

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Instituto De Biologia
Programa De Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal



Dissertação

Cultivo in Vitro de Batata-Doce

Daniele de Souza Masiero

Pelotas, 2017

Daniele de Souza Masiero

Cultivo in Vitro de Batata-Doce

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal do Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Fisiologia Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. José Antônio Peters

Coorientador: Dr. Leonardo Ferreira Dutra

Pelotas, 2017

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

M394c Masiero, Daniele de Souza

Cultivo in vitro de batata-doce / Daniele de Souza Masiero ; José Antônio Peters, Leonardo Ferreira Dutra, orientadores. — Pelotas, 2017.

79 f.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, 2017.

1. Ipomoea batatas. 2. Sacarose. 3. Biorreator. 4. Qualidade luminosa. I. Peters, José Antônio, orient. II. Dutra, Leonardo Ferreira, orient. III. Título.

CDD : 633.492

Daniele de Souza Masiero

Cultivo in Vitro de Batata-Doce

Dissertação aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Mestre em Fisiologia Vegetal, Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 27 de junho de 2017.

Banca Examinadora:

Dr. Leonardo Ferreira Dutra (Coorientador), doutor em Agronomia pela Universidade Federal de Pelotas.

Dr^a. Daiane de Pinho Benemann, doutora em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas.

Prof^a. Dr^a. Luciana Bicca Dode, doutora em Biotecnologia Agrícola pela Universidade Federal de Pelotas.

A meus pais e minha irmã, por suportarem minha
ausência e fornecer todo apoio durante esse período.

DEDICO.

Agradecimentos

A meu pai Valmor e minha mãe Enir, pela dedicação extrema em garantir minha educação, pelos exemplos, pelo amor, carinho, preocupação e apoio incondicional, assim como meus avós e tios por sempre me incentivarem e acreditarem na minha capacidade. A minha irmã Franciele por toda amizade, companheirismo e apoio ao longo dos anos. A minha filha de 4 patas, por me acompanhar durante toda trajetória da vida acadêmica alegrando meus dias.

A Universidade Federal de Pelotas pela oportunidade, a todos os professores do programa de Pós-graduação em Fisiologia Vegetal, por todos os ensinamentos e ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Prof. Dr. Peters, principal responsável pela concretização deste trabalho, orientador na maneira mais expressiva que se pode imaginar, meu eterno agradecimento por sua orientação, ensinamentos e incentivo, assim como pela amizade construída, que pretendo levar ao longo da vida.

A Liana e o Maurício por todo auxílio durante as inúmeras instalações do biorreator e pela amizade sem igual. Ao meu coorientador Dr. Leonardo Ferreira Dutra, pela oportunidade, incentivo e confiança em mim depositada desde a graduação. Assim como todo pessoal do Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Clima Temperado, que além de colegas de trabalho maravilhosos, se mostraram amigos para todas as horas, especialmente ao Antônio Nino e a Ju durante os experimentos e a Lê por todo apoio nas análises estatísticas e na formulação da dissertação e momentos de desespero.

Aos melhores amigos que alguém pode ter, pelo companheirismo, apoio e por tudo que passamos juntos, em especial a Daiane, Rauny, Arthur B., Arthur S., Gregori, Rodrigo, Lucas por toda companhia nas horas alegres e complicadas, todas as conversas, cervejas e risadas, principalmente pela amizade sem medida, que pretendo preservar ao longo do tempo. Especialmente a Kaka, Catrine e Natasha por todos esses anos de amizade e cumplicidade, por não me deixarem desistir e acreditarem em mim, que nossa amizade perdure ao longo da vida e que ainda possamos comemorar muitas conquistas em conjunto.

Obrigada por tudo!

Resumo

MASIERO, Daniele de Souza. **Cultivo in vitro de batata-doce**. 2017. 81f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, Departamento de Botânica, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2017.

O cultivo in vitro é uma importante ferramenta para a propagação da batata-doce e diferentes fatores podem interferir na exequibilidade desta técnica, como a composição do meio de cultura e o microambiente no qual as plantas são expostas. O presente estudo teve como objetivo avaliar o desempenho das cultivares BRS Amélia, BRS Cuia e BRS Rubissol de batata-doce, cultivadas in vitro em duas concentrações de sacarose, duas combinações de espectro luminoso e dois sistemas de cultivo. Para isso o trabalho foi dividido em três experimentos: no primeiro, testou-se duas concentrações de sacarose em biorreator de imersão temporária configurado na combinação de espectro vermelho e branco; no segundo utilizou-se duas concentrações de sacarose em biorreator de imersão temporária configurado na combinação de espectro vermelho e azul; no terceiro, testou-se duas concentrações de sacarose em meio semissólido configurado na combinação de espectro vermelho e branco. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2x3: duas concentrações de sacarose (15g L^{-1} ou 30g L^{-1}) e 3 cultivares (BRS Amélia, BRS Cuia e BRS Rubissol). As variáveis analisadas foram: comprimento de parte aérea, número médio de folhas, número e comprimento de raízes, número e comprimento de brotações, índices de clorofila *a*, *b* e *total* e porcentagem de aclimatização. Para os três experimentos o uso de 30g L^{-1} de sacarose no meio de cultivo resultou nas maiores médias em todas as variáveis analisadas e a cultivar BRS Cuia foi a que apresentou o melhor desempenho nas condições estudadas. No sistema semissólido foi possível verificar um grande número e comprimento de raízes, enquanto que no sistema de imersão temporária foi verificada presença de brotações em todas as cultivares e maiores médias de comprimento de parte aérea. Concluiu-se que a concentração de 30g L^{-1} de sacarose no meio de cultura proporciona taxas satisfatórias de crescimento e aclimatização das três cultivares em estudo, sendo recomendada para a micropropagação da espécie. A combinação de espectro luminoso vermelho e azul proporciona maior comprimento de parte aérea, número de folhas e comprimento de raiz quando comparado ao espectro vermelho e branco. A 'BRS Rubissol' tem melhor desempenho no sistema convencional, a 'BRS Amélia' no sistema de imersão temporária, enquanto a 'BRS Cuia' desenvolve-se igualmente independente do sistema de cultivo utilizado.

Palavras-chave: *Ipomoea batatas*; sacarose; biorreator; qualidade luminosa.

Abstract

MASIERO, Daniele de Souza. **In vitro culture of sweet potato**. 2017. 81f. Dissertation (Master Degree in Plant Physiology) – Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, Departamento de Botânica, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2017.

In vitro cultivation is an important tool for the propagation of sweet potatoes and different factors may interfere with the feasibility of this technique, such as the composition of the culture medium and the microenvironment in which the plants are exposed. The objective of this study was to evaluate the performance of BRS Amélia, BRS Cuia and BRS Rubissol sweet potato cultivars grown in vitro in two concentrations of sucrose, two combinations of light spectrum and two cultivation systems. For the work in division in three experiments: in the first, two concentrations of sucrose in temporary immersion bioreactor configured in the combination of red and white spectrum were tested; In the second, two concentrations of sucrose in a temporary immersion bioreactor configured in the combination of red and blue spectrum are used; In the third, two concentrations of sucrose in semisolid medium configured in the red and white spectrum combination were tested. The experimental design was completely randomized in a factorial 2x3: two concentrations of sucrose (15g L^{-1} or 30g L^{-1}) and 3 cultivars (BRS Amélia, BRS Cuia and BRS Rubissol). The analyzed variables were: shoot length, number of leaves, number and length of roots, number and length of buds, chlorophyll a, b and total rate and percentage of acclimatization. For the three experiments, the use of 30g L^{-1} of sucrose in the culture medium resulted in the highest averages in all analyzed variables and the cultivar BRS Cuia was the one that presented the best performance under the conditions studied. In the semisolid system it was possible to verify a large number and length of roots, whereas in the temporary immersion system, the presence of sprouts was verified in all the cultivars and larger averages of shoot length. It was concluded that the concentration of 30g L^{-1} of sucrose in the culture medium provides satisfactory rates of growth and acclimatization of the three cultivars under study, being recommended for the micropropagation of the species. The combination of red and blue light spectrum provides greater shoot length, number of leaves and root length when compared to the red and white spectrum. 'BRS Rubissol' performs better in the conventional system, 'BRS Amélia' in the temporary immersion system, while 'BRS Cuia' is also developed independent of the culture system used.

