a planta pode morrer. Além disso, diferentes tecidos de uma mesma planta também podem apresentar diferentes temperaturas cardeais (SALISBURY; ROSS, 1991).

A habilidade para se desenvolver e sobreviver em diferentes condições termais envolve muitos processos integrados da planta (BERRY; BJÖRKMAN, 1980) e a capacidade de aclimação às variações na temperatura podem aumentar sua produtividade (VAN DER BIJL et al., 1989). Temperaturas ótimas para os processos biológicos são variáveis, ocorrendo queda na produtividade quando a temperatura se distancia da ideal (PILON; SANTAMARÍA, 2002).

A adaptação das plantas a diferentes temperaturas pode estar relacionada a variações nas concentrações de vários compostos, incluindo-se os carboidratos (SALISBURY; ROSS, 1991; LARCHER, 2006). Vaz et al. (2004) avaliaram os efeitos da temperatura no crescimento e formação da flor em plantas de *Psychomorphis pusilla* (Orchidaceae) cultivadas *in vitro* e suas relações com os níveis de carboidratos, clorofila e carotenóides. Esses autores observaram que em *P. pusilla*, o melhor desenvolvimento das plantas foi alcançado quando a temperatura de cultivo era mantida a 27 °C. Trabalhos realizados por Du et al. (1999) demonstraram que a taxa fotossintética de plantas de cana-de-açúcar

desenvolvidas em 10 °C tiveram uma redução de 20% quando comparada as plantas desenvolvidas em 30 °C. Massad et al. (2007) avaliaram as taxas fotossintéticas do milho em seis temperaturas e observaram que essas taxas aumentaram a partir de 15 °C até a temperatura de 35 °C, e a partir dessa, houve redução das taxas fotossintéticas. Para a cultura do inhame, são raros ou inexistentes os trabalhos que relatam a influência das variações de temperatura em seu crescimento e desenvolvimento.

1.4.4. Luz natural na micropropagação

A luz é um fator ambiental de fundamental importância para o crescimento e desenvolvimento das plantas, visto que, afeta direta e indiretamente processos vitais relacionados com a fotossíntese, fotomorfogênese e fototropismo (MORINI e MULEO, 2003). As respostas da planta não dependem apenas de ausência ou presença de luz, mas também de sua variação em qualidade, intensidade e duração (FELIPPE, 1986). Tais aspectos, exercem efeitos sobre muitos processos morfogênicos que ocorrem *in vitro* (GEORGE, 1993; KODYN; ZAPATA-ARIAS, 1998).

A intensidade luminosa necessária para a cultura de vários órgãos e tecidos diferem entre estágios de micropropagação, tipo de explante e as diferentes espécies vegetais (ECONOMOU; READ, 1987). O aumento da intensidade de luz no estágio de enraizamento em relação às fases de estabelecimento e multiplicação, pode aumentar as chances de sobrevivência das plantas que serão transplantadas ao ambiente *ex vitro* (GEORGE; SHERRINGTON, 1984). Essas intensidades são muito inferiores aquelas observadas para plantas que realizam fotossíntese em ambientes naturais. Para Zhou et al. (2005), uma das formas de facilitar o processo de aclimatização das plantas micropropagadas seria aumentar a intensidade luminosa, que promoveria a fotossíntese e a melhoria das relações hídricas.

Quando objetiva-se desenvolver a capacidade fotossintética nos tecidos ainda *in vitro*, um dos fatores mais importantes a ser considerado é o ambiente de luz, especialmente a intensidade (IBARAKI; NOZAKI, 2005).

Lee et al. (1985) descobriram que, a intensidade luminosa influencia de forma pronunciada a fotossíntese *in vitro*. Segundo eles, afeta também a concentração de clorofila e a ultraestrutura dos cloroplastídeos em *Liquidambar*

styraciflua. Além disso, a elevação nos níveis de luz produziu folhas mais espessas com diferenciação do tecido paliçádico no mesófilo. A anatomia dessas plantas apresentou-se mais próxima aquela de folhas de mudas em aclimatização do que do material cultivado *in vitro* sob baixa irradiância. Assim, o 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).

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.

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 àqueles naturais de desenvolvimento das plantas e, conseqüentemente, reduzirem o estresse da planta durante o transplante para ambiente *ex vitro* (ERIG; SCHUCH, 2005).

1.5. Aclimatização

O processo de transferência das plantas da condição *in vitro* para a condição *ex vitro* (casa de vegetação) é denominado de aclimatização (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). O sucesso dessa técnica requer que as plantas que se desenvolveram heterotróficamente, em ambientes de alta umidade, possam continuar seu desenvolvimento em condições autotróficas de moderada ou baixa umidade, maior temperatura e luminosidade (ZIMMERMAN,

1988; DEB; IMCHEN, 2010). De acordo com Donnelly e Vidaver (1984), esta fase constitui um dos maiores desafios à produção comercial de mudas micropropagadas e à baixa sobrevivência de plantas quando transferidas do meio de cultura ao solo.

A perda de vigor e a subsequente morte devido ao dessecamento são dois sérios problemas que ocorrem com plantas transferidas das condições *in vitro* para casa de vegetação (SUTTER; HUTZELL, 1984). Para Souza et al. (2006) as condições artificiais de iluminação, umidade e temperatura, aliadas as formulações dos meios de cultura, criam um ambiente que favorece o desenvolvimento de plantas incompletas e que, portanto, apresentam dificuldades e necessidades especiais para se adaptarem a uma condição distinta. Neste sentido, muitos autores sugerem alterações na composição química do meio, entre outras, como forma de melhorar a eficiência fotossintética e as relações hídricas das plantas, mudando para o estado autotrófico ainda *in vitro*, e assim minimizando o estresse da planta ao passar para a condição *ex vitro*.

O período de aclimatização de uma planta tem por objetivo corrigir as alterações e anormalidades ocasionadas durante o cultivo *in vitro*. Esse período, geralmente, dura de uma a quatro semanas (SMITH et al., 1986), podendo ser variável dependendo da espécie submetida a aclimatização e das técnicas utilizadas neste processo. Nesta fase, induz-se a transferência do metabolismo heterotrófico para o autotrófico por meio de alterações lentas que possibilitem à planta desenvolver maior controle sobre a perda e absorção de água. Esse processo se dá por meio de um aumento gradativo na irradiância e no decréscimo controlado da umidade (PREECE; SUTTER, 1991; ROCHA, 2005).

Dentre os trabalhos que apresentam protocolos de micropropagação, existem relativamente poucos que detalham o procedimento de transplante, aclimatização e que descrevem as dificuldades e propõe soluções para os problemas observados nesta fase. Embora existam algumas regras gerais como, manutenção da umidade relativa alta e temperatura amena, a experiência individual, a familiarização com a cultura, a escala de trabalho e as facilidades disponíveis são os principais fatores determinantes para a otimização desta fase (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

A manutenção de alta umidade relativa do ar, seguida por sua redução gradual após o período crítico, auxilia no desenvolvimento de ceras epicuticulares

e na capacidade de resposta de abertura e fechamento dos estômatos (SCIUTTI; MORINI, 1995). Brainerd e Fuchigami (1981) aumentaram a sobrevivência das plantas simplesmente abrindo as tampas dos frascos, ainda em sala de crescimento, durante 4 a 5 dias antes do transplante. Esta pré-aclimatização resultou em uma adaptação mais rápida dos estômatos do que em plantas diretamente transplantadas para a casa de vegetação.

Grattapaglia e Machado (1998) sugerem que, após a retirada das plantas do recipiente de micropropagação, elas sejam cobertas por polipropileno transparente com finalidade de se criar uma câmara saturada de umidade. Ao final de cada semana, faz-se uma abertura, em uma das extremidades do saco, de forma a incrementar as trocas de água e gases, até que se retire completamente a cobertura, promovendo, dessa forma, a progressiva rustificação das plantas.

Com relação ao incremento na irradiância, plantas cultivadas *in vitro* possuem baixo ponto de saturação de luz e, quando são transferidas para o ambiente externo, onde são expostas a níveis mais altos de irradiância, as folhas demonstram sintomas de estresse por fotoinibição ou, mesmo, foto-oxidação (CARVALHO; AMÂNCIO, 2002). Por esses motivos, a utilização de luz natural durante a fase de cultivo *in vitro* pode ser interessante.

Para o inhame, poucos são os trabalhos que relatam o processo de acclimatização de mudas micropropagadas (KADOTA; NIIMI, 2004; BEHERA et al., 2009; SOUZA et al., 2011), mais raro ainda são os estudos que avaliam os fatores que influenciam na sobrevivência das plantas durante a acclimatização.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGBIDINOUCOUN, A.; AHANHANZO, C.; ADOUKONOU SAGBADJA, H.; ADJASSA, M.; AGBANGLA, C. Optimization of yam *in vitro* genebanking: effects of activated charcoal and darkness on plantlets of three accessions from Benin. **International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology**, v.4, n.4, p.21-29, 2013.
- AHANHANZO, C.; GANDONOU, CH. B.; AGBIDINOUCOUN, A.; DANSI, A.; AGBANGLA, C. Effect of two cytokinins in combination with acetic acid α -

naphthalene on yams (*Dioscorea spp.*) genotypes' response to *in vitro* morphogenesis. **African Journal of Biotechnology**, v.9 n.51, p.8837-8843, 2010.

ALIZADEH, S.; MANTELL, S. H.; VIANA, A. M. *In vitro* culture and microtuber induction in the steroidal yam *Dioscorea composite* Hemsl. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.53, p.107-112, 1998.

ASIEDU, R.; WANYERA, N. M.; NG, S. Y. C.; NG, N. Q. Yams. In: FUCCILLO, D.; SEARS, L.; STAPELTON, P. (Ed) **Biodiversity in trust: conservation and use of plant genetic resources in CGIAR centers**. Cambridge University Press, Cambridge, UK, p. 57-66, 1997.

BARRUETO CID, L. P.; TEIXEIRA, J. B. Explante, meio nutritivo, luz e temperatura. In: BARRUETO CID, L. P. **Cultivo in vitro de plantas**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, p. 15-49, 2010.

BEHERA, K. K.; SAHOO, S.; PRUSTI, A. Regeneration of plantlet of water yam (*Dioscorea oppositifolia* L.) through *in vitro* culture of nodal segments. **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca**. v.37, p.94-102, 2009.

BERRY, J. A.; BJÖRKMAN, O. Photosynthetic response and adaptation to temperature in higher plants. **Annual Review of plant physiology**, v. 31, p. 491-543, 1980.

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.

BRAINERD, K. E.; FUSHIGAMI, L. J. Acclimatization of aseptically cultured apple plants to low relative humidity. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 16, n. 4, p. 515-518, 1981.

- CALDAS, S. L.; 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, v. 1,p. 87-132, 1998.
- CAPELLADES, M.; LEMEURE, R.; DEBERGH, P. Effects of sucrose on starch accumulation and rate of photosynthesis in *rosa* cultured *in vitro*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 25, n. 1, p. 21-26, 1991.
- CARVALHO, L. C.; AMÂNCIO, S. Antioxidant defense system in plantlets transferred from *in vitro* to *ex vitro*: effects of increasing light intensity and CO₂ concentration. **Plant Science**, Clare, v. 162, n. 1, p. 33-40, 2002.
- 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, v.1, p.113-126, 2002.
- CHU, E. P.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R. C. Native and exotic species of *Dioscorea* used as food in Brazil. **Economic Botany**, v. 45, no. 4, p. 467-479, 1991.
- COURSEY, D. G. Yams - *Dioscorea* spp. (Dioscoreaceae). In: IMMNONDS, N.W. **Evolution of crop plants**, New York, Ed. Longman, p. 70-74, 1976.
- DEB, C. R.; IMCHEN, T. An efficient *in vitro* hardening technique of tissue culture raised plants. **Biotechnology**, v. 9, n. 1, p. 79-83, 2010.
- DONNELLY, D. J.; VIDAVER, W. E. Pigment content and gas exchange of red raspberry *in vitro* and *ex vitro*. **Journal of the American Society of Horticultural Science**, Alexandria, v.109, n.2, p.177- 181, 1984.
- DOUSSEAU, S.; ALVARENGA A. A.; ARANTES, L. O.; OLIVEIRA, D.; NERY, F. C. Germinação de sementes de tanchagem (*Plantago tomentosa* Lam.): influência da temperatura, luz e substrato. **Ciência e Agrotecnologia**, v.32, n. 2, p. 438-443, 2008.

DU, Y.C.; NOSE, A.; WASANO, K. Effects of chilling temperature on photosynthetic rates, photosynthetic enzyme activities and metabolite levels in leaves of three sugarcane species. **Plant, Cell and Environment**, v.22, n.3, p.317–324. 1999.

ECONOMOU, A.S.; READ, P.E. Light treatments to improve efficiency of in vitro propagation systems. **Hortscience**, Alexandria, v.22, n.5, p.751-754, 1987.