Keywords: *Ipomoea batatas*; Sucrose; Bioreactor; Light quality.

Lista de Figuras

Figura 1	Cultivares de batata-doce, lançadas pela Embrapa Clima Temperado, em 2011. (A) 'BRS Amélia'; (B) ' BRS Cuia'; (C) 'BRS Rubissol'. Fonte: Portal da Embrapa, 2011.....	18
Figura 2	Sistema de imersão temporária. (A) Conjunto montado no fluxo laminar, frasco contendo meio de cultura, ligado pela mangueira de silicone a outro frasco contendo os explantes de batata-doce; (B) Biorreator comercial contendo conjuntos (BIT20 da Tecnal®). Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 2017.....	27
Figura 3	Diagrama dos tempos programados para a passagem do meio de cultura para o frasco contendo os explantes e da volta do mesmo para seu frasco de origem. Pelotas-RS, 2017.....	28
Figura 4	Médias dos parâmetros morfológicos das cultivares de batata-doce BRS Amélia, BRS Cuia e BRS Rubissol, nas concentrações de 15 e 30g L ⁻¹ de sacarose no meio de cultivo em biorreator de imersão temporária sob espectro vermelho e branco. Pelotas-RS, 2017.....	31
Figura 5	Médias dos parâmetros morfológicos das cultivares de batata-doce BRS Amélia, BRS Cuia e BRS Rubissol, nas concentrações de 15 e 30g L ⁻¹ de sacarose no meio de cultivo em biorreator de imersão temporária sob espectro vermelho e branco. Pelotas-RS, 2017.....	34
Figura 6	Plantas de batata-doce cultivadas in vitro. (A) Plantas transplantadas para casa de vegetação; (B) Plantas de batata-doce cultivar BRS Cuia, cultivadas em 30g L ⁻¹ de sacarose, após 35 dias em casa de vegetação. Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 2017.....	38
Figura 7	Médias dos parâmetros morfológicos das cultivares de batata-doce BRS Amélia, BRS Cuia e BRS Rubissol, nas concentrações de 15 e 30g L ⁻¹ de sacarose no meio de cultivo em biorreator de imersão temporária sob espectro vermelho e azul. Pelotas-RS, 2017.....	41
Figura 8	Presença de brotações em plantas de batata-doce 'BRS Cuia', 'BRS Amélia' e 'BRS Rubissol', cultivadas em biorreator de imersão temporária, na concentração de 30g L ⁻¹ de sacarose no meio de cultivo. Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 2017.....	44

Figura 9	Médias dos parâmetros morfológicos das cultivares de batata-doce BRS Amélia, BRS Cuia e BRS Rubissol, nas concentrações de 15 e 30g L ⁻¹ de sacarose no meio de cultivo em biorreator de imersão temporária sob espectro vermelho e azul. Pelotas-RS, 2017.....	45
Figura 10	Plantas de batata-doce cultivadas in vitro em meio semissólido: (A) 'BRS Amélia', (B)'BRS Cuia' e (C) 'BRS Rubissol' contendo 15g L ⁻¹ de sacarose; (D) 'BRS Amélia', (E) 'BRS Cuia' e (F) 'BRS Rubissol' contendo 30g L ⁻¹ de sacarose. Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 2017.....	52

Lista de Tabelas

Tabela 1	Porcentagem de aclimatização de três cvs. de plantas de batata-doce, cultivadas em biorreator de imersão temporária, sob combinação de espectro vermelho e branco, submetidas a duas concentrações de sacarose (15 e 30g L ⁻¹).....	36
Tabela 2	Comprimento da parte aérea, número médio de folhas por planta e comprimento médio de raízes, de plantas de batata-doce, previamente cultivadas em BIT na combinação de espectro vermelho e branco, em duas concentrações de sacarose, após 35 dias de aclimatização.....	37
Tabela 3	Índice de Clorofila A, B e total em folhas de batata-doce, das cultivares BRS Amélia, BRS Cuia e BRS Rubissol, cultivadas em sistema de imersão temporária na combinação do espectro vermelho e branco sob duas concentrações de sacarose no meio de cultivo, após aclimatização.....	39
Tabela 4	Comprimento da parte aérea (CPA), número de folhas, número de raízes, comprimento médio de raízes (CMR), número de brotações, comprimento médio de brotações (CMB), massa fresca e massa seca total (g) de plantas de batata-doce cvs. BRS Amélia, BRS Cuia e BRS Rubissol, cultivadas em biorreator de imersão temporária, em duas concentrações de sacarose (15 e 30g L ⁻¹), sob espectro luminoso vermelho e azul.....	40
Tabela 5	Índice de Clorofila (Clh) A, B e total em folhas de batata-doce, das cultivares BRS Amélia, BRS Cuia e BRS Rubissol, cultivadas em sistema de imersão temporária na combinação do espectro vermelho e azul, sob duas concentrações de sacarose no meio de cultivo (15 e 30g L ⁻¹).....	46
Tabela 6	Porcentagem de aclimatização de três cvs. de plantas de batata-doce, cultivadas em biorreator de imersão temporária, sob combinação de espectro vermelho e azul, submetidas a duas concentrações de sacarose 15 e 30g L ⁻¹	47

Tabela 7	Comprimento da parte aérea, número médio de folhas por planta e comprimento médio de raízes, de plantas de batata-doce, previamente cultivadas em BIT na combinação de espectro vermelho e azul, em duas concentrações de sacarose (15 e 30g L ⁻¹), após 35 dias de aclimatização.....	48
Tabela 8	Índice de Clorofila (Clh) A, B e total em folhas de batata-doce, das cultivares BRS Amélia, BRS Cuia e BRS Rubissol, cultivadas em sistema de imersão temporária na combinação do espectro vermelho e azul sob duas concentrações de sacarose no meio de cultivo (15 e 30g L ⁻¹), após aclimatização.....	49
Tabela 9	Comprimento da parte aérea (CPA), número médio de folhas por planta (NMF) e número médio de raízes (NMR), de plantas de batata-doce cvs. BRS Amélia, BRS Cuia e BRS Rubissol, cultivadas em meio de cultivo semissólido, sob espectro luminoso vermelho e branco em duas concentrações de sacarose (15 e 30g L ⁻¹).....	51
Tabela 10	Comprimento médio de raízes, massa fresca total e massa seca total, de plantas de batata-doce cvs. BRS Amélia, BRS Cuia e BRS Rubissol, cultivadas em meio de cultivo semissólido, sob espectro luminoso vermelho e branco em duas concentrações de sacarose (15 e 30g L ⁻¹).....	53
Tabela 11	Índice de Clorofila A, B e total em folhas de batata-doce, das cultivares BRS Amélia, BRS Cuia e BRS Rubissol, cultivadas em meio semissólido na combinação do espectro vermelho e branco sob duas concentrações de sacarose no meio de cultivo (15 e 30g L ⁻¹).....	55
Tabela 12	Porcentagem de aclimatização de três cvs. de plantas de batata-doce, cultivadas em meio semissólido, sob combinação de espectro vermelho e branco, submetidas a duas concentrações de sacarose (15 e 30g L ⁻¹).....	56
Tabela 13	Comprimento da parte aérea, número médio de folhas por planta e comprimento médio de raízes, de plantas de batata-doce, previamente cultivadas em meio de cultivo semissólido, na combinação de espectro vermelho e branco, em duas concentrações de sacarose.....	57
Tabela 14	Índice de Clorofila (Clh) A, B e total em folhas de batata-doce, das cultivares BRS Amélia, BRS Cuia e BRS Rubissol, cultivadas em meio de cultivo semissólido na combinação do espectro vermelho e branco sob duas concentrações de sacarose no meio de cultivo (15 e 30g L ⁻¹), após aclimatização.....	57

Sumário

1	Introdução.....	14
2	Revisão de Literatura.....	15
2.1	Origem, importância e cultivo da batata-doce.....	15
2.2	Cultivares de batata-doce.....	17
2.3	Cultivo in vitro da batata-Doce.....	18
2.4	Meio de cultivo.....	20
2.4.1	Carboidratos no meio de cultura.....	20
2.5	Influência da luz no cultivo in vitro.....	21
2.6	Biorreator de imersão temporária no cultivo in vitro.....	23
3	Material e Métodos.....	25
3.1	Experimento 1: Concentrações de sacarose e espectro vermelho e branco no cultivo de batata-doce em biorreator de imersão temporária.....	26
3.2	Experimento 2: Concentrações de sacarose e espectro vermelho e azul no cultivo de batata-doce em biorreator de imersão temporária.....	28
3.3	Experimento 3: Concentrações de sacarose e espectro vermelho e branco no cultivo de batata-doce em sistema de micropropagação convencional.....	29
4	Resultados e discussão.....	30

4.1	Experimento 1: Concentrações de sacarose e espectro vermelho e branco no cultivo de batata-doce em biorreator de imersão temporária.....	30
4.2	Experimento 2: Concentrações de sacarose e espectro vermelho e azul no cultivo de batata-doce em biorreator de imersão temporária.....	40
4.3	Experimento 3: Concentrações de sacarose e espectro vermelho e branco no cultivo de batata-doce em sistema de micropropagação convencional.....	49
5	Conclusões.....	58
6	Considerações finais.....	59
7	Referências.....	60
8	Anexos.....	80

1 Introdução

Ipomoea batatas L., popularmente conhecida como batata-doce, é uma hortaliça de grande importância econômica dentro da família *Convolvulaceae*, sendo amplamente utilizada na alimentação animal e humana. Além disso, recentemente vem despertando o interesse da indústria bioenergética (WOOLFE, 1992; SILVA et al., 2002; MAGALHÃES, 2012; VETORRAZZI, 2016).

A principal forma de propagação dessa espécie é por meio de multiplicação vegetativa de ramos e raízes tuberosas. No entanto, esse método favorece a disseminação de doenças fúngicas, bacterianas e viróticas, as quais podem prejudicar o desenvolvimento, reduzir o tamanho das raízes tuberosas e a capacidade multiplicativa das plantas, levando à desuniformidade nos plantios e à baixa produtividade (GARCIA et al., 1989; HUAMÁN, 1992; CORRÊA et al., 2003). Sendo assim, a cultura de tecidos é uma ferramenta imprescindível para o desenvolvimento e aprimoramento do cultivo de batata-doce, possibilitando selecionar e multiplicar materiais genéticos livres de vírus e outros patógenos, a fim de produzir mudas de qualidade, permitindo o aumento da produção e solucionando os problemas encontrados na multiplicação vegetativa incluindo a degenerescência (BARRUETO, 2001; SILVA et al., 2011).

Visando aumentar a eficiência das técnicas de propagação *in vitro* e em reduzir custos de produção, vários estudos vêm sendo desenvolvidos envolvendo a manipulação e o controle das condições de cultivo. Dentre os sistemas estudados, o biorreator de imersão temporária tem sido utilizado como alternativa ao método convencional de micropropagação, visto que possibilita um número maior de explantes por recipiente; permite a aeração dos frascos eliminando gases nocivos ao crescimento; minimiza a manipulação da cultura e conseqüentemente a mão de obra envolvida; assim como os riscos de contaminação do material, levando à redução dos gastos em relação ao sistema tradicional (ZHU et al., 2005, DUTRA et al., 2009, FERREIRA JÚNIOR, 2015).

Todavia, assim como no sistema convencional, o sucesso da técnica depende de diversos fatores como genótipo, fitorreguladores, meio de cultivo e luz. A luz é considerada um dos fatores relevantes no cultivo *in vitro*, pois regula a morfogênese vegetal e atua como fonte de energia no processo fotossintético (CASSANA et al., 2007; ZANANDREA et al., 2009). Em relação a esse fator, não apenas a presença

ou ausência de luz é importante no desenvolvimento das plantas, mas também a variação da intensidade e da qualidade de mesma interferindo na morfogênese das plantas. Normalmente as condições de iluminação da sala de cultivo, bem como a aeração dentro dos frascos, não são adequadas para que seja realizada fotossíntese in vitro, assim, as plantas dependem de uma fonte exógena de carbono para seu crescimento (CALDAS et al, 1998; TORRES et al., 2001). Diante disso, a sacarose é o carboidrato mais utilizado no meio de cultura, devido a sua fácil solubilidade, podendo ser acumulada nas plantas, resultando em maior taxa de sobrevivência das plantas ex vitro, porém, se adicionada em alta concentração, pode afetar o potencial osmótico do meio e acarretar estresse hídrico, além de diminuir a competência fotossintética das plantas (SOUZA, 1995; SEON, 2000).

Diante da inexistência de um padrão a ser seguido, uma vez que a concentração ideal de sacarose a ser adicionada ao meio de cultura pode variar entre e dentro da mesma espécie, e da escassez de trabalhos publicados sobre cultivo in vitro de batata-doce, carecendo de referências atuais, o presente estudo teve como objetivo avaliar o desempenho das cultivares BRS Amélia, BRS Cuia e BRS Rubissol de batata-doce, cultivadas in vitro em diferentes concentrações de sacarose, variadas combinações de espectro luminoso e em dois sistemas de cultivo. Adicionalmente, não foram verificados estudos usando LEDs na combinação dos espectros vermelho e branco e vermelho e azul, para o cultivo in vitro de batata-doce, bem como trabalhos publicados envolvendo o uso de biorreatores e as cultivares utilizadas o que torna o presente trabalho de grande relevância para a propagação in vitro dessa espécie.

2. Revisão Bibliográfica

2.1 Origem, importância e cultivo da Batata- doce (*Ipomoea batatas* L.)

A espécie *Ipomoea batatas* pertence à família *Convolvulaceae*, a qual reúne cerca de 1700 espécies (AUSTIN, 1987). Segundo evidências arqueológicas, linguísticas e históricas a batata-doce é originária das Américas Central e do Sul, tendo como centros de diversificação desde a Península de Yucatan no México até a Colômbia, onde há relatos de que seu uso remonta mais de dez mil anos (WOOLFE, 1992).

É uma planta dicotiledônea, com crescimento geralmente rasteiro, sendo a principal espécie de valor comercial da família *Convolvulaceae* no Brasil (DAROS et al., 2002). Apresenta folhas e ramos de tamanho, cor e pilosidade variáveis (EDMOND; AMMERMAN, 1971, THOMPSON et al., 1997). A espécie exibe flores hermafroditas de fecundação cruzada, devido ao mecanismo de autoincompatibilidade, a polinização geralmente é feita por insetos, favorecendo a variabilidade genotípica da cultura (OLIVEIRA et al., 2002). Devido a isso, além das diferenças observadas nos ramos e folhas, as raízes tuberosas, também apresentam várias colorações de película externa e polpa, além de diversos formatos e tamanhos (JONES, 1967; HUAMÁN, 1992).

De acordo com a FAO (2016), a batata-doce é um dos principais cultivos alimentares, representando a sétima cultura mais produzida no mundo, a China é o maior produtor mundial sendo responsável por 82% da produção total, enquanto o Brasil representa apenas 0,30%. O estado do Rio Grande do Sul o principal produtor nacional, com aproximadamente 166 mil toneladas (Anuário Brasileiro de Hortaliças, 2016).

A batata-doce é considerada boa fonte de carboidratos, fibras, minerais (cálcio, ferro, magnésio e potássio), vitaminas (B1, B2, C e E) e antioxidantes (SUDA et al., 1999). Cerca de 80% de sua matéria seca são carboidratos, favorecendo a utilização para alimentação humana e animal (WOOLFE, 1992). Se comparada a outras culturas, como arroz e milho, a batata-doce é mais eficiente na produção de energia produzida por unidade de área e tempo, sendo capaz de sustentar mais indivíduos por hectare do que as demais espécies, bem como crescer em diversas condições ambientais, sendo de alta adaptabilidade em condições marginais de cultivo (WOOLFE, 1992; SILVA et al., 2002; PESTANA, 2011).

Devido às suas características e valor nutricional, na África e na Ásia, milhares de pessoas dependem da batata-doce para a segurança alimentar (LOEBENSTEIN, 2009; ZHANG et al., 2009). Também no nordeste do Brasil, em virtude da limitação na disponibilidade de outros alimentos em períodos críticos de estiagem prolongada, a espécie assume grande importância social (MAGALHÃES, 2012). Além disso, seu alto nível energético despertou a atenção da National Aeronautics and Space Administration (NASA), sendo escolhida como um dos alimentos fornecidos aos astronautas em missões espaciais (BOVELL-BENJAMIN, 2007; JHA, 2010).