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

FAO, **FAOSTAT, DATABASE, CROP PRIMARY**. Disponível em: <<http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/download/Q/QC/S>>, FAOSTAT, DATABASE, CROP PRIMARY. Acesso em: 24 abr. 2017.

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

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture**, part 1 - the technology. 2. ed. Exegetics Ltd., England, 786 p.1993.

GEORGE, E.F.; SHERRINGTON, P.D. **Plant propagation by tissue culture**. Eversley: Exegetics, 1984.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EmbrapaSPI/ Embrapa CNPH, v.1, p.183-260, 1998.

HAZARIKA, B. N. Acclimatization of tissue-cultured plants. **Current Science**, Bangalore, v. 85, n. 12, p. 1704- 1712, 2003.

HUANG, X. L.; YANG, B.; HU, C. G.; YAO J. L. *In vitro* induction of inflorescence in *Dioscorea zingiberensis*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.99, p.209-215, 2009.

IBARAKI, Y.; NOZAKI, Y. Estimation of light intensity distribution in a culture vessel. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 80, n. 1, p. 111-113, 2005.

JANSSENS, M. Yam. In: Raemaekers R. (Ed). **Crop production in tropical Africa**, p. 229-245, 2001.

JASIK, J.; MANTELL, S. H.; Effects of jasmonic acid and its methyl ester on *in vitro* microtuberization of three food yam (*Dioscorea*) species. **Plant Cell Reports**, v.19, p.863-867, 2000.

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.

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**, Amsterdam, v. 55, p. 141-145, 1998.

LARCHER, W. **Ecofisiologia Vegetal**. São Carlos, SP, 398p, 2006.

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

LEE, N.; WETZSTEIN, H. Y.; SOMMER, H. E. Effects of quantum flux density on photosynthesis and chloroplast ultrastructure in tissue-cultured plantlets and seedlings of *Liquidambar styraciflua* L. towards improved acclimatization and field survival. **Plant Physiology**, v. 78, n. 3, p. 637-641, 1985.

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.

MANDAL, R. C. Tropical Root and Tuber Crops. India, **Agrobotanical Publishers**, 396 p, 1993.

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.

MATU, J. E. P.; CORTÉS, M. **Raíces y tubérculos**. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, 2000.

MASSAD, R.S.; TUZET, A.; BETHENOD, O. The effect of temperature on C4-type leaf photosynthesis parameters. **Plant, Cell and Environment**, v.30, n.9, p.1191–1204, 2007.

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, CD-ROM, 2003.

MESQUITA, A. S. Inhame e taro: cenários dos mercados internacional, brasileiro e baiano. **Bahia Agrícola**, Salvador, v. 5, n. 2, 2002, p. 54-64.

MONTALDO, A. Cultivo de raíces y tubérculos tropicales. **Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura**, San José, Costa Rica. 2. ed, p. 131-230, 1991.

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

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, p.3-35, 2003.

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, p. 83-98, 2002.

OLIVEIRA, A. P.; BARBOSA, L. J. N.; PEREIRA, W. E.; SILVA, J. E. L.; OLIVEIRA, A. N. P. Produção de rizóforos comerciais de inhame em função de doses de nitrogênio. **Horticultura Brasileira** v. 25, p. 79-82, 2007.

OLIVEIRA, A. P.; SILVA, D. F.; SILVA, J. A.; OLIVEIRA, A. N. P.; SANTOS, R. R.; SILVA, N. V.; OLIVEIRA, F. J. M. Tecnologia alternativa para produção de túberas-semente de inhame e seus reflexos na produtividade. **Horticultura Brasileira**, v. 30, p. 553-556, 2012.

OVONO, P. O.; 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, p. 39-53, 2002.

PEDRALLI, G. **Revisão taxonômica das espécies de Dioscoreaceae (R.Br.) Lindley da cadeia do Espinhaço, Minas Gerais e Bahia, Brasil.** Tese (Doutorado em Ciência – Botânica) Dpto. Botânica, Universidade de São Paulo, São Paulo. 400p, 1998.

PEREA, M. Contribución de la biotecnología al desarrollo sostenible del cultivo de ñame. In: PEREA, M. (Ed). Bogota, D. C.; Colombia. **Biotecnología agrícola**, 2001, p. 289-301.

PILON, J.; SANTAMARÍA, L. Clonal variation in the thermal responses of the submerged aquatic macrophyte *Potamogeton pectinatus*. **Journal of Ecology**. v.90, n.1, p.141-152, 2002.

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.

PREECE, J. E.; SUTTER, E. G. Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field. In: **Micropropagation**. Springer Netherlands, p. 71-93, 1991.

RAJYALAKSHMI, P.; GEERVANI, P. Nutritive value of the foods cultivated and consumed by ther tribals of South India. **Plant Foods for Humam Nutrition**, vol. 46. p. 53-61, 1999.

ROCHA, H. S. **Luz e sacarose na micropropagação da bananeira “Prata Anã”: alterações morfoanatômicas.** 2005. 98p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Lavras, 2005.

SALISBURY, F. B.; ROSS, C. W. **Plant Physiology**. 4th ed. California; Wadsworth Publishing Company, 682p. 1991.

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

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, 6p, 2006.

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, p. 21-31, 2002.

SANTOS, E. S.; CASÉ FILHO, J.; LACERDA, J. T.; CARVALHO, R. A. Inhame (*Dioscorea sp.*) tecnologia de produção e preservação ambiental. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, v. 1, p. 31-36, 2007.

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, p. 181-195, 2002.

SCIUTTI, R.; MORINI, S. Water loss and photosynthesis of plum plantlets is influenced by relative humidity during rooting in vitro. **Journal of Horticultural Science**, v. 70, n. 2, p. 221-228, 1995.

SHEN, Y; ZHANG, Y; KONDOH, A.; TANG, C; CHEN, J; XIAS, J; SAKLLRA, Y.; LIU, C; SUN, H. Seasonal variation of energy partitioning in irrigated lands. **Hydrological Processes**. v.18, n.12, p.2223-2234, 2004.

SILVA, D. A. Novas opções tecnológicas para o cultivo do inhame (*Dioscorea sp*) no nordeste do Brasil. In: SIMPÓSIO NACIONAL SOBRE AS CULTURAS DE INHAME E TARO, 2. 2002. João Pessoa. **Anais...** João Pessoa: EMEPA-PB, v. 1, p. 79-82, 2002.

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 S. O. 40p, 2012.

- SIMOES, K. da S. **Ajuste de protocolo para produção de mudas de inhame (*Dioscorea rotundata* POIR.) *in vitro***. Cruz das Almas-BA, 2013. 111 f. Dissertação. (Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias). Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2013.
- SMITH, M. A. L.; PALTA, J. P.; McCOWN, B. H. Comparative anatomy and physiology of microcultured, seedling and greenhouse-grown Asian white birch. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 111, n. 3, p. 437-442, 1986.
- SOUZA, A. V. de; BERTONI, B. W.; FRANÇA, S. de C.; PEREIRA, A. M. S. Micropropagação de *Discorea multiflora* Grised. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 1, p. 92-98, 2011.
- SOUZA, F. V. D.; COSTA, M. A. P. C.; SILVA NETO, H. P. Acclimatização. In: SOUZA, A. S.; JUNGHANS, T. G. **Introdução a micropropagação de plantas**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, v. 1, p. 131-140, 2006.
- SUTTER, E. G.; HUTZELL, M. Use of humidity tents and antitranspirants in the acclimatization to tissue-cultured plants to the greenhouse. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 23, n. 4, p. 303-312, 1984.
- TAMIRU, M.; BECKER, H. C.; MAASS, B. L. Diversity, distribution and management of yam landraces (*Dioscorea* spp.) in Southern Ethiopia. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 55, p. 115-131, 2006.
- VAN DER BIJL, L.; SAND-JENSEN, K.; HJERMIND, A. L. Photosynthesis and canopy structure of a submerged plant, *Potamogeton pectinatus*, in a danish lowland stream. **Journal of Ecology**. v. 77, n. 4, p. 947-962, 1989.
- VAZ, A. P. A.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R. C. L.; KERBAUY, G. B. Photoperiod and temperature effects on *in vitro* growth and flowering of *P. pusilla*, an epiphytic orchid. **Plant Physiology and Biochemistry**. v. 42, p. 411-415, 2004.

VEASEY, E. A. et al. Ocorrência e diversidade de espécies cultivadas do gênero *Dioscorea* em diversos agroecossistemas brasileiros. **Agrobiodiversidade no Brasil: experiências e caminhos da pesquisa**. Recife: NUPEEA, v. 1, p. 45-74, 2010.

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.

WAINWRIGHT, H.; SCRACE, J. Influence of “in vitro” preconditioning with carbohydrates during the rooting of microcuttings on “in vitro” establishment. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.38, p.261-267, 1989.

ZHOU, Y. H.; GUO, D. P.; ZHU, Z. J.; QIAN, Q. Q. Effects of *in vitro* rooting environments and irradiance on growth and photosynthesis of strawberry plantlets during acclimatization. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 81, n. 1, p. 105-108, 2005.

ZIMMERMAN, R. H. Micropropagation of woody plants: post tissue culture aspects. **Acta Horticulturae**, Wageningen, n. 227, p. 489-499, 1988.

ARTIGO 1

SACAROSE E TEMPERATURA NO CULTIVO *IN VITRO* DE INHAME

¹Artigo a ser ajustado para posterior submissão ao Comitê Editorial do periódico científico Ciência Agrônômica, em versão na língua portuguesa.

Sacarose e temperatura no cultivo *in vitro* de Inhame

Sacarose and temperature in yam *in vitro* cultivation

RESUMO - A maioria dos trabalhos voltada para micropropagação do inhame visa estudar alterações nas concentrações de reguladores de crescimento no meio de cultura. No entanto, fatores como a temperatura de cultivo e concentração de sacarose, também são importantes para o desenvolvimento e crescimento das plantas *in vitro*. Este trabalho teve como objetivo estudar o efeito da temperatura do ambiente de cultivo e dos níveis de sacarose no meio de cultura sobre o crescimento e desenvolvimento de plantas de inhame (*Dioscorea rotundata* Poir.). Nesse experimento, microestacas de plantas de 'Inhame da Costa' previamente cultivadas *in vitro*, com aproximadamente 1 cm, foram inoculadas em frascos de vidro contendo 30 mL do meio de cultura MS suplementado com 0; 15; 30; 45 e 60 g L⁻¹ de sacarose, acrescido de 100 mg L⁻¹ de Inositol, 20 mg L⁻¹ de cisteína, 0,20 mg L⁻¹ de ácido naftalenoacético (ANA), 0,08 mg L⁻¹ de ácido giberélico (GA₃), 0,05 mg L⁻¹ de benzilaminopurina (BAP), 1 g L⁻¹ de carvão ativado, solidificado com 2,5 g L⁻¹ de phytigel e o pH ajustado em 5,8. As plantas foram mantidas por 90 dias sob quatro regimes de temperatura (22; 25; 28 e 31 °C), com as demais condições controladas, densidade de fluxo de fótons de 16 μmol m⁻² s⁻¹ e fotoperíodo de 16 horas em BOD. O experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 5 x 4, com 5 repetições, em que cada parcela consistiu-se de um frasco com 3 microestacas, totalizando 15 plantas por tratamento. As plantas de 'Inhame da Costa' tiveram melhor desenvolvimento quando cultivadas em meio de cultura MS com 30 g L⁻¹ de sacarose e mantidas em ambiente com temperatura de 22 °C.

Palavras chave: *Dioscorea rotundata*, micropropagação, micro estacas.

ABSTRACT - The majority of the work on yam micro propagation focused in studying changes in the concentrations of growth regulators in the culture medium. However, factors such as crop temperature and sucrose concentration are also important for plant *in vitro* development and growth. This work aims to study the effect of growth environment temperature and sucrose levels on yam (*Dioscorea rotundata* Poir.) plants growth and development. In this experiment, micro-plants of 'Inhame da Costa' previously cultured *in vitro*, with approximately 1 cm, were inoculated in glass

35 vials containing 30 mL of MS culture medium supplemented with 0; 15; 30; 45 and 60
36 g L⁻¹ sucrose, plus 100 mg L⁻¹ de Inositol, 20 mg L⁻¹ de cysteine, 0.20 mg L⁻¹
37 naphthaleneacetic acid (ANA), 0.08 mg L⁻¹ gibberellic acid (GA3), 0.05 mg L⁻¹
38 benzylaminopurine (BAP), 1 g L⁻¹ de activated carbon, solidified with 2.5 g L⁻¹
39 phytagel and pH adjusted to 5.8. The plants kept for 90 days under four temperature
40 regimes (22, 25, 28 and 31 °C), with the other conditions controlled, photon flux
41 density of 16 μmol m⁻² s⁻¹ and 16-hour photoperiod in BOD. The experiment was
42 installed in a completely randomized design, in a 5 x 4 factorial scheme, with 5
43 replicates, where each plot consisted of a vial with 3 micro-cuttings, totaling 15 plants
44 per treatment. The 'Inhame da Costa' plants sustained better development when
45 cultivated in MS medium with 30 g L⁻¹ of sucrose and kept in an environment with a
46 temperature of 22 °C.