Além da utilização na alimentação humana e animal, o cultivo de batata-doce apresenta potencial para a produção de biomassa voltada para a fabricação de biocombustível, o que pode levar ao fortalecimento do seu cultivo pela agricultura familiar (VETORRAZZI, 2016). Cerca de oito toneladas de batata-doce fresca podem produzir em torno de uma tonelada de bioetanol. Estados como o Rio Grande do Sul, Paraná e Tocantins já apresentam iniciativas voltadas à geração de etanol de batata-doce (Anuário Brasileiro de Hortaliças, 2016).

Apesar da sua importância, por ser um cultivo rústico e pouco exigente, são raros os investimentos voltados à cultura, dessa forma as plantações normalmente são estabelecidas via multiplicação vegetativa de ramos e raízes tuberosas (GARCIA et al., 1989; HUAMÁN, 1992). No entanto, esse método favorece a disseminação de doenças fúngicas, bacterianas e viróticas, as quais podem interferir no desenvolvimento das plantas, reduzir o tamanho das raízes e a capacidade multiplicativa, levando à desuniformidade nos plantios e baixa produtividade (CORRÊA et al., 2003). Além disso, o material de propagação pode sofrer degenerescência ocasionada pelo acúmulo de doenças, principalmente de natureza virótica (SILVA et al., 1991).

2.2 Cultivares de Batata-doce

Algumas instituições, centros de pesquisa e universidades mantêm bancos de germoplasma de batata-doce, com a função de conservar a diversidade genética seja *ex situ* ou *in situ* (BORÉM; MIRANDA, 2005). O maior banco de germoplasma de batata-doce está localizado na Índia e conta com 3073 acessos, sendo 70% variedades locais, seguido pela Indonésia com 1155 acessos, sendo que 200 destes são mantidos *in vitro*. No Brasil, a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), possui o maior banco ativo de germoplasma de batata-doce do país, com cerca de 600 acessos na Embrapa Hortaliças – Brasília/GO (EMBRAPA, 2015).

A Embrapa Clima Temperado, Pelotas/RS, também contribui com o banco ativo de germoplasma da cultura, possuindo mais de 50 acessos, dentre eles três cultivares lançadas pela instituição em 2011: 'BRS Amélia', 'BRS Cuia' e 'BRS Rubissol', as quais se destacam em relação à produtividade. Enquanto a média nacional é de 8t ha⁻¹, estas produzem em média mais de 32t ha⁻¹.

A cultivar BRS Amélia (Fig. 1a), foi selecionada a partir de plantas provenientes da região de São Lourenço do Sul (RS). Sua produtividade média é de 32t ha⁻¹. Destaca-se pela aceitação do mercado consumidor, devido ao sabor e a cor da polpa, de um alaranjado intenso e uma textura úmida, macia e extremamente doce. Representa uma importante fonte de carotenoides, precursores de vitamina A (CASTRO et al., 2011).

A BRS Cuia (Fig. 1b), apresenta boas características de mercado e potencial produtivo, com produtividade média de 40 t ha⁻¹, chegando a 60 t ha⁻¹ quando as condições são favoráveis. O tamanho das raízes tuberosas é relativamente grande, evidenciando sua importância para a produção de etanol, visto que possui características químicas favoráveis, como alto teor de amido (CASTRO et al., 2012a).

A cultivar RS Rubissol (Fig.1c) foi selecionada a partir de plantas provenientes da região de Pelotas, RS. Produz em média 40t ha⁻¹ em área experimental e destaca-se pela uniformidade das batatas. Apresenta características para consumo in natura e também pode ser utilizada no processamento industrial. Desperta atenção pela coloração púrpura da casca e polpa levemente amarelada quando crua (CASTRO et al., 2012b).



Figura 1. Cultivares de batata-doce, lançadas pela Embrapa Clima Temperado, em 2011. (A) 'BRS Amélia'; (B) 'BRS Cuia'; (C) 'BRS Rubissol'.
Fonte: Portal da Embrapa, 2011.

2.3 Cultivo in vitro da Batata-Doce

A cultura de tecidos vegetais é uma técnica com grandes aplicações na agricultura, na qual pequenos fragmentos de tecido vivo, denominados explantes, são isolados de um organismo vegetal, desinfestados e cultivados, assepticamente,

por períodos indefinidos (TORRES et al., 2001). A técnica baseia-se no princípio da totipotência, proposto pelo fisiologista Haberlandt, o qual relata que cada célula vegetal possui potencial genético para regenerar uma planta inteira (CALDAS, 1998). É alternativa para a produção de mudas em larga escala, que tem possibilitado a obtenção e multiplicação de plantas com alta qualidade fitossanitária e confiabilidade genética, sendo bem estabelecida para diversas espécies (ASSIS, 1999, PEREIRA; FORTES, 2013).

Apresenta-se como importante ferramenta para o desenvolvimento e, aprimoramento, na cultura da batata-doce, possibilitando seleção e multiplicação de material genético livres de vírus e outros patógenos para produção de mudas de qualidade, além de promover uniformização da colheita, proporcionando aumento da produção (SILVA et al., 2011). Além disso, a tecnologia da micropropagação pode apresentar outras vantagens em relação aos métodos tradicionais de propagação, principalmente por requerer pouco espaço físico, apresentar maior rapidez regenerativa e ser realizada durante todo o ano, independente da estação, facilitando a propagação de espécies onde as tecnologias convencionais são difíceis ou até mesmo impossíveis de serem realizadas (GEORGE, 1996; COUTO, 2003).

Segundo Carvalho (2011), o explante mais adequado, para permitir que as plantas obtidas herdem as mesmas características das plantas matrizes, é o meristema, um tecido formado por células pluripotentes, envolvido na síntese protoplasmática e na formação de novas células por divisão mitótica. A região meristemática apresenta-se como a mais efetiva na limpeza de viroses, devido ao rápido crescimento do tecido, dificultando a penetração de partículas virais, e a falta de ligação direta com os feixes vasculares da planta-matriz (OLIVEIRA et al., 2008, ALAM, 2013). Na cultura da batata-doce a eliminação de partículas virais pode ser feita por meio do cultivo de meristemas de 0,2 a 0,6mm de comprimento em meio básico MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), suplementado com fitorreguladores (auxinas, citocininas e giberelinas) (ALVES, 1988; SOUZA, 1990).

Embora o cultivo *in vitro* da batata-doce represente grande importância para a obtenção de plantas saudáveis, principalmente livres de vírus são poucos os trabalhos publicados a respeito e carecem referências atuais (GARCIA et al. 1989; SOUZA, 1990; ALVES, 1998; OLIVEIRA et al., 2008), além disso, não foram verificados trabalhos focados nas cultivares em estudo.

2.4 Meio de cultivo in vitro

O sucesso da técnica de micropropagação in vitro é altamente dependente da escolha do meio de cultivo, pois através dele, tecidos e órgãos são supridos com macronutrientes, micronutrientes e outros produtos orgânicos essenciais para o crescimento e desenvolvimento in vitro (CAMPOS, 2002). Suas propriedades físicas e/ou químicas, além de inúmeros fatores podem variar a fim de atender a peculiaridades inerentes às diversas espécies (CIRILLO et al., 2003). Devido às singularidades observadas nas plantas, o meio nutritivo deve ser ajustado para cada genótipo ou cultivar em estudo (CASTRO; ANDRADE, 1995). O cultivo da batata-doce costuma ser realizado em meio nutritivo isento de fitorreguladores (OLIVEIRA et al., 2008). Contudo, dependendo do tipo de explante ou da cultivar utilizada, pode haver a necessidade de adição de reguladores ou outros suplementos a fim de favorecer a produção de mudas (SIVPARSAD; GUBBA, 2012; OLIVEIRA et al., 2013; ALAM, 2013).

2.4.1 Carboidratos no meio de cultivo

Um fator de extrema importância na composição do meio de cultivo é a adição de uma fonte exógena de carbono a fim de possibilitar o crescimento e desenvolvimento do explante, já que o sistema tradicional de cultivo não costuma fornecer um ambiente adequado para a presença da autotrofia (BARRUETO, 2001). Segundo Souza (1995), a presença de carboidratos no meio é imprescindível, visto que, fornecem energia metabólica e esqueletos carbônicos para a biossíntese de aminoácidos, proteínas e polissacarídeos estruturais, como a celulose.