47 **Key words:** *Dioscorea rotundata*, micro propagation, micro stakes.

48

INTRODUÇÃO

49 O inhame (*Dioscorea spp.*) é uma planta tuberosa da família Dioscoreaceae
50 amplamente cultivada no Brasil, em especial, na região Nordeste, onde ocorre a
51 maior produção e a cultura desempenha importante papel socioeconômico na
52 geração de emprego, renda e produção de alimento para os pequenos e médios
53 agricultores, e assim, prestando uma grande contribuição ao desenvolvimento rural
54 (SANTOS *et al.*, 2007).

55 Apesar desta importância, o inhame permanece como uma das plantas com
56 menos evolução nas técnicas de manejo, cultivo e produção de mudas. Para sua
57 propagação, por exemplo, uma parte importante da colheita é utilizada como
58 sementes para a estação seguinte, o que reduz a produção e facilita a disseminação
59 de pragas e doenças (OLIVEIRA *et al.*, 2007; SANTOS *et al.*, 2007). De acordo com
60 Oliveira *et al.* (2012), a redução na produção do inhame é resultante da falta de
61 disponibilidade de material propagativo de qualidade, bem como em função do custo
62 alto das túberas sementes, desmotivando os produtores rurais na expansão de suas
63 áreas de cultivo.

64 Na tentativa de contornar este problema, diversos trabalhos têm buscado
65 aperfeiçoar a técnica da micropropagação para a cultura do inhame (AHANHANZO
66 *et al.*, 2010; SIMÕES, 2013; SOUZA *et al.*, 2011), uma vez que, o seu uso permite a
67 produção massal de um genótipo de interesse em curto período de tempo e em

68 pequeno espaço físico, além de possibilitar a produção de plantas isentas de
69 patógenos (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998; JUNGHANS; SOUZA, 2013).

70 O crescimento e a multiplicação *in vitro* de diferentes espécies vegetais são
71 afetados por muitos fatores, podendo-se destacar o tipo de explante utilizado, a
72 formulação e a concentração de sais do meio, a combinação de reguladores de
73 crescimento e suas concentrações, tipo e concentração das fontes de carbono, bem
74 como a luz e a temperatura do ambiente de cultivo (BARRUETO CID; TEXEIRA,
75 2010). Para adequar a micropropagação do inhame, tem sido estudado diferentes
76 concentrações dos sais do meio MS, o ajuste do teor de açúcares e diferentes
77 combinações e concentrações de reguladores de crescimento no meio de cultura
78 (AHANHANZO *et al.*, 2010; BORGES *et al.*, 2011; SIMÕES, 2013; SOUZA *et al.*,
79 2011).

80 A fonte de carbono adicionada ao meio de cultura pode influenciar
81 significativamente o desempenho do cultivo, devido aos seus efeitos sobre o aporte
82 de energia para o explante e a manutenção do potencial osmótico do meio
83 (RIBEIRO *et al.*, 2015). A sacarose tem sido a fonte de carbono mais utilizada no
84 cultivo *in vitro* do inhame, normalmente na concentração de 3%, contudo, variações
85 na sua concentração tem sido estudada visando melhorar o desenvolvimento das
86 plantas *in vitro* (OVONO *et al.*, 2009; SOUZA *et al.*, 2011).

87 A taxa de crescimento e desenvolvimento das plantas depende da temperatura
88 do ambiente que a circunda. Normalmente, as condições de cultivo no laboratório de
89 cultura de tecidos visam manter a temperatura o mais estável possível. Em geral, a
90 faixa de temperatura a ser usada pode variar entre 23 °C e 27 °C, porém, cada
91 espécie tem uma faixa de temperatura representada por um valor mínimo, máximo e
92 ótimo (BARRUETO CID; TEXEIRA, 2010; HATFIELD; PRUEGER, 2015). Para o
93 inhame, não existem trabalhos que visam estudar o efeito da temperatura do
94 ambiente de cultivo no crescimento e desenvolvimento das plantas *in vitro*.

95 Sendo assim, este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito dos níveis de
96 sacarose no meio de cultura e da temperatura do ambiente de cultivo sobre o
97 crescimento e desenvolvimento de plantas de inhame (*Dioscorea rotundata* Poir.).

98 MATERIAL E MÉTODOS

99 Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos
100 Vegetais, da Embrapa Mandioca e Fruticultura em Cruz das Almas-BA. Como
101 material vegetal, foram utilizadas túberas de 'Inhame da Costa' (*Dioscorea rotundata*

102 Poir.), obtidas de produtores da Região do Recôncavo Baiano. As túberas foram
103 tratadas com fungicidas, como proposto por Silva Neto (2014) e postas para
104 germinar em casa de vegetação, sem utilização de nenhum substrato.

105 Depois de 70 dias, com as túberas germinadas, foram retirados segmentos
106 nodais com aproximadamente 2 cm de comprimento, contendo gemas axilares, que
107 foram colocados em recipiente contendo água destilada com três gotas de
108 detergente neutro e levados ao laboratório. Posteriormente, os segmentos foram
109 lavados em água corrente durante 10 min, e em seguida, em condições assépticas,
110 foram desinfestados com álcool 70% por quatro minutos e solução de hipoclorito de
111 sódio a 60% contendo 1% de cloro ativo com duas gotas de Tween-20, por oito
112 minutos, seguido da tripla lavagem em água destilada e autoclavada.

113 Para estabelecimento dos explantes *in vitro*, foi utilizado o protocolo descrito
114 por Simões (2013). Após o estabelecimento das plantas *in vitro*, foram retiradas
115 microestacas com tamanho de aproximadamente 1 cm e contendo pelo menos uma
116 gema, que foram inoculadas em frascos de vidro contendo 30 mL de meio de cultura
117 MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) acrescido de 100 mg L⁻¹ de inositol, 20 mg L⁻¹ de
118 cisteína, 0,20 mg L⁻¹ de ANA, 0,08 mg L⁻¹ de GA₃, 0,05 mg L⁻¹ de BAP, 1 g L⁻¹ de
119 carvão ativado, suplementado com cinco concentrações de sacarose (0; 15; 30; 45 e
120 60 g L⁻¹), solidificado com 8 g L⁻¹ de ágar, pH ajustado para 5,8 antes da
121 autoclavagem e cultivadas em quatro regimes de temperatura do ambiente (22; 25;
122 28 e 31 °C) com densidade de fluxo de fótons de 16 μmol m⁻² s⁻¹ e fotoperíodo de 16
123 horas em BOD.

124 O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado (DIC) em esquema
125 fatorial 5 x 4 (sacarose x temperatura), com 5 repetições, em que cada parcela
126 consistiu-se de um frasco com 3 microestacas, totalizando 15 plantas por
127 tratamento.

128 Aos 90 dias de cultivo foram avaliadas as seguintes características: número de
129 folhas (NF), número de raízes (NR), número de microestacas (NM), altura da planta
130 (AP) em centímetro e massa da matéria fresca (MPF) e seca (MPS) em miligrama.

131 Os dados obtidos foram submetidos ao teste F da análise de variância. Para as
132 médias das concentrações de sacarose e dos regimes de temperatura foram
133 ajustados modelos de regressão polinomial. Sendo que para as equações de 1º grau
134 as doses ótimas foram obtidas a partir dos pontos de mínimo e máximo. Já para as
135 equações de 2º grau as doses ótimas foram obtidas derivando a equação e

136 igualando a zero. Posteriormente, os valores esperados para cada variável em
 137 função da dose ótima foram estimados pelas equações. As variáveis, número de
 138 folhas verdes (NF), número de raízes (NR) e número de microestacas (NM) foram
 139 transformadas para $\sqrt{X+1}$, visando o atendimento das pressuposições da análise
 140 de variância.

141 As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do programa estatístico
 142 R (R CORE TEAM, 2016).

143 RESULTADOS E DISCUSSÃO

144 Na Tabela 1, pode ser observado que para número de folhas (NF), número de
 145 raízes (NR) e número de microestacas (NM) houve significância apenas para os
 146 fatores isolados e que para a interação temperatura x sacarose houve efeito
 147 significativo nas variáveis altura de plantas (AP) e massa da planta fresca (MPF) e
 148 seca (MPS).

149 **Tabela 1** - Resumo da análise de variância para número de folhas (NF), número de
 150 raízes (NR), número de microestacas (NM), altura de planta, em cm (AP), massa da
 151 planta fresca (MPF) e seca (MPS) de plantas de 'Inhame da Costa' cultivadas *in vitro*
 152 em diferentes concentrações de sacarose e temperaturas.

FV	GL	QM					
		NF	NR	NM	AP	MPF	MPS
Temperatura	3	2,14**	1,38**	1,62**	11,03**	92507,31**	1001,85**
Sacarose	4	1,09**	1,94**	0,82**	14,88**	97144,94**	961,83**
TEMP x SAC	12	0,11 ^{ns}	0,13 ^{ns}	0,08 ^{ns}	1,26**	7603,37*	78,98*
Erro	75	0,13	0,09	0,08	0,54	3952,31	40,79
CV (%)		21,20	18,00	16,22	30,81	28,43	28,53
Média Geral		2,71	2,41	2,65	2,39	221,12	22,39

153 ** e * significativo a 1% e 5% de probabilidade, respectivamente, pelo teste de F. ^{ns} não significativo a
 154 5% de probabilidade.

155 Em relação aos coeficientes de variação (CV), o menor valor foi de 16,22%
 156 para NM e o maior valor foi de 30,81% para AP. Trabalhando na micropropagação
 157 de *Dioscorea rotundata*, Simões *et al.* (2014) encontrou CV's variando de 29,42% a
 158 47,42%, valores semelhantes foram observados por Ahanhanzo *et al.* (2010), que
 159 encontrou CV's entre 36,46% e 50,19% no cultivo *in vitro* de plantas do complexo
 160 *Dioscorea cayenensis-rotundata*. Segundo Carvalho (2013), experimentos na área
 161 de cultura de tecidos, geralmente, apresentam CV's mais elevados, mostrando que

162 apesar do controle nas condições de cultivo (temperatura, luz e fotoperíodo) a
 163 distribuição dos dados de resposta não costuma seguir o pressuposto da
 164 normalidade, gerando CV's bastante elevados e exigindo muitas vezes a
 165 transformação destes dados para possibilitar a interpretação dos resultados.

166 Os modelos de regressão polinomial, as doses de sacarose e as temperaturas
 167 ótimas, bem como os valores estimados de cada variável pelo modelo de regressão,
 168 são apresentados nas tabelas 2 e 3. Observa-se que houve ajuste de modelos de 1º
 169 e 2º grau, com R² que variaram de 72,22% a 99,93%.

170 **Tabela 2** - Equações de regressão, coeficientes de determinação, doses ótimas de
 171 sacarose (g L⁻¹) e valores estimados do número de folhas, número de raízes,
 172 número de microestacas, altura de planta (cm), massa da planta fresca e seca (mg)
 173 de plantas de 'Inhame da Costa' em função da concentração de sacarose (g L⁻¹).

Temperatura (°C)	Equação	R ² (%)	Dose ótima	Valor estimado
Número de folhas				
22; 25; 28; 31	$\hat{y}^{**} = 1,4206 + 0,0775x - 0,0008x^2$	90,40	48,44	3,53
Número de Raízes				
22; 25; 28; 31	$\hat{y}^{**} = 0,6654 + 0,1153x - 0,0013x^2$	94,75	44,35	3,12
Número de microestacas				
22; 25; 28; 31	$\hat{y}^* = 1,474 + 0,0708x - 0,0007x^2$	87,02	50,57	3,26
Altura da planta (cm)				
22	$\hat{y}^* = 1,2534 + 0,1083x - 0,001x^2$	91,25	54,15	4,19
25	$\hat{y}^{**} = 0,9874 + 0,1035x - 0,0011x^2$	80,11	47,05	3,42
28	$\hat{y}^{**} = 1,0852 + 0,031x$	72,59	60,00	2,94
31	$\hat{y}^{ns} = 1,48$.	.	1,48 ¹
Massa da planta fresca (g)				
22	$\hat{y}^{**} = 148,07 + 8,7814x - 0,0922x^2$	91,63	47,62	357,16
25	$\hat{y}^* = 101,46 + 8,5944x - 0,0836x^2$	88,16	51,40	322,34
28	$\hat{y}^{**} = 106,899 + 2,7809x$	72,22	60,00	273,76
31	$\hat{y}^* = 82,133 + 1,6809x$	82,74	60,00	182,99
Massa da planta seca (g)				
22	$\hat{y}^{**} = 15,51 + 0,8863x - 0,0095x^2$	87,32	46,65	36,18
25	$\hat{y}^* = 10,309 + 0,8681x - 0,0083x^2$	87,26	52,30	33,01
28	$\hat{y}^* = 8,344 + 0,6707x - 0,0069x^2$	86,17	48,60	24,64
31	$\hat{y}^* = 8,323 + 0,1648x$	77,94	60,00	18,21

174 ** e * significativo a 1% e 5% de probabilidade, respectivamente, pelo teste de F. ^{ns} não significativo a
 175 5% de probabilidade. ¹Baseado na média dos valores observados.

176 **Tabela 3** - Equações de regressão, coeficientes de determinação, temperaturas
 177 ótimas (°C) e valores estimados do número de folhas, número de raízes, número de
 178 microestacas, altura de planta (cm), massa da planta fresca e seca (mg) de plantas
 179 de 'Inhame da Costa' em função da temperatura do ambiente de cultivo (°C).

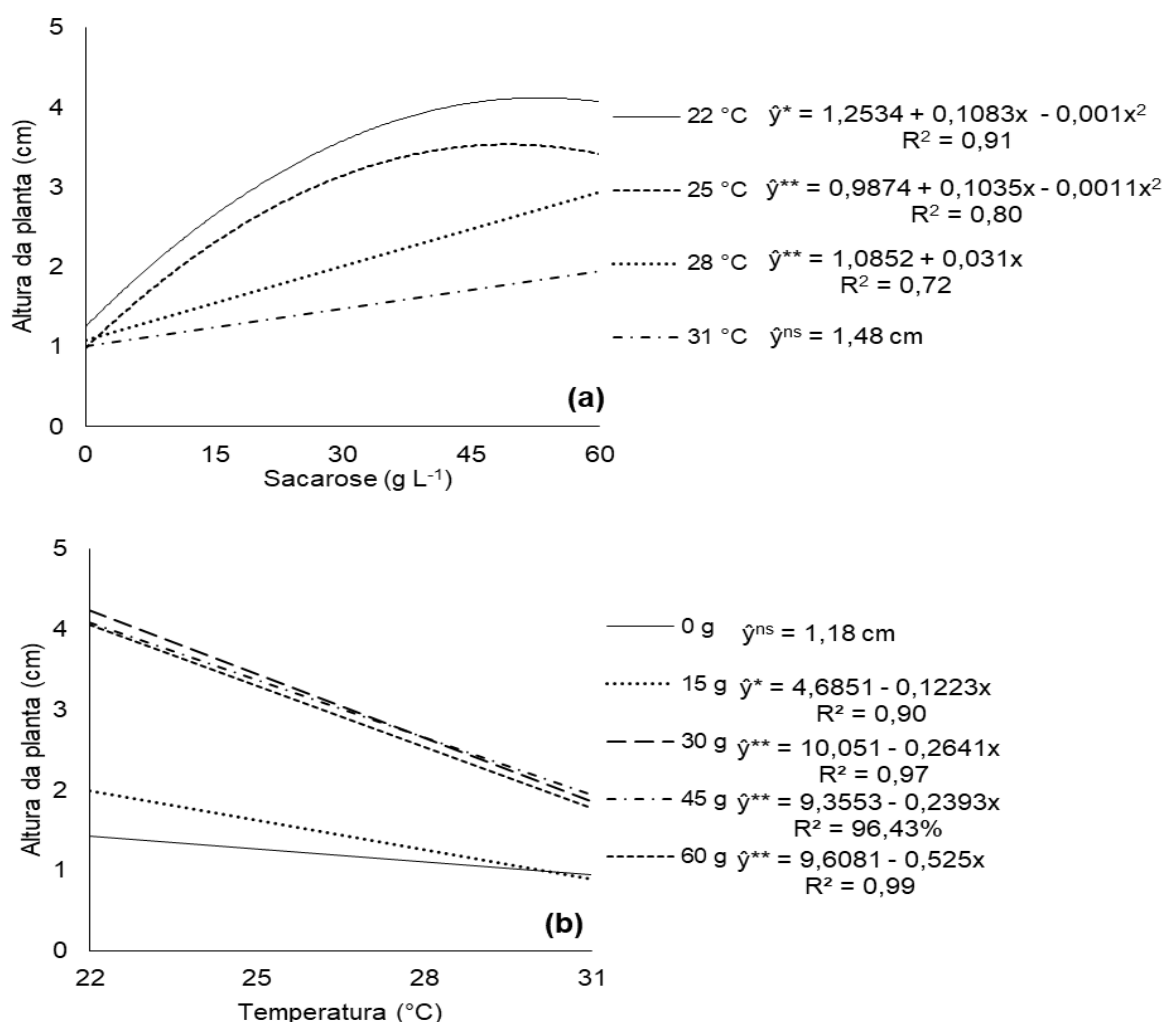
Concentração de Sacarose	Equação	R ² (%)	Temp. ótima	Valor estimado
Número de folhas				
0; 15; 30; 45; 60	$\hat{y}^{**} = 9,5479 - 0,2596x$	99,05	22	3,84
Número de raízes				
0; 15; 30; 45; 60	$\hat{y}^{**} = 7,8319 - 0,2059x$	98,01	22	3,30
Número de microestacas				
0; 15; 30; 45; 60	$\hat{y}^{**} = 9,1402 - 0,2466x$	99,33	22	3,71
Altura da planta (cm)				
0	$\hat{y}^{ns} = 1,18$.	.	1,18 ¹
15	$\hat{y}^* = 4,6851 - 0,1223x$	90,40	22	1,99
30	$\hat{y}^{**} = 10,051 - 0,2641x$	96,82	22	4,24
45	$\hat{y}^{**} = 9,3553 - 0,2393x$	96,43	22	4,09
60	$\hat{y}^{**} = 9,6081 - 0,2525x$	99,93	22	4,05
Massa da planta fresca (g)				
0	$y^{ns} = 111,60$.	.	111,60 ¹
15	$\hat{y}^{**} = 510,67 - 13,593x$	94,24	22	211,63
30	$\hat{y}^{**} = 869,43 - 22,417x$	96,79	22	376,26
45	$\hat{y}^{**} = 818,07 - 20,721x$	96,38	22	362,20
60	$\hat{y}^{**} = 794,22 - 20,008x$	97,25	22	354,04
Massa da planta seca (g)				
0	$\hat{y}^* = 40,567 - 1,0929x$	97,10	22	16,52
15	$\hat{y}^{**} = 49,689 - 1,3012x$	96,73	22	21,06
30	$\hat{y}^{**} = 90,685 - 2,36x$	97,93	22	38,77
45	$\hat{y}^{**} = 84,328 - 2,1589x$	97,28	22	36,84
60	$\hat{y}^{**} = 81,219 - 2,0716x$	95,44	22	35,64

180 ** e * significativo a 1% e 5% de probabilidade, respectivamente, pelo teste de F. ^{ns} não significativo a
 181 5% de probabilidade. ¹Baseado na média dos valores observados.

182 Verificou-se uma relação quadrática entre AP e concentração de sacarose nas
 183 temperaturas 22 °C e 25 °C e uma relação linear crescente para a temperatura de
 184 28 °C. Para a temperatura de 31 °C não houve diferenças significativas na altura das
 185 plantas para as diferentes doses de sacarose estudadas (Tabela 2 e Figura 1a).
 186 Pela estimativa com a equação de regressão, plantas cultivadas em ambientes com
 187 temperatura de 22 °C apresentaram a maior altura na concentração de 54,15 g L⁻¹
 188 (4,19 cm) (Tabela 2). No entanto, quando compara-se o valor estimado pela

189 equação (4,19 cm) com o observado para a concentração de 30 g L⁻¹ (4,24 cm),
 190 percebe-se que o aumento na concentração de sacarose não incrementa de
 191 maneira significativa a altura das plantas de 'Inhame da Costa' cultivado *in vitro*.
 192 Estes resultados diferem dos encontrados por Cunha (2014) que, trabalhando na
 193 micropropagação de mudas de *Dioscorea rotundata*, verificou para a dose máxima
 194 de 45 g L⁻¹ de sacarose uma altura de 1,57 cm. Por outro lado, Menezes *et al.* (2010)
 195 obtiveram os melhores resultados para a altura de plantas *in vitro* de goiabeira
 196 'Pedro Sato' quando utilizaram 30 g L⁻¹ de sacarose.

197 **Figura 1** – Altura de plantas de 'Inhame da Costa' micropropagadas em meio de
 198 cultura MS com diferentes concentrações de sacarose (a) e mantidas em ambientes
 199 com distintas temperaturas (b) durante 90 dias.

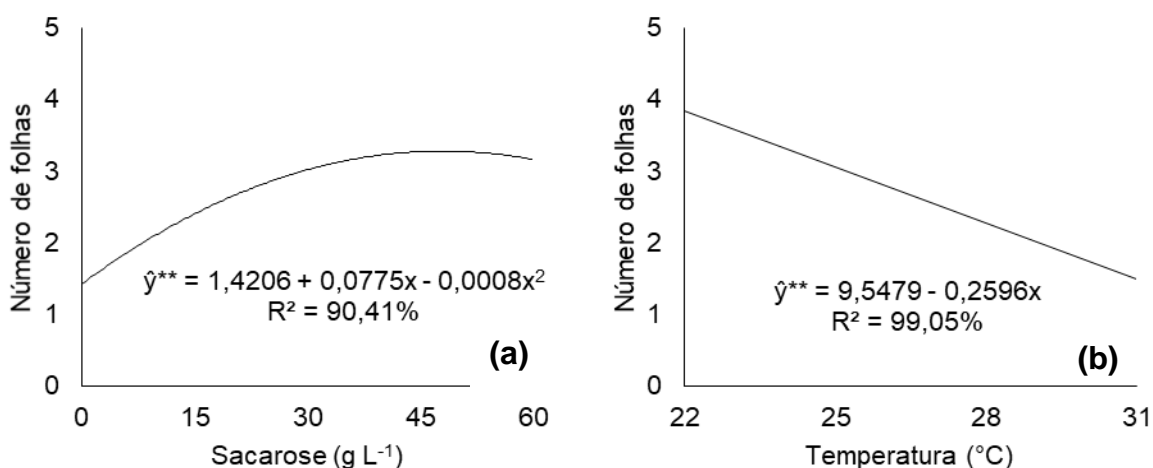


200
 201 A maior altura de planta (4,24 cm) foi observada na temperatura de 22 °C com
 202 a concentração de 30 g L⁻¹ de sacarose, havendo um decréscimo com o aumento da
 203 temperatura para todas as doses de sacarose estudadas (Tabela 3 e Figura 1b).

204 Esse resultado é superior ao encontrado por Simões *et al.* (2014) que, trabalharam
 205 na micropropagação de *Dioscorea rotundata* utilizando 30 g L⁻¹ de sacarose no meio
 206 de cultura e cultivando as plantas em sala de crescimento com temperatura de 27±1
 207 °C, obteve plantas com altura máxima de 2,75 cm.

208 Em relação ao efeito da sacarose sobre o NF, observou-se um comportamento
 209 quadrático (Figura 2a), em que o maior valor estimado foi de 3,53 folhas em
 210 resposta a uma dose ótima calculada de 48,44 g L⁻¹ de sacarose (Tabela 2). No
 211 entanto, apesar dos resultados mostrarem que o aumento na dose de sacarose é
 212 favorável ao aumento do número de folhas das plantas de “Inhame da Costa”
 213 cultivadas *in vitro*, deve-se levar em consideração que tal incremento não foi tão
 214 superior ao NF encontrado na dose de 30 g L⁻¹ de sacarose (3,01). Esses
 215 resultados corroboram com os obtidos por Ribeiro *et al.* (2009) que, trabalhando com
 216 copo de leite (*Zantedeschia aethiopica* L. Spreng), observaram maior número de
 217 folhas na presença de 37,3 g L⁻¹ de sacarose.

218 **Figura 2** - Número de folhas de ‘Inhame da Costa’ micropropagado em meio de
 219 cultura MS com diferentes concentrações de sacarose (a) e mantido em ambientes
 220 com distintas temperaturas (b) durante 90 dias.