A fonte mais comum de carboidratos utilizada no cultivo in vitro é a sacarose, considerada a principal fonte de carbono devido a sua grande solubilidade e rápida metabolização, já que os produtos de sua hidrólise (glicose e frutose) são utilizados na via glicolítica ou na rota das pentose-fosfato (PASQUAL, 2001).

No entanto, quando a sacarose é adicionada em alta concentração, o potencial osmótico do meio pode acarretar estresse hídrico, com perdas de hidratação dos tecidos na condição in vitro (SOUZA, 1995). Além disso, as plantas crescidas em um meio contendo sacarose podem exibir baixa competência

fotossintética quando comparadas com plantas crescendo in vivo, visto que os níveis de carboidratos normalmente usados em cultura de tecidos podem inibir a síntese de clorofila e reduzir a atividade da Rubisco, devido ao acúmulo de açúcares solúveis na folha, proporcionando a formação de amido no cloroplastídeo (CAPELLADES et al., 1991; SEON et al., 2000).

Estudos fisiológicos afirmam a diminuição das concentrações de carboidratos adicionados ao meio de cultivo ocasiona, nas plantas in vitro, maior crescimento e área foliar em relação àquelas cultivadas na concentração usual de sacarose (2-3%), resultando em taxa de aclimatização mais eficiente (LEE et al., 1985; KOZAI et al., 1997; VINTERHALTER et al., 2001). De acordo com Marin e Gella (1998), as plantas cultivadas em meio de cultivo com redução de sacarose apresentam maior eficiência na troca do metabolismo heterotrófico (com dependência total de uma fonte externa de carbono) para o metabolismo fotoautotrófico (com dependência total de fotossíntese) no ambiente ex vitro. Dessa forma, a redução, ou, até mesmo, a eliminação da sacarose do meio de cultura pode ser utilizada com a finalidade de facilitar a passagem das plantas para o ambiente ex vitro, bem como diminuir os gastos durante o cultivo in vitro e as chances de contaminação (SEON et al., 2000).

Por outro lado, autores relacionam as melhores taxas de sobrevivência ex vitro com meio de cultivo acrescido com concentrações superiores de sacarose (3-4%), visto que o suprimento exógeno de açúcar irá fornecer a energia que o explante necessita para que haja a indução, diferenciação e crescimento de tecidos e órgãos, assim como pode ampliar as reservas de amido nas plantas micropropagadas, favorecendo sua aclimatização e acelerando as adaptações fisiológicas (KADLECEK et al., 2001; HAZARIKA, 2003). Sendo assim, é necessário um controle do meio de cultura, de acordo com a espécie a ser estudada, a fim de adequar as condições in vitro, com o objetivo de aproximá-las ao máximo do ambiente ex vitro, otimizando a fase de aclimatização das plantas obtidas.

2.5 Influência da luz no cultivo in vitro

Normalmente as plantas cultivadas in vitro apresentam comportamento heterotrófico, já que mesmo possuindo o aparato fotossintético, demonstram baixa atividade fotossintética, devido às características comuns nos sistemas

convencionais de cultivo, como a limitada concentração de CO₂ nos frascos, a presença de carboidrato no meio e a baixa intensidade luminosa verificada nas salas de crescimento (KOZAI et al., 2005). Assim, o aumento da concentração de CO₂ no interior dos frascos, concomitantemente com a modificação do fluxo de fótons nas câmaras de crescimento e a diminuição de açúcares no meio de cultura, poderia favorecer a fotossíntese in vitro, resultando em um avanço significativo na produção de plantas nesse sistema (FERREIRA JÚNIOR, 2015).

Sabe-se que a luz tem função direta e indireta no crescimento e desenvolvimento das plantas, sendo que suas respostas morfofisiológicas estão relacionadas tanto com a presença/ausência quanto a variação da qualidade luminosa (MARTINS, 2006; TAIZ; ZEIGER, 2009). Além dos efeitos na fotossíntese, a intensidade luminosa mostra-se diretamente associada ao surgimento de brotações, crescimento e multiplicação dos explantes e a formação de raízes. Com isso, deve-se levar em consideração a irradiância, o fotoperíodo e a qualidade da luz utilizada no cultivo (ALMEIDA, 2001; HARTMANN et al., 2011).

Nas salas de crescimento, são comumente utilizadas lâmpadas fluorescentes, as quais não são ideais para o crescimento vegetal, já que as mesmas apresentam diferentes comprimentos de ondas (350 a 750nm) e, geralmente, emitem luz branca de similaridade espectral entre as bandas, o que afeta o desenvolvimento das plantas, principalmente, por meio de alterações fotomorfogênicas (BULA et al., 1991, REZENDE et al., 2008). Atualmente os diodos emissores de luz (LEDs), são uma fonte luminosa de interesse para os laboratórios de cultivo de plantas in vitro, já que possuem características mais avançadas do que as lâmpadas fluorescentes e incandescentes (YEH; CHUNG, 2009). São monocromáticos, o que permite que apenas o comprimento de onda específico requerido seja fornecido, facilitando o controle das respostas que se deseja obter (PINTO, 2008), apresentam pequena massa e volume, geram menos calor, não interferindo no controle da temperatura da sala de cultivo, e embora a instalação apresente valores superiores quando comparado às demais fontes, em longo prazo o custo é reduzido, já que o consumo de energia é baixo e a durabilidade elevada (SEABROOK, 2005; ROCHA et al., 2010; GUPTA; JATOTHU, 2013; ROCHA et al., 2013).

Os LEDs azuis e os vermelhos apresentam picos de comprimentos de onda de 450nm e 660nm, respectivamente, justamente dentro da faixa associada ao maior desenvolvimento vegetal (YEH; CHUNG, 2009). A luz vermelha está

relacionada ao alongamento do caule, florescimento, alterações na condutância estomática, controle de genes ligados à fotossíntese, codificando a síntese de clorofilas a e b e pequenas subunidades da Rubisco (SMITH, 1995; DALE, 1988; SCHUERGER et al., 1997; NIEMI et al., 2005). Já a luz azul, está associada com a inibição no crescimento do hipocótilo, o fototropismo e a indução de expressão gênica na síntese de pigmentos, enzimas, desenvolvimento de cloroplastídeos, abertura e fechamento estomático, ativação do ritmo circadiano da fotossíntese e quebra da dominância apical (SILVA; DEBERGH, 1997; SCHUERGER et al., 1997; SILVA et al., 2007).

Assim como todos os fatores que influenciam o desenvolvimento e o crescimento de uma planta, a resposta à qualidade de luz também depende da espécie e a cultivar em questão. Desta forma, estudos relativos à luz no cultivo in vitro, são extremamente importantes, a fim de conhecer o seu envolvimento em determinadas variáveis do desenvolvimento e promover ajustes na técnica, principalmente, quando se trata do seu uso em escala comercial (MORINI, 2003; SKIN et al., 2008; CARVALHO, 2011; ROCHA et al., 2010). A utilização de LEDs no cultivo in vitro tem proporcionado ajustes consideráveis nessa área, visto que por meio da utilização de espectros específicos, é possível selecionar características desejáveis para o seu sucesso (SKIN et al. 2008).

2.6 Biorreator de Imersão Temporária no Cultivo in Vitro

Associado aos fatores citados anteriormente, o sistema de cultivo também irá interferir no crescimento e no desenvolvimento das plantas. Dentre eles estão os biorreatores de imersão temporária (BITs), que são equipamentos baseados na utilização de meio líquido para a produção em escala comercial do material vegetal, estando relacionados com o aumento de biomassa combinado a redução do tempo de cultivo (DUTRA et al., 2009; PENCHEL et al., 2007). Esse aumento da biomassa pode ser explicado pela maior superfície de contato do explante com o meio de cultivo, aumentando sua capacidade de absorção dos nutrientes, bem como pela maior aeração, proporcionando a renovação da atmosfera gasosa no interior dos frascos, prevenindo o acúmulo de gás carbônico e etileno e auxiliando na diminuição

da hiperidricidade (PEREIRA et al., 2003, MCALISTER et al., 2005, RODRIGUES et al., 2006, VASCONCELOS et al., 2012).

Além de possibilitar a remoção dos gases eliminados pelas plantas, os quais podem ter efeito inibidor ao crescimento, a renovação do CO₂ do recipiente pode proporcionar incremento no nível de fotossíntese in vitro, desde que a luminosidade seja adequada para tal processo (WATT, 2012). No biorreator de imersão temporária o meio de cultura é bombeado de um reservatório para o frasco de cultivo em intervalos determinados experimentalmente e repetidos em um ciclo de 24 horas, o que faz com que a anoxia seja evitada e o meio possa ser substituído mais facilmente (GEORGIEV et al. 2014; WILKEN et al., 2014).

O sistema é dotado de um compressor de ar que, quando acionado, injeta ar de um dos lados do sistema, passando através da mangueira e de um filtro de 0,22 µm, para dentro do frasco fazendo com que a diferença de pressão direcione o meio de cultura, através da mangueira que liga os frascos, para o recipiente contendo os explantes, o qual permanecerá durante o tempo adotado de acordo com a espécie. Após, o compressor é novamente acionado e dessa vez o ar é injetado no frasco contendo os explantes, fazendo com que o meio de cultura retorne ao recipiente inicial (RECH, 2004).

O uso de biorreatores tem sido aplicado como alternativa ao método convencional de micropropagação e apresenta vantagens como: número maior de explantes por recipiente; a automação do sistema permite a diminuição da manipulação da cultura e, conseqüentemente, da mão de obra e riscos de contaminação do material, proporcionando uma redução dos custos em relação ao sistema tradicional (ZHU et al., 2005, DUTRA et al., 2009). Além disso, o sistema está relacionado à redução da dominância apical, estimulando o crescimento de brotações laterais. Sendo assim, o BIT aparece como opção tecnológica economicamente interessante e automatizada para produção em escala comercial das espécies de interesse (OLIVEIRA et al., 2011; MOREIRA et al., 2013).

O sistema de imersão temporária surgiu como uma forma de combinar as vantagens dos meios semissólido e líquido. No sistema convencional o meio de cultura semissólido não proporciona total contato com os nutrientes do meio, enquanto que o meio de cultura líquido permite uma eficiente nutrição, mas o contato do explante ao meio líquido deve ser temporário a fim de evitar a anóxia e a

presença de hiperhidricidade, que prejudica o crescimento das culturas, assim como a sobrevivência *ex vitro* (SMITH; SPOOMER, 1995).

Segundo Feuser (2003), um dos maiores benefícios comprovados para o sistema de imersão temporária está no aumento significativo da multiplicação, cerca de 20 vezes maior quando comparado a métodos convencionalmente utilizados e aproximadamente a metade das taxas de variação somaclonal encontradas no sistema estacionário de micropropagação. Já foram obtidos resultados satisfatórios da utilização de BIT em diversas culturas, a maioria em uso para escala comercial de produção de mudas, como: abacaxi (LORENZO, 2001; FEUSER, 2000); bananeira (LEMOS, 2001); cana-de-açúcar (LORENZO, 1998); bromélia (RECH, 2003), no entanto não foram encontradas referências envolvendo batata-doce.

3. Material e Métodos

3.1 Obtenção do Material Vegetal

O trabalho foi conduzido no laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Clima Temperado, Pelotas (RS). O material vegetal utilizado foi obtido de plantas matrizes de batata-doce, do banco ativo de germoplasma (BAG) da Embrapa Clima Temperado, cultivadas em casa de vegetação. As cultivares utilizadas nos experimentos foram: BRS Amélia, BRS Cuia e BRS Rubissol.

As plantas foram estabelecidas *in vitro* via cultura de meristemas. Para este procedimento os ramos apicais foram coletados, lavados em água corrente e desinfestados por imersão em álcool 70% por um minuto, solução de hipoclorito de sódio 2% por 20 minutos e três enxágues em água destilada esterilizada, em fluxo laminar. Os meristemas foram excisados com auxílio de lupa e inoculados em tubos de ensaio contendo meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) semissólido, acrescido de 30g L⁻¹ de sacarose, 100mg L⁻¹ de mio-inositol, 5mg L⁻¹ de ácido giberélico (GA₃), 0,05mg L⁻¹ de ácido indolacético (AIA) e 0,5mg L⁻¹ de cinetina (Kin), 7 g L⁻¹ de ágar e pH ajustado em 5,8. O meio de cultura foi esterilizado a 121°C e 1,5 atm, durante 15 minutos.

Após a inoculação, o material foi transferido para sala de crescimento, inicialmente na ausência de luz por sete dias e após sob luz fluorescente branca-fria, com densidade de fluxo de fótons de 36 μmol m⁻² s⁻¹, com fotoperíodo de 16 horas e

temperatura de $24\pm 2^{\circ}\text{C}$, por 45 dias. As brotações desenvolvidas a partir dos meristemas foram multiplicadas em meio MS acrescido de 30g L^{-1} de sacarose, 100mg L^{-1} de mio-inositol, 7g L^{-1} de ágar e mantidas em sala de crescimento nas mesmas condições (densidade de fluxo de fótons e temperatura) citadas anteriormente, onde permaneciam 30 dias até o novo subcultivo.

3.2 Experimentos

O trabalho foi dividido em três experimentos. No primeiro, testou-se duas concentrações de sacarose (15 e 30g L^{-1}) em biorreator de imersão temporária configurado na combinação de espectro vermelho e branco; no segundo experimento, utilizou-se duas concentrações de sacarose (15 e 30g L^{-1}) em biorreator de imersão temporária configurado na combinação de espectro vermelho e azul; no terceiro, testou-se duas concentrações de sacarose (15 e 30g L^{-1}) em meio semissólido configurado na combinação de espectro vermelho e branco.

3.2.1 Experimento 1 – Concentrações de sacarose e espectro vermelho e branco no cultivo de batata-doce em biorreator de imersão temporária

Foram utilizados explantes apicais com cerca de 20mm de comprimento e três gemas axilares, multiplicadas in vitro. Para a montagem do sistema de imersão temporária, botijões descartáveis de água mineral de 5 litros, foram previamente desinfestados, passando por uma lavagem com água e sabão, álcool 70% por dois minutos e hipoclorito de sódio 2,5% durante cinco minutos.

No dia da inoculação dos explantes os frascos foram submetidos a hipoclorito de sódio a 0,1%, seguido da tríplice lavagem com água esterilizada, em fluxo laminar. Concomitante a esta operação, foi realizada a desinfestação dos frascos para acomodar o meio de cultura, o qual foi constituído pelo meio MS convencional, sem adição do agente solidificante, 100mg L^{-1} de mio-inositol, 5mg L^{-1} de GA_3 + $0,05\text{mg L}^{-1}$ de cinetina + $0,1\text{mg L}^{-1}$ AIA. O pH foi corrigido para a faixa de 5,8.

Após o preparo, o meio foi transferido para frascos âmbar e submetido à esterilização por autoclavagem durante 20 minutos a 121°C e 1,5atm, seguindo-se

de repouso durante um dia, a fim de evitar a deformação dos botijões pela ação do calor excessivo.

Vinte explantes foram inoculados nos frascos destinados as culturas e 50mL de meio por explante nos frascos destinados aos meios de cultura. Os mesmos foram conectados por mangueiras com tampas e filtros autoclavados (Figura 2a).

Os conjuntos montados no fluxo foram transferidos para a sala de crescimento e ligados ao sistema comercial BIT5e BIT20 da Tecnal[®] (Figura 2b), formado por lâmpadas de LED (Light Emission Diode), com $42\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. O espectro foi configurado na combinação de vermelho e branco (na proporção de 70% e 30%, respectivamente), a 620–630nm fotoperíodo de 16 horas e temperatura de $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$.