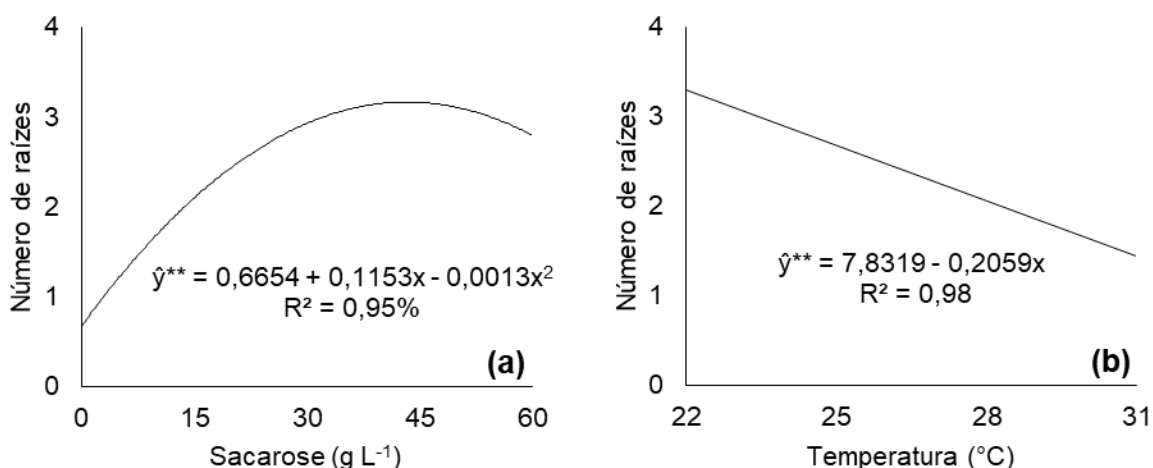


221 Observou-se um comportamento linear decrescente com o aumento da
 222 temperatura (Figura 2b), indicando que este fator, nas condições em que foi
 223 conduzido o experimento, pode ser limitante para o incremento do número de folhas
 224 nas plantas de ‘Inhame da Costa’ cultivadas *in vitro*, visto que as maiores médias
 225 para esta variável foram encontradas na menor temperatura (Tabela 3). Estes
 226 resultados diferem dos encontrados por Carvalho *et al.* (2016), que estudando o
 227 efeito de diferentes ambientes de cultivo na conservação *in vitro* de citros,
 228

229 encontraram o maior número de folhas no ambiente com temperatura mais elevada
 230 (27 ± 1 °C). Os resultados mostram que a temperatura do ambiente de cultivo
 231 influencia na formação de folhas, porém, a direção da resposta é intrínseca da
 232 espécie.

233 Foi possível estimar pela equação de regressão que a utilização de uma dose
 234 de $44,35 \text{ g L}^{-1}$ proporcionou maior número de raízes (3,12) (Tabela 2). Embora as
 235 concentrações de sacarose tenham mostrado uma resposta quadrática para o
 236 número de raízes, verificou-se que com 30 g L^{-1} de sacarose foi possível obter um
 237 número médio de raízes superior (3,24) ao valor estimado com $44,35 \text{ g L}^{-1}$ de
 238 sacarose (Figura 3a).

239 **Figura 3** - Número de raízes de ‘Inhame da Costa’ micropropagado em meio de
 240 cultura MS com diferentes concentrações de sacarose (a) e mantido em ambientes
 241 com distintas temperaturas (b) durante 90 dias.

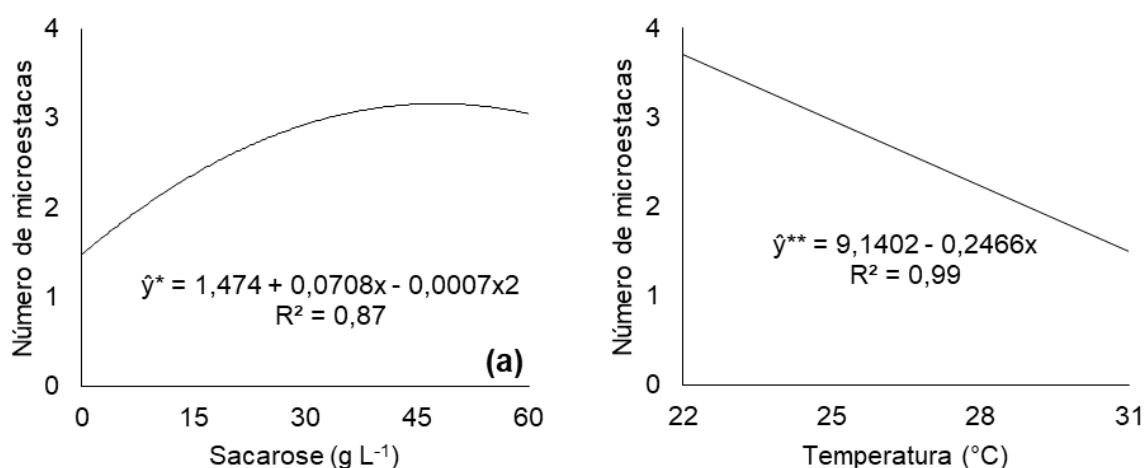


242 Segundo Ovono e Dommens (2007), concentrações de sacarose variando
 243 entre 3% e 8% no meio de cultura MS favorecem o aumento do número de raízes de
 244 plantas do complexo *Dioscorea cayenensis-rotundata*. Estes resultados também
 245 estão de acordo com os resultados encontrados por Rocha, Oliveira e Scivittaro
 246 (2013), que observaram as melhores respostas quanto ao enraizamento de cana-de-
 247 açúcar (RB 872552) com concentrações usuais (3%) de sacarose. De fato, o
 248 processo de rizogênese *in vitro* requer energia disponível ao explante, sendo esta,
 249 em sistemas heterotróficos ou mixotróficos, fornecida por uma fonte exógena de
 250 carboidratos (GEORGE, 1996). A sacarose contribui para o crescimento das raízes,
 251 pois atua na expansão e proliferação celular (WANG; RUAN, 2013).

253 Com aumento da temperatura houve uma diminuição significativa na
 254 quantidade de raízes, visto que, a maior média foi encontrada na temperatura de 22
 255 °C (3,30) e a menor na de 31 °C (1,50) (Tabela 3 e Figura 3b).

256 O NM em função das concentrações de sacarose indicou que o número
 257 máximo de microestacas estimado foi de 3,26 na dose de 50,57 g L⁻¹ de sacarose
 258 (Tabela 2 e Figura 4a), porém este resultado é muito parecido com o valor de 3,25
 259 microestacas, observado na dose de 30 g L⁻¹ de sacarose. Já em função da
 260 temperatura, o maior número de microestacas foi observado em plantas cultivadas
 261 em ambiente com temperatura de 22 °C (3,71) e o menor na temperatura de 31 °C
 262 (1,50), mostrando uma resposta linear decrescente dessa variável em função da
 263 temperatura (Tabela 3 e Figura 4b).

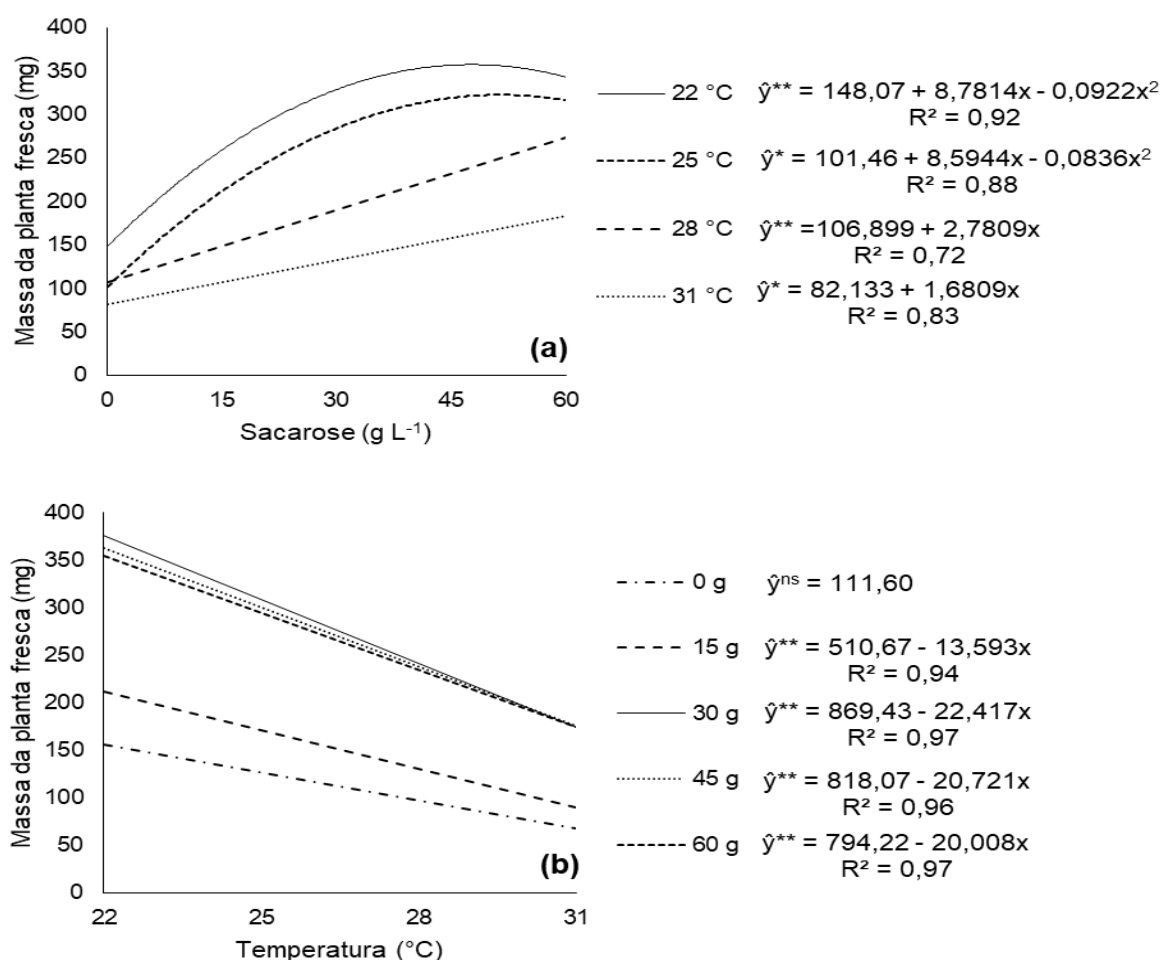
264 **Figura 4** - Número de microestacas de 'Inhame da Costa' micropropagado em meio
 265 de cultura MS com diferentes concentrações de sacarose (a) e mantido em
 266 ambientes com distintas temperaturas (b) durante 90 dias.



267 A temperatura de cultivo de 22 °C proporcionou a maior massa da planta fresca
 268 (357,16 mg) com a concentração ótima de 47,62 g L⁻¹ de sacarose. Na temperatura
 269 de 25 °C foi observado um comportamento quadrático parecido, com maior massa
 270 de planta fresca (322,34 mg) obtida na concentração de 51,40 g L⁻¹ de sacarose. Já
 271 para as temperaturas de 28 °C e 31 °C, observou-se um comportamento linear
 272 crescente com o aumento da concentração de sacarose (Tabela 2 e Figura 5a).
 273 Ribeiro *et al.* (2009), observaram que a elevação da concentração de sacarose de
 274 30 até 60 g L⁻¹ promoveu maior produção de massa fresca de parte aérea e raiz de
 275 copo de leite (*Zantedeschia aethiopica*) cultivadas *in vitro*. O aumento da produção
 276

277 de massa fresca das brotações para a cultura do marmeleiro (*Cydonia oblonga* Mill.)
 278 foi crescente até a concentração de 45 g L⁻¹ de sacarose (RIBEIRO *et al.*, 2015).

279 **Figura 5** - Massa da planta fresca de 'Inhame da Costa' micropropagado em meio
 280 de cultura MS com diferentes concentrações de sacarose (a) e mantido em
 281 ambientes com distintas temperaturas (b) durante 90 dias.