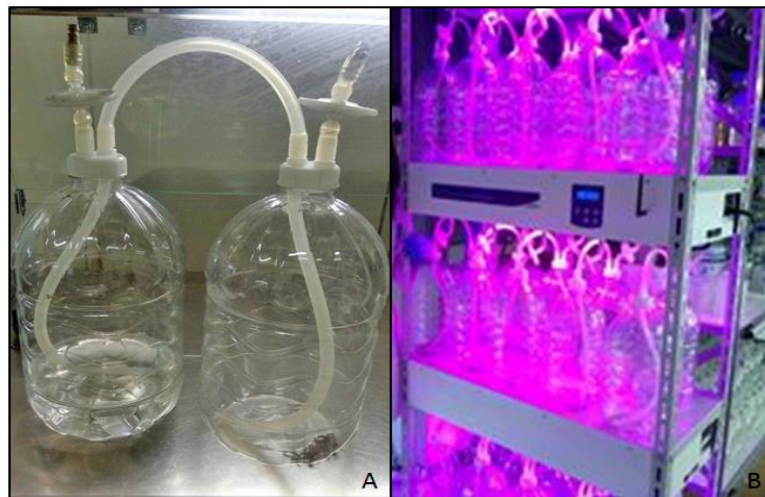


Figura 2. Sistema de imersão temporária. (A) Conjunto montado no fluxo laminar, frasco contendo meio de cultura, ligado pela mangueira de silicone a outro frasco contendo os explantes de batata-doce; (B) Biorreator comercial contendo 20 conjuntos (BIT20 da Tecnal[®]). Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 2017.

Após estudos prévios, ficaram definidas as frequências de imersão e duração das mesmas: imersão a cada quatro horas, dois minutos de passagem de meio, dois minutos de repouso e três minutos de retorno do meio de cultivo ao seu respectivo frasco (Figura 3). Além disso, a cada hora o sistema acionava a aeração por 30 segundos no meio de cultivo e 30 segundos no frasco contendo a cultura, de maneira alternada. Após 16 dias de cultivo, o meio de cultura foi substituído por um meio novo, na mesma composição.

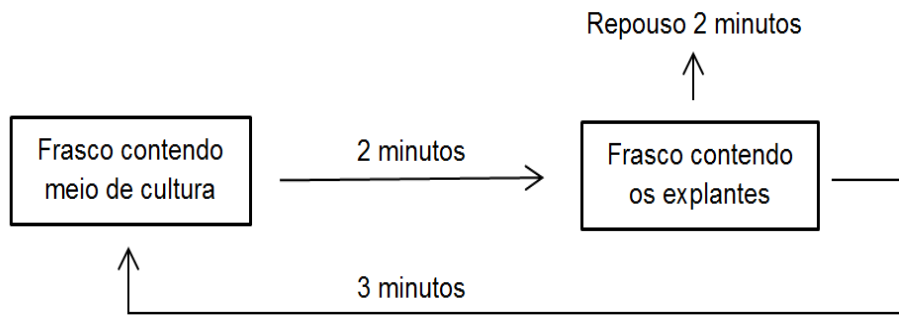


Figura 3. Diagrama dos tempos programados para a passagem do meio de cultura para o frasco contendo os explantes e da volta do mesmo para seu frasco de origem. Pelotas-RS, 2017.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2X3 [(2 concentrações de sacarose: 15 e 30g L⁻¹ de sacarose) e 3 cultivares (BRS Amélia, BRS Cuia e BRS Rubissol)], com 3 repetições (cada repetição foi constituída por um galão com 20 plantas), totalizando 60 plantas por cultivar por tratamento.

3.2.2 Experimento 2 - Concentrações de sacarose e espectro vermelho e azul no cultivo de plantas de batata-doce em biorreator de imersão temporária

A metodologia foi a mesma empregada no primeiro experimento, a fim de avaliar as respostas obtidas em uma nova condição luminosa. Neste estudo, o sistema BIT foi configurado na combinação dos espectros vermelho e azul (na proporção de 70:30) a 455–475nm.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2x3 [(duas concentrações de sacarose: 15 e 30g L⁻¹) e 3 cultivares (BRS Amélia, BRS Cuia e BRS Rubissol)], com 3 repetições (cada repetição foi constituída por um galão com 20 plantas por repetição), totalizando 60 plantas de cada cultivar por tratamento.

3.2.3 Experimento 3 - Concentrações de sacarose e espectro vermelho e branco no cultivo de batata-doce em sistema de micropropagação convencional

O meio de cultura para a inoculação dos explantes foi o MS convencional, com 100mg L^{-1} de mio-inositol, 5mgL^{-1} de GA_3 + $0,05\text{mg L}^{-1}$ de cinetina + $0,1\text{mg L}^{-1}$ AIA. O pH corrigido para a faixa de 5,8. O agente gelificante utilizado foi o ágar, o qual foi acrescido na proporção de 7g L^{-1} . Os frascos contendo 35mL do meio de cultura foram esterilizados por autoclavagem durante 15 minutos a 121°C e pressão de 1,5atm.

Em fluxo laminar, as plantas das cultivares BRS Amélia, BRS Cuia e BRS Rubissol foram seccionadas em segmentos apicais de aproximadamente 20mm de comprimento, contendo três gemas, e inoculados cinco explantes por frasco contendo meio semissólido.

Os frascos contendo as plantas foram transferidos para a sala de crescimento, e alocadas nas prateleiras do sistema comercial BIT20e BIT5 da Tecnal[®], com lâmpadas de LED (Light Emission Diode), com $42\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. O espectro foi configurado na combinação de vermelho e branco (70:30%), a 620–630nm. O fotoperíodo foi ajustado para 16 horas e a temperatura para $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2x3 [(duas concentrações de sacarose: 15g L^{-1} ou 30g L^{-1}) x (3 cultivares: BRS Amélia, BRS Cuia e BRS Rubissol)], com 6 repetições (cada repetição foi constituída por um frasco com 5 plantas, totalizando 30 plantas de cada cultivar por tratamento).

3.3 Aclimatização

Após as avaliações, 40 plantas de cada cultivar por tratamento, dos experimentos 1 e 2, e 15 plantas de cada cultivar por tratamento, do experimento 3, foram transferidas para bandejas de poliestireno com 72 células, contendo substrato comercial turfa fértil[®] e alocadas em casa de vegetação. Após 35 dias avaliou-se o percentual de sobrevivência das plantas, o comprimento da parte aérea (cm), o número de folhas, o comprimento de raiz (cm) e os teores de clorofilas *a*, *b* e *total*.

3.4. Avaliações e análise Estatística

As avaliações foram realizadas após 35 dias de cultivo *in vitro*, sendo elas: comprimento da parte aérea (cm), comprimento da maior raiz (cm) e comprimento das brotações (cm), realizado por meio de régua graduada; número de folhas; número de raízes e número de brotações. Massa fresca e massa seca total foram obtidas em balança determinadora de teor de umidade ShimadzuMOC63u[®]; teores de clorofilas a, b e total, aferidos com auxílio do clorofilômetro (ClorofiLOG - Falker Automação Agrícola Ltda., Porto Alegre, RS), a partir da média das leituras de duas folhas por planta, de 10 plantas de cada tratamento.

Os dados obtidos *in vitro* e *ex vitro*, dos três experimentos, foram submetidos à análise de variância ($P \leq 0,05$), sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando-se o software estatístico Sisvar[®] versão 5.6 (FERREIRA, 2014).

4 Resultados e discussão

4.1 Experimento 1 – Concentrações de sacarose e espectro vermelho e branco no cultivo de batata-doce em biorreator de imersão temporária

Parâmetros morfológicos

Houve interação entre concentração de sacarose e cultivares para todos os parâmetros morfológicos avaliados. Nas plantas cultivadas em meio de cultura contendo 30g L⁻¹ de sacarose a cultivar BRS Cuia foi a que apresentou a maior média de comprimento de parte aérea (3,77cm). Quando submetidas à metade da concentração de sacarose (15g L⁻¹), as plantas apresentaram redução no crescimento quando comparadas as plantas cultivadas em 30g L⁻¹ de sacarose (Figura 4; Anexo A). Resultados semelhantes foram obtidos por Shamir et al. (2001), avaliando diferentes concentrações de sacarose no meio de cultivo de orquídeas, observaram que níveis em torno de 30g L⁻¹ influenciaram o comprimento da parte aérea das plantas. Rocha et al. (2013) e Ribeiro et al. (2015) explicam que a concentração de sacarose adicionada ao meio de cultura pode influenciar positivamente o desempenho de algumas espécies, devido aos seus efeitos sobre o aporte de energia para o explante e a manutenção do potencial osmótico do meio.