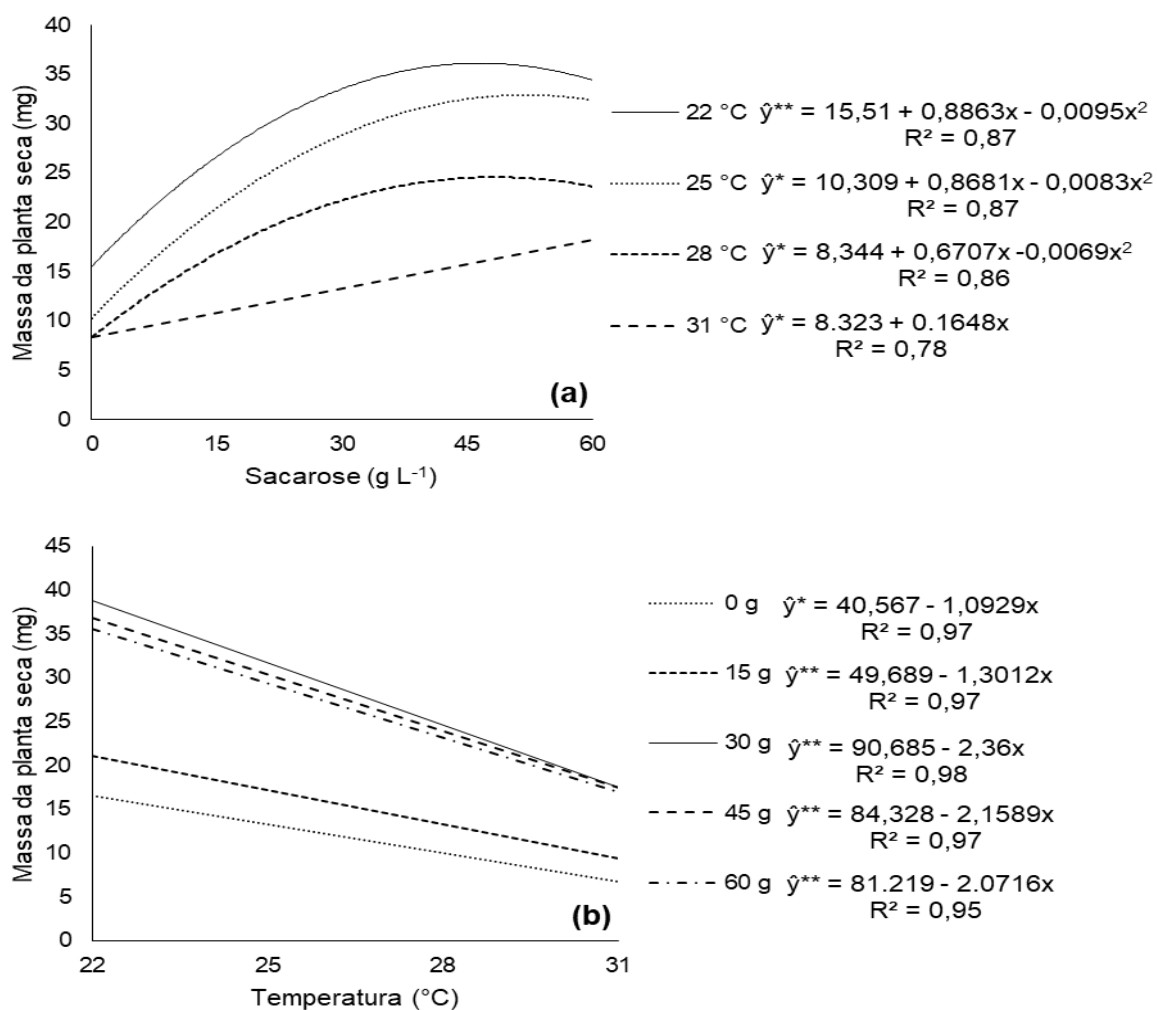


282
 283 Comportamento linear decrescente foi observado na característica massa da
 284 planta fresca para as doses de sacarose (15; 30; 45 e 60 g L⁻¹) com o aumento da
 285 temperatura. Para a ausência de sacarose não foi possível o ajuste de um modelo
 286 de regressão polinomial com alto R² para explicar a variação observada na
 287 característica MPF em função da temperatura do ambiente de cultivo (Tabela 3 e
 288 Figura 5b).

289 Maior MPS estimada (36,18 mg) foi obtida na temperatura de 22 °C, seguida da
 290 de 25 °C (33,01 mg) e da de 28 °C (24,64 mg) associadas a 46,65; 52,30 e 48,60 g
 291 L⁻¹ de sacarose, respectivamente (Tabela 2 e Figura 6a). Porém, houve pequeno

292 incremento nessa variável, com o aumento da concentração de sacarose de 30 para
 293 46,65 g L⁻¹. Resultados similares foram obtidos por Ribeiro *et al.*, 2015, quando se
 294 observou maiores valores de massa seca de brotações de marmeleiro utilizando 45
 295 g L⁻¹ de sacarose no meio de cultura.

296 **Figura 6** - Massa de planta seca de 'Inhame da Costa' micropropagado em meio de
 297 cultura MS com diferentes concentrações de sacarose (b) e mantido em ambientes
 298 com distintas temperaturas (a) durante 90 dias.



299
 300 Para a massa da planta seca foi verificado um comportamento linear
 301 decrescente para as doses de sacarose estudadas. O maior valor de massa de
 302 planta seca (38,77 mg) foi obtido com a concentração de 30 g L⁻¹ de sacarose na
 303 temperatura de 22 °C e o menor (7,07 mg) na ausência de sacarose e temperatura
 304 de 31 °C (Tabela 3 e Figura 6b).

305 Em relação as concentrações de sacarose, para todas as variáveis analisadas,
 306 as doses ótimas foram acima de 40 g L⁻¹. No entanto, os incrementos nas

307 características avaliadas não foram elevados quando comparados a concentração
308 comumente utilizada no cultivo *in vitro*, visando a micropropagação (30 g L⁻¹). Além
309 disso, no que se refere a temperatura, para todas as variáveis avaliadas,
310 independente da concentração de sacarose utilizada, a temperatura ótima foi 22°C
311 (Tabelas 2 e 3).

312 CONCLUSÃO

313 As plantas de 'Inhame da Costa' cultivadas *in vitro*, tiveram melhor
314 desenvolvimento em meio de cultura MS com 30 g L⁻¹ de sacarose e mantidas em
315 ambiente com temperatura de 22 °C.

316 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 317 AHANHANZO, C.; GANDONOU, CH. B.; AGBIDINOUKOUN, A.; DANSI, A.;
318 AGBANGLA, C. Effect of two cytokinins in combination with acetic acid α -
319 naphthalene on yams (*Dioscorea spp.*) genotypes' response to *in vitro*
320 morphogenesis. **African Journal of Biotechnology**, v.9, n.51, p.8837-8843, 2010.
- 321 BARRUETO CID, L. P.; TEIXEIRA, J. B. Explante, meio nutritivo, luz e temperatura.
322 In: BARRUETO CID, L. P. **Cultivo in vitro de plantas**. Brasília, DF: Embrapa
323 Informação Tecnológica, p.15-49, 2010.
- 324 BORGES, M.; DESTRADE, R.; MENESES, S.; GÓMEZ, R.; MALAURIE, B.;
325 HAMON, P. Y.; DEMENORVAL, L. Optimización de un medio de cultivo para plantas
326 micropropagadas de *Dioscorea alata* L. **Revista Colombiana de Biotecnología**,
327 v.13, n.2, p.221-228, 2011.
- 328 CARVALHO, M. J. S. **Adequação da condição de crescimento mínimo para a**
329 **conservação in vitro de germoplasma de citros**. Cruz das Almas-BA, 2013. 84 f.
330 Dissertação. (Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias). Universidade
331 Federal do Recôncavo da Bahia, 2013.
- 332 CARVALHO, M. J. S.; SOUZA, A. S.; SANTOS, E. B.; SOARES FILHO, W. S.;
333 LEDO, C. A. S.; SOUZA, F. V. D. Univariate and multivariate statistical tools for in
334 vitro conservation of citrus genotypes. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v.38, n.1,
335 p.129-137, 2016.
- 336 CUNHA, E. C. **Produção de mudas de inhame (*Dioscorea rotundata*) de alta**
337 **qualidade fitossanitária**. Cruz das Almas-BA, 2014. 54 f. Dissertação. (Programa
338 de Pós-Graduação em Ciências Agrárias). Universidade Federal do Recôncavo da
339 Bahia, 2014.

- 340 GEORGE, E. F. **Plant Propagation by Tissue Culture**. Part 2: In Practice.
341 Edington: Exegetics, 1361p. 1996.
- 342 GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A.;
343 CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de**
344 **plantas**. Brasília: EmbrapaSPI/ Embrapa CNPH, v.1, p.183-260, 1998.
- 345 JUNGHANS, T. G.; SOUZA, A. S. **Aspectos Práticos da Micropropagação de**
346 **plantas**. 2 ed. Brasília: Embrapa, 407 p. 2013.
- 347 MENEZES, T. P.; RODRIGUES, F. A.; ASMAR, S. A.; PASQUAL, M. Sacarose e
348 GA₃ na germinação de sementes e no desenvolvimento *in vitro* de plântulas de
349 goiabeira 'Pedro Sato'. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, v.6, n.2, p.69-75,
350 2010.
- 351 MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. A revised medium for a rapid growth and bioassays
352 with tobacco tissues cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-479, 1962.
- 353 HATFIELD, J. L.; PRUEGUER, J. H. Temperature extremes: Effect on plant growth
354 and development. **Weather and Climate Extremes**, v.10, p.4-10, 2015.
- 355 OLIVEIRA, A. P.; BARBOSA, L. J. N.; PEREIRA, W. E.; SILVA, J. E. L.; OLIVEIRA,
356 A. N. P. Produção de rizóforos comerciais de inhame em função de doses de
357 nitrogênio. **Horticultura Brasileira** v.25, p.79-82, 2007.
- 358 OLIVEIRA, A. P.; SILVA, D. F.; SILVA, J. A.; OLIVEIRA, A. N. P.; SANTOS, R. R.;
359 SILVA, N. V.; OLIVEIRA, F. J. M. Tecnologia alternativa para produção de túberas-
360 semente de inhame e seus reflexos na produtividade. **Horticultura Brasileira**, v.30,
361 p.553-556, 2012.
- 362 OVONO, P. O.; KEVERS, C.; DOMMES, J. Effects of reducing sugar concentration
363 on *in vitro* tuber formation and sprouting in yam (*Dioscorea cayenensis* – *D.*
364 *rotundata* complex). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.99, p.55-59, 2009.
- 365 R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. R
366 Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2016. Disponível em:
367 <http://www.R-project.org/>.
- 368 RIBEIRO, M. de N. O.; PASQUAL, M.; VILLA, F.; CAVALLARI, L. de L.
369 Desenvolvimento *in vitro* de copode-leite: efeito das concentrações de sacarose e de
370 ácido giberélico. **Semina: Ciências Agrárias**, v.30, n. 3, p.575-580, 2009.
- 371 RIBEIRO, M. de F.; RITTERBUSH, C. W.; BIANCHI, V. J.; PETERS, J. A. Fontes de
372 carbono na multiplicação *in vitro* de porta-enxertos de marmeleiro 'MC' w 'ADAMS'.
373 **Plant Cell Culture & Micropropagation**, v.11, n.2, p.54-61, 2015.

- 374 ROCHA, P. S. G.; OLIVEIRA, R. P.; SCIVITTARO, W. B. Sugarcane
375 micropropagation using light emitting diodes and adjustment in growth-medium
376 sucrose concentration. **Ciência Rural**, v.43 n.7, p. 1168-1173, 2013.
- 377 SANTOS, E. S.; CASÉ FILHO, J.; LACERDA, J. T.; CARVALHO, R. A. Inhame
378 (*Dioscorea sp.*) tecnologia de produção e preservação ambiental. **Tecnologia &**
379 **Ciência Agropecuária**, v.1, p.31-36, 2007.
- 380 SILVA NETO, H. P. da. **Produção de mudas e indução de brotação em túberas**
381 **de inhame submetido a defensivo e regulador de crescimento**. Dissertação
382 (Mestrado) -Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. Centro de Ciências
383 Agrárias, Ambientais e Biológicas, 2014.
- 384 SIMOES, K. da S. **Ajuste de protocolo para produção de mudas de inhame**
385 **(*Dioscorea rotundata* POIR.) *in vitro***. Cruz das Almas-BA, 2013. 111 p.
386 Dissertação. (Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias). Universidade
387 Federal do Recôncavo da Bahia, 2013.
- 388 SIMÕES, K. S.; LINO, L. S. M.; SOUZA, A. S.; SILVA, S. O.; LEDO, C. A. S.
389 Enraizamento de inhame em meios MS e carvão ativado. **Científica**, v.42, n.2,
390 p.164-169, 2014.
- 391 SOUZA, A. V. de; BERTONI, B. W.; FRANÇA, S. de C.; PEREIRA, A. M. S.
392 Micropropagação de *Discorea multiflora* Grised. **Ciência e Agrotecnologia**, v.35, n.
393 1, p.92-98, 2011.
- 394 WANG, L.; RUAN, Y. L. Regulation of cell division and expansion by sugar and auxin
395 signaling. **Frontiers in Plant Science**, v.30, n.4,p.1-9, 2013

ARTIGO 2

LUZ NATURAL NO CULTIVO *IN VITRO* E ACLIMATIZAÇÃO DE 'INHAME DA COSTA'¹

¹Artigo a ser ajustado para posterior submissão ao Comitê Editorial do periódico científico Horticultura Brasileira, em versão na língua portuguesa.

Luz natural no cultivo *in vitro* e aclimatização de 'Inhame da Costa'

RESUMO

A produção de mudas por meio da micropropagação tem sido estudada como forma de solucionar os problemas relacionados a propagação do inhame (*Dioscorea spp.*), porém o custo final da muda produzida pode inviabilizar a utilização dessa técnica na cadeia produtiva da espécie. Diante disso, objetivou-se com o presente trabalho, desenvolver uma forma alternativa de micropropagação de *Dioscorea rotundata*, utilizando-se luz natural na etapa de cultivo *in vitro* e aclimatização, visando melhoria na qualidade das mudas produzidas e assim possibilitar uma redução nos custos de produção. Microestacas de 'Inhame da Costa', inoculadas em frascos de vidro contendo o meio de cultura MS modificado, foram mantidas sob diferentes condições de cultivo (sala de conservação de germoplasma, sala de crescimento, estufa, casa de vegetação e telado) por um período de 90 dias. Após esse período, metade das plantas formadas foram avaliadas quanto à altura de planta, em cm (AP), número de brotos (NB), número de folhas verdes (NFV), número de folhas senescentes (NFS), número de microestacas (NM), número de raízes (NR), comprimento da maior raiz, em cm (CMR) e massa da planta fresca (MPF) e seca (MPS), em mg. Em sequência, o restante das plantas foi aclimatizado e avaliado, aos 60 dias após a aclimatização, quanto ao NFV, NFS, NR, CMR, NM, AP, massa fresca (MFPA) e seca (MSPA) da parte aérea, massa fresca (MFR) e seca (MSR) da raiz e número de túberas formadas (NTF). Foi também contabilizado o número de plantas sobreviventes. O melhor desenvolvimento *in vitro* e *ex vitro* foi observado nas plantas que foram cultivadas no telado. A luz natural foi favorável ao crescimento e desenvolvimento das plantas de 'Inhame da Costa' *in vitro* e *ex vitro*, sendo assim, pode ser uma alternativa viável para reduzir os custos de produção das mudas micropropagadas.

Palavras chave: *Dioscorea rotundata*, micropropagação, produção de mudas.

ABSTRACT

Natural light in the *in vitro* culture and acclimatization of 'Inhame da Costa'

The production of seedlings through micropropagation has been studied as a way to solve the problems related to the propagation of the yam (*Dioscorea spp.*), But the final cost of the seedlings produced may make it impossible to use this technique in the productive specimens chain. The objective of this work was to develop an alternative form of micro propagation for *Dioscorea rotundata*, using natural light in the *in vitro* cultivation and acclimatization stage, aiming at improving the quality of the seedlings produced and thus reducing production costs. 'Inhame da Costa' micro cuttings, inoculated in glass vials containing the MS culture medium, were kept under different culture conditions (germplasm conservation room, growth room, plant house, weaver and greenhouse) for a period of 90 days. After that period, half of the plants were evaluated for plant height, in cm (AP), number of shoots (NB), number of green leaves (NFV), number of senescent leaves (NFS), number of micro cuttings, number of roots (NR), length of the largest root, in cm (CMR), fresh plant mass (MPF) and dry matter (MPS) in mg. The remaining plants were acclimatized and evaluated 60 days after acclimatization for NFV, NFS, NR, CMR, NM, AP, fresh mass (MFPA) and dry matter (MSPA), (MFR) and dry (MSR) of the root and number of formed tubers (NTF). The number of surviving plants was also counted. The best *in vitro* and *ex vitro* development was observed in the plants grown on weaver. The natural light was favorable to the *in vitro* and *ex vitro* growth and development of 'Inhame da Costa' plants, and may be a viable alternative to reduce the production costs of micro propagated seedlings.

Key words: *Dioscorea rotundata*, micro propagation, seedlings production

INTRODUÇÃO

O principal problema ligado a cadeia produtiva de inhame (*Dioscorea spp.*) está relacionado a indisponibilidade de material propagativo de qualidade e o elevado custo das túberas semente existentes (Oliveira *et al.*, 2012). A solução para este problema tem sido buscada através das técnicas de cultura de tecidos, dentre as quais se destaca a micropropagação, que vem sendo utilizada com sucesso para a cultura (Souza *et al.*, 2011; Das *et al.*, 2013; Simões *et al.*, 2014).

A micropropagação apresenta inúmeras vantagens em relação aos métodos de propagação convencionais, permitindo a obtenção de um grande número de plantas em curto espaço de tempo, em qualquer época do ano e com boa qualidade genética e fitossanitária (Grattapaglia & Machado, 1998; Junghans & Souza, 2013). No entanto, sua utilização comercial na produção de mudas é limitada, principalmente, devido ao elevado custo para obtenção das mudas e a baixa eficiência na aclimatização (Erig & Schuch, 2005). Entre os fatores que oneram o preço final das mudas micropropagadas, se sobressai o gasto com infraestrutura e energia elétrica, uma vez que, convencionalmente, as plantas *in vitro* são mantidas em salas de crescimento com luz artificial e temperatura controlada (Agra *et al.*, 2009). Além disso, essa condição de cultivo pode causar diversas alterações morfofisiológicas em plantas cultivadas *in vitro*, que são responsáveis por grande parte das perdas durante a aclimatização (Dignart *et al.*, 2009).

Uma alternativa para minimizar este problema seria a utilização de ambientes de cultivo com luz natural, pois além de baratear o custo de produção das mudas, aumentaria a intensidade luminosa durante o crescimento *in vitro*. O aumento da intensidade luminosa tem influência nas respostas morfofisiológicas do vegetal, promovendo melhor diferenciação e organização dos tecidos e maior controle estomático, o que pode reduzir as perdas durante a fase de aclimatização (Erig & Schuch, 2005; Silva *et al.*, 2014; Ferrari *et al.*, 2016).

O emprego da luz natural no cultivo *in vitro* tem sido testado para promover diminuição dos custos de produção e aumento na taxa de sobrevivência das plantas durante a aclimatização (Dignart *et al.*, 2009). Contudo, é uma tecnologia ainda pouco utilizada, pois não são claros os efeitos do espectro e dos níveis de irradiância no crescimento das plantas *in vitro* (Braga *et al.*, 2011).

Neste contexto, objetivou-se com o presente trabalho, avaliar uma forma alternativa de micropropagação de *Dioscorea rotundata*, utilizando-se luz natural na etapa de cultivo *in vitro*, visando melhoria na qualidade e aclimatização das plantas e assim possibilitando uma redução nos custos de produção.

MATERIAL E MÉTODOS

No experimento foram utilizadas microestacas, com aproximadamente 1 cm de tamanho, de plantas de 'Inhame da Costa' previamente cultivadas *in vitro*

no Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, Bahia.

As microestacas foram inoculadas em câmara de fluxo laminar utilizando-se frascos de vidro com 30 mL do meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962), suplementado com 30 g/L de sacarose, acrescido de 100 mg/L de Inositol, 20 mg/L de cisteína, 0,20 mg/L de ácido naftalenoacético (ANA), 0,08 mg/L de ácido giberélico (GA3), 0,05 mg/L de benzilaminopurina (BAP), 1 g/L de carvão ativado, solidificado com 8 g/L de ágar e pH ajustado em 5,8 antes da autoclavagem.

Após a inoculação, as microestacas foram mantidas em cinco ambientes distintos: 1) sala de conservação de germoplasma; 2) sala de crescimento; 3) casa de vegetação climatizada, com sombrite de 50% de retenção de luz; 4) telado com sombrite de 70% de retenção de luz; e 5) estufa com temperatura controlada, nebulização e sem sombrite. A temperatura e luminosidade dos ambientes 3, 4 e 5 foram obtidas através de monitoramento com termômetro e luxímetro, nos horários de 9 h, 12 h e 15 h, a cada três dias, durante 90 dias. As características de cada ambiente, quanto a temperatura e luminosidade estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1. Luminosidade, temperatura e fotoperíodo dos ambientes de cultivo.

Ambiente	Luminosidade ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Fotoperíodo (h)
Sala de conservação	67,5	22 \pm 1	16
Sala de crescimento	65,5	27 \pm 1	16
Casa de vegetação	372,96	29 \pm 2	12
Telado	240,87	31 \pm 2	12
Estufa	684,13	27 \pm 2	12

O experimento foi instalado em um delineamento inteiramente casualizado com cinco tratamentos (ambientes de cultivo) e 40 repetições. Cada parcela experimental foi constituída de um frasco contendo uma microestaca, totalizando 200 frascos.

Aos 90 dias de cultivo *in vitro*, metade das plantas foi analisada quanto as seguintes variáveis: altura de planta, em cm (AP); número de brotos (NB); número de folhas verdes (NFV); número de folhas senescentes (NFS); número de microestacas (NM); número de raízes (NR); comprimento da maior raiz, em cm (CMR) e massa fresca (MPF) e seca (MPS) da planta em mg.

As plantas restantes (que não foram utilizadas para inferir a massa seca da planta) foram transplantadas para copos descartáveis de plástico transparente de 300 mL de volume para facilitar a visualização das raízes. Para drenar o excesso de água foi feito um furo no fundo do copo. Como substrato foi utilizado uma mistura comercial da marca Maxfertil. Após o transplante, as plantas foram cobertas com copos descartáveis que se encaixavam perfeitamente no copo transparente, a fim de manter a umidade durante a fase inicial da aclimatização. Ao passo que as raízes apareciam na lateral dos copos transparentes, o copo de cobertura era retirado. As plantas foram mantidas durante 60 dias em casa de vegetação com controle de temperatura, que era mantida em 29 ± 2 °C, e tela sombrite com 50% de retenção da radiação solar.

Ao final do período de aclimatização as plantas foram avaliadas quanto as características: AP, NFV, NFS, NM, NR, CMR, massa fresca (MFPA) e seca (MSPA) da parte aérea, massa fresca (MFR) e seca (MSR) da raiz e número de túberas formadas (NT). Foi também contabilizado o número de plantas sobreviventes.

Os dados obtidos foram submetidos ao teste F da análise de variância. As variáveis NFV, NFS, NM, NR e NT foram transformadas para $\sqrt{X + 0,5}$, visando o atendimento das pressuposições da análise de variância. As médias dos ambientes foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do programa estatístico R (R CORE TEAM, 2016).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Cultivo *in vitro*

O número de brotações e de microestacas foi maior para as plantas mantidas na casa de vegetação, estufa e no telado, com luz natural, do que nas salas de crescimento e conservação, com luz artificial (Tabela 2 e Anexo A), indicando que a luz natural teve influência positiva na taxa de multiplicação das plantas de 'Inhame da Costa' cultivadas *in vitro*. Dignart *et al.* (2009), também observaram que o número de brotos de *Cattleya walkeriana* Gardn foi maior sob luz natural do que sob o cultivo convencional com iluminação artificial. A melhoria na taxa de multiplicação das plantas pode estar relacionada com o aumento da

intensidade luminosa, que gera reduções nas concentrações de auxinas endógenas das gemas através da fotoxidação, provocando um deslocamento do balanço hormonal em direção as citocininas (Radmann *et al.*, 2001; Soontouchainaksaeng *et al.*, 2001).

Tabela 2. Valores médios do número de brotos (NB), número de folhas verdes (NFV), número de folhas senescentes (NFS), número de microestacas (NM), altura da planta (AP), em cm, e massa seca da planta (MSP), em mg, de plantas de 'Inhame da Costa' cultivadas *in vitro* em diferentes ambientes.

Ambiente	NB	NFV	NFS	NM	AP	MSP
Sala de conservação	1,0 b	8,15 b	0,25 b	5,45 c	3,37 c	30,60 ab
Sala de crescimento	1,2 b	7,15 b	0,30 b	5,65 c	3,99 bc	29,03 b
Casa de vegetação	3,45 a	15,25 a	4,85 a	13,70 b	4,35 b	34,13 ab
Telado	3,85 a	16,30 a	4,45 a	17,00 a	5,80 a	41,42 ab
Estufa	3,70 a	16,55 a	4,85 a	13,60 b	3,38 c	43,30 a
CV (%)	29,32	29,71	25,53	31,44	20,91	40,64

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

O telado foi o ambiente que proporcionou a maior média de altura de planta (5,8 cm), seguido pela casa de vegetação, com média de 4,35 cm. As menores médias foram obtidas na sala de conservação e na estufa, com 3,37 cm e 3,38 cm, respectivamente (Tabela 2). Borges *et al.* (2011) relataram que o maior crescimento de plantas de crisântemo *in vitro* foi obtido em plantas cultivadas em casa de vegetação com sombrite a 50%.

As maiores médias para o número de folhas verdes e senescentes foram observadas na casa de vegetação, estufa e telado, não havendo diferenças significativas entre elas (Tabela 2). Estes resultados reforçam as vantagens na utilização da luz natural em substituição a artificial, uma vez que, variáveis como altura da planta e número de folhas refletem uma morfologia normal e bom estado fisiológico, sendo assim, indicativos importantes para um sistema eficiente de micropropagação (Oliveira *et al.*, 2008).

Em relação a massa seca das plantas, a maior média foi observada nas plantas cultivadas na estufa, no entanto, essa não diferiu significativamente das plantas cultivadas no telado, na casa de vegetação e na sala de conservação (Tabela 2). O aumento da massa seca tem sido relatado em cultivo *in vitro* sob luz natural em abacaxi (Silva *et al.*, 2014), banana (Rocha *et al.*, 2007) e mandioca (Jorge *et al.*, 2001). Esse acúmulo de massa seca nos ambientes sob

luz natural, pode estar relacionado a um incremento na taxa fotossintética da planta, neste sistema, devido a maior intensidade luminosa. Ibaraki & Nozaki (2005) afirmam que se houver necessidade de desenvolver capacidade fotossintética nos tecidos, um dos fatores mais importantes que devem ser considerados é o ambiente de luz, especialmente a intensidade.

Aclimatização

Todas as plantas cultivadas *in vitro* na sala de conservação, casa de vegetação e telado sobreviveram à aclimatização. Os percentuais mais baixos de sobrevivência foram observados nas plantas que foram cultivadas *in vitro* na sala de crescimento e na estufa (Tabela 3).

Tabela 3. Porcentagem de sobrevivência das plantas de ‘Inhame da Costa’ cultivadas *in vitro* em diferentes ambientes e submetidas a aclimatização.

Ambiente de cultivo <i>in vitro</i>	Sobrevivência na aclimatização (%)
Sala de conservação	100
Sala de crescimento	90
Casa de vegetação	100
Telado	100
Estufa	80

As plantas cultivadas *in vitro* no telado, casa de vegetação e estufa apresentaram as maiores médias para o número de folhas verdes, número de raízes, comprimento da maior raiz e altura de planta, após 60 dias de aclimatização (Tabela 4). Além disso, tiveram também melhor desempenho quanto à massa fresca e seca da parte aérea e das raízes (Tabela 5). Por outro lado, as plantas cultivadas *in vitro* na sala de conservação e de crescimento apresentaram maior número de túberas formadas (Tabela 4 e Anexo B). Esses resultados demonstram que a utilização da luz natural durante o cultivo *in vitro* favorece o desenvolvimento das plantas de ‘Inhame da Costa’ durante a fase de aclimatização. Para Braga *et al.* 2010, uma das formas de facilitar o processo de aclimatização de propágulos cultivados *in vitro* seria aumentar a intensidade luminosa, promovendo a fotossíntese e melhorando as relações hídricas.

Tabela 4. Valores médios do número de folhas verdes (NFV), número de folhas senescentes (NFS), número de raízes (NR), comprimento da maior raiz (CMR), em cm, altura da planta (AP), em cm, e número de túberas formadas (NTF) de plantas de ‘Inhame da Costa’ cultivadas *in vitro* em diferentes ambientes, após 60 dias de aclimatizadas.

Ambiente	NFV	NFS	NR	CMR	AP	NTF
Sala de conservação	12,25 bc	1,85 a	17,45 ab	9,05 bc	6,57 ab	1,25 a
Sala de crescimento	7,26 c	2,68 a	14,94 b	7,05 c	5,66 b	1,36 a
Casa de vegetação	19,35 a	1,94 a	22,94 a	10,62 ab	6,70 ab	0,41 b
Telado	20,00 a	2,52 a	22,00 a	11,33 a	7,65 a	0,00 b
Estufa	16,75 ab	3,58 a	13,00 b	11,52 a	5,91 b	0,25 b
CV (%)	23,33	33,42	20,18	23,46	20,04	22,75

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 5. Valores médios de massa fresca (MFPA) e seca (MSPA) da parte aérea, em g, massa fresca (MFR) e seca (MSR) da raiz, em g, de plantas de ‘Inhame da Costa’ cultivadas *in vitro* em diferentes ambientes, após 60 dias de aclimatizadas.

Ambiente	MFPA	MSPA	MFR	MSR
Sala de conservação	1,54 a	0,18 a	0,68 a	0,06 abc
Sala de crescimento	0,85 b	0,09 b	0,31 b	0,04 c
Casa de vegetação	1,68 a	0,19 a	0,82 a	0,08 a
Telado	1,82 a	0,20 a	0,77 a	0,07 ab
Estufa	1,42 ab	0,16 ab	0,58 ab	0,05 bc
CV (%)	44,82	50,04	50,67	51,61

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Diante desses resultados, vale destacar que o comportamento observado nas características de crescimento avaliadas no cultivo *in vitro* foi semelhante ao observado após a aclimatização, confirmando a hipótese que a utilização de luz natural durante o cultivo *in vitro* favorece não só o desenvolvimento das plantas *in vitro*, mas também a transição das plantas para condição *ex vitro*, reduzindo as perdas e melhorando o desenvolvimento das plantas. Sendo assim, a luz natural na etapa de cultivo *in vitro* possui potencial para reduzir os custos da produção de mudas micropropagadas de ‘Inhame da Costa’.

CONCLUSÕES

As plantas de 'Inhame da Costa' apresentaram melhor crescimento e desenvolvimento *in vitro* e *ex vitro* quando cultivadas sob luz natural, principalmente nas condições de telado utilizadas neste trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRA PFM; SANTOS MS; BARROS HMM; COSTA CMGR; COSTA NP; NETO AP. 2009. Influência de ambientes e concentrações de sacarose na micropropagação de violeta africana em diferentes tempos de cultivo. *Tecnologia & Ciência Agropecuária* 3: 73-76.
- BORGES DI; OLIVEIRA MC; PENONI ES; PADUA TRP; BRAGA FT; PASQUAL M. 2011. Micropropagação de crisântemo (*Dendranthema grandiflora* Tzevele cv. Rage) sob luz natural e artificial em diferentes concentrações do meio de cultivo. *Plant Cell Culture & Micropropagation* 7: 9-16.
- BRAGA FT; PASQUAL M; DE CASTRO EM; DIGNART LS; RAFAEL GC; NUNES CF. 2010. Luz natural e sistemas de vedação na propagação *in vitro* de crisântemo cv. Rage: alterações anatômicas e fisiológicas. *Plant Cell Culture & Micropropagation*. 6: 83-89.
- BRAGA FT; PASQUAL M; DE CASTRO EM; RAFAEL GC. 2011. Características morfofisiológicas de abacaxizeiro 'gomo de mel' enraizado *in vitro* sob luz natural e substrato vermiculita. *Revista Brasileira de Fruticultura* 33: 551-557.
- DAS S; CHOUDHURY MD; MAZUMDAR PB. 2013. Micropropagation of *Dioscorea alata* L. through nodal segments. *African Journal of Biotechnology* 12(47): 6611-6617.
- DIGNART LS; CASTRO EM; PASQUAL M; FERRONATO A; BRAGA FT; PAIVA R. 2009. Luz natural e concentrações de sacarose no cultivo *in vitro* de *Cattleya walkeriana*. *Ciência e Agrotecnologia* 33: 780-787.
- ERIG AC; SCHUCH MW. 2005. Micropropagação fotoautotrófica e o uso da luz natural. *Ciência Rural* 35: 961-965.
- FERRARI MP de S; ANTONIAZZI D; NASCIMENTO AB; FRANZ LF; BEZERRA CS; MAGALHÃES HM. 2016. Espectros luminosos no desenvolvimento de plântulas de *Curcuma longa* cultivadas *in vitro*. *Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR* 19: 247-251.

- GRATTAPAGLIA D; MACHADO MA. 1998. Micropropagação. In: TORRES AC; CALDAS LS; BUSO JA (eds). *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica/Embrapa Hortaliças. p. 183-260.
- IBARAKI Y; NOZAKI Y. 2005. Estimation of light intensity distribution in a culture vessel. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 80: 111-113.
- JORGE MAB; ROBERTSON AI; MASHINGAIDZE AB; KEOGH E. 2001. Distinguishing the effects of light and temperature variations on the growth, development, multiplication potential and *ex vitro* survival rates of *in vitro* cassava. *Annals of Applied Biology* 138: 363-370.
- JUNGHANS TG; SOUZA AS. 2013. *Aspectos Práticos da Micropropagação de plantas*. 2 ed. Brasília: Embrapa, 407 p.
- OLIVEIRA AP; SILVA DF; SILVA JA; OLIVEIRA ANP; SANTOS RR; SILVA NV; OLIVEIRA FJM. 2012. Tecnologia alternativa para produção de túberas-semente de inhame e seus reflexos na produtividade. *Horticultura Brasileira* 30: 553-556.
- OLIVEIRA MKT; NETO FB; CÂMARA FA; DOMBROSKI JLD; FREITAS RMO. 2008. Multiplicação *in vitro* de batata-doce (*Ipomoea batatas* Lam). *Revista Caatinga* 21: 129-134.
- R CORE TEAM. R. 2016. A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Disponível em: <http://www.R-project.org/>.
- RADMANN EB; BRAGA EJB; KARAN MAL; POSADA MAC; PETERS JA. 2001. Influência da densidade de fluxo luminoso na qualidade de plantas micropropagadas de *Gypsophila paniculata* L. *Revista Brasileira de Agrociências* 7: 171-175.
- ROCHA HS; SILVA CRR; ARAUJO AG; SILVA AB. 2007. Propagação *in vitro* de bananeira Prata Anã (AAB): intensidades luminosas e concentrações de sacarose nas fases de multiplicação e enraizamento. *Plant Cell Culture & Micropropagation* 3: 10-16.
- SCONTOUNCHAINAKSAENG P; CHAICHAROEN S; SIRIJUNTARUT M; KRUATRACHUE M. 2001. *In vitro* studies on the effect of light intensity on plant growth of *Phainus tankervilleae* (banks ex L' Herit) Bl. and *Vanda coerulea* Griff. *Science Asia* 27: 233-237.

- SIMÕES KS; LINO LSM; SOUZA AS; SILVA SO; LEDO CAS. 2014. Enraizamento de inhame em meios MS e carvão ativado. *Científica* 42:164-169.
- SILVA AB; CORREA VRS; TOGORO AH; SILVA JAS. 2014. Efeito da luz e do sistema de ventilação natural em abacaxizeiro (Bromeliaceae) micropropagado. *Bioscience Journal* 30: 380-386.
- SOUZA AV; BERTONI BW; FRANÇA SC; PEREIRA AMS. 2011. Micropropagação de *Discorea multiflora* Grised. *Ciência e Agrotecnologia* 35: 92-98.
- TORRES AC; CALDAS LS. 1998. *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica/Embrapa Hortaliças. 509 p.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em culturas de propagação vegetativa, como o inhame, um dos grandes problemas é a qualidade fitossanitária das mudas, pois uma muda contaminada vai disseminar pragas e doenças entre os plantios. Esse problema pode ser amenizado a partir do uso de técnicas de micropropagação, para a produção de mudas de alta qualidade fitossanitária. Porém, embora a literatura mencione formas de micropropagar inhame (SOUZA et al., 2011; SIMÕES, 2013), não há nenhuma referência sobre produção de mudas micropropagadas de *Dioscorea rotundata* em escala comercial, para serem usadas por produtores.

Um dos fatores que limitam a utilização da micropropagação na produção de mudas em escala comercial é o alto custo para sua obtenção, que se devem principalmente, entre outros fatores, ao elevado custo de funcionamento das salas de crescimento com regime de luz artificial e temperatura controlada, onde as culturas *in vitro* são normalmente incubadas.

No presente trabalho, buscou-se avaliar e adequar as condições do ambiente de cultivo na micropropagação de *Dioscorea rotundata*, a fim de melhorar a qualidade e diminuir o custo final da muda produzida.

O primeiro artigo abordou os efeitos que a temperatura, assim como a concentração de sacarose podem ter no desenvolvimento das plantas *in vitro* e como se poderia adequar esses fatores para um melhor desenvolvimento das plantas sob condições artificiais de luminosidade. Os resultados obtidos mostraram que as plantas cultivadas em meio MS suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose e incubadas em ambiente com temperatura de 22 °C foram mais eficientes para o desenvolvimento das plantas *in vitro*.

No segundo artigo buscou-se comparar o efeito de ambientes com iluminação natural e artificial no desenvolvimento *in vitro* e na aclimatização de plantas de 'Inhame da Costa'. Os resultados deste experimento demonstraram que a utilização de luz natural no cultivo *in vitro* de inhame é uma alternativa viável, que tem potencial para reduzir os custos de produção das mudas micropropagadas.

Desse modo, os resultados deste estudo indicam novas possibilidades para o desenvolvimento de um sistema de micropropagação de *Dioscorea rotundata* com o uso de ambiente natural no cultivo *in vitro*, o que pode viabilizar a inserção dessa técnica na cadeia produtiva do inhame e incentivar novas pesquisas de protocolos envolvendo técnicas alternativas de cultivo *in vitro* com o objetivo de melhorar e diminuir o custo final da muda produzida.

Não foi gerada uma técnica para produção de mudas micropropagadas, no entanto, foram geradas informações básicas de grande utilidade para outros trabalhos com esse objetivo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

SIMOES, K. da S. **Ajuste de protocolo para produção de mudas de inhame (*Dioscorea rotundata* POIR.) *in vitro***. Cruz das Almas-BA, 2013. 111 f. Dissertação. (Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias). Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2013.

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

ANEXOS

ANEXO A: Plantas de 'Inhame da Costa' cultivadas *in vitro* em sala de conservação de germoplasma (a), sala de crescimento (b), casa de vegetação (c), telado (d) e estufa (e) após 90 dias.



ANEXO B: Plantas de 'Inhame da Costa' cultivadas *in vitro* em sala de conservação de germoplasma (a), sala de crescimento (b), casa de vegetação (c), telado (d) e estufa (e) após 60 dias de aclimatização.