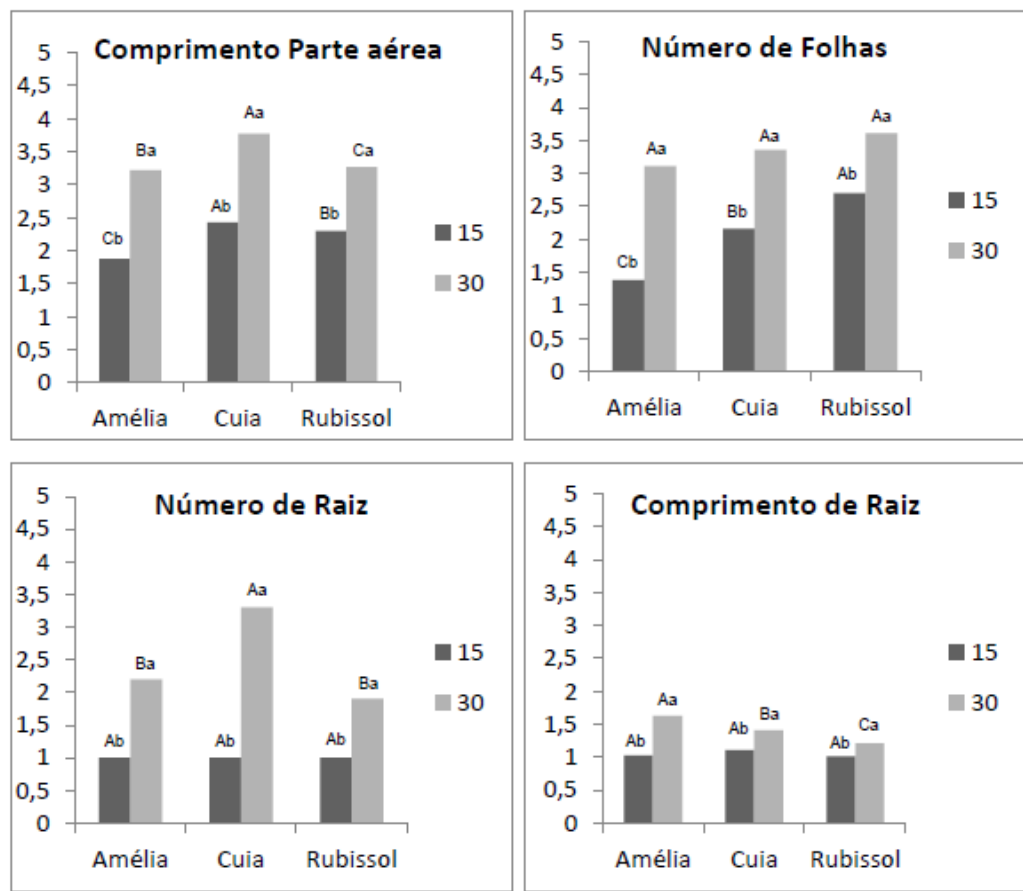


Figura 4. Médias dos parâmetros morfológicos das cultivares de batata-doce BRS Amélia, BRS Cuia e BRS Rubissol, nas concentrações de 15 e 30g L⁻¹ de sacarose no meio de cultivo em biorreator de imersão temporária sob espectro vermelho e branco. (A) Comprimento da parte aérea (cm); (B) Número de folhas; (C) Número de raiz; (D) Comprimento de raiz (cm). Médias seguidas por letras maiúsculas distintas (cultivar) e médias seguidas por letras minúsculas (concentração de sacarose) diferem entre si, pelo teste de Tukey ao nível de probabilidade de erro a 5%. Pelotas-RS, 2017.

As diferentes concentrações de sacarose no meio de cultivo influenciam no crescimento das plantas *in vitro*, interferindo em processos metabólicos, correspondendo à fonte de carbono disponível, já que as condições de cultivo *in vitro* normalmente fornecem baixa concentração de CO₂ e intensidade luminosa, fazendo que a taxa fotossintética muitas vezes não seja suficiente para suprir as necessidades da planta (LEITE et al., 2000; SKREBSKY et al., 2004). Além disso, a influência da sacarose no crescimento *in vitro* é associada à expressão de genes da ciclina, a qual é responsável por promover a proliferação celular em diferentes regiões meristemáticas, estimulando o crescimento (RIOU-KHAMLICH et al., 2000). De acordo com Damiano e Palombi (2000), outro fator relevante associado ao crescimento das plantas é a condição física do meio, visto que o meio líquido

permite um gradiente hormonal e nutricional reduzido, o que possibilita uma sincronia na divisão celular, possibilitando crescimento mais uniforme nas plantas.

Na concentração de 15g L⁻¹ de sacarose BRS Rubissol apresentou a maior média (2,70 folhas planta⁻¹), enquanto que na concentração de 30g L⁻¹ de sacarose no meio de cultivo, não houve diferença significativa entre as cultivares, as quais exibiram em torno de 3 folhas planta⁻¹ (Figura 4; Anexo A).

Dados semelhantes foram observados por Chu e Ribeiro (2002), os quais trabalhando com diferentes espécies de *Dioscorea*, observaram que o número de folhas produzidas apresentou correlação positiva com a concentração de sacarose no meio de cultivo. Estes autores verificaram maior número de folhas quando utilizaram as concentrações de 30 a 50g L⁻¹ de sacarose. Já, Mohamed e Alsadon (2010) e Badr (2011), observaram que conforme o nível de sacarose no meio de cultivo aumentou, houve um decréscimo no número de folhas e entrenós de batata. Dessa forma, verifica-se que a correlação entre as concentrações de sacarose e o número de folhas é dependente da espécie.

Em ambas as concentrações de sacarose avaliadas, foi verificado baixo número de raízes. No meio de cultivo com 15g L⁻¹, as plantas emitiram uma raiz, independente da cultivar, enquanto que no meio com 30g L⁻¹ o maior valor observado foi de 3,3 raízes por planta⁻¹, na cultivar BRS Cuia (Figura 4; Anexo A). Resultados semelhantes foram obtidos por Rocha et al. (2013), os quais observaram maior taxa de enraizamento em cana-de-açúcar cultivadas em 30g L⁻¹ de sacarose. A presença de carboidratos no meio de cultura é essencial ao processo de rizogênese in vitro, e que a formação das raízes, para a maioria das espécies, ocorre pela adição de 20 a 30g L⁻¹ de sacarose, já que o carbono exógeno influencia na diferenciação dos tecidos e órgãos (GEORGE, 1996; GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998; LEITE et al., 2000). Além disso, segundo Salisbury (1991), cada espécie requer um nível de auxina endógena para estimular o enraizamento, que é dependente do crescimento das partes aéreas, as quais são fontes de auxina que será translocada para a base, estimulando a rizogênese.

Além do número de raízes, a redução de sacarose em 50% da concentração usual no meio de cultura influenciou negativamente nas médias de comprimento das mesmas. Na concentração de 15g L⁻¹ de sacarose o comprimento médio das raízes não ultrapassou 1,11cm, não sendo observada diferença significativa entre as

cultivares. Já nas plantas cultivadas na presença de 30g L^{-1} de sacarose, a maior média de comprimento radicular foi de $1,63\text{cm}$ (Figura 4; Anexo A).

Esses resultados diferem dos obtidos por Galdiano et al. (2013), os quais verificaram redução no comprimento de raízes de orquídea (*Cattleya loddigesii*), conforme a concentração de sacarose no meio de cultura aumentava (30 a 40g L^{-1}). Segundo Besson (2010), pode haver diminuição no enraizamento associada com a redução de sais e água do meio de cultura, devido ao potencial osmótico. No entanto, Mc Cown (1988) explica que quando o suprimento de fotossintatos é insuficiente, não há formação de raízes in vitro.

De acordo com Wang e Ruan (2013), na maioria das espécies a concentração de 30g L^{-1} de sacarose no meio de cultura mostra-se eficiente para que haja adequada conexão das raízes com os vasos xilemáticos da plântula, resultando em maiores taxas de absorção de água pelas raízes. Isto pode ser explicado pela relação da sacarose com a proliferação e expansão de células do xilema e floema em tecidos cultivados in vitro, visto que, a quantidade de vasos xilemáticos é dependente da concentração de sacarose no meio de cultura (ALONI, 1980).

Em todas as cultivares foi verificado surgimento de brotações. Na concentração de 15g L^{-1} , foi observada média de 1 broto por explante, enquanto que na concentração de 30g L^{-1} , para a cultivar BRS Cuia foi observado 1,06 brotos por explante (Figura 5; Anexo A).

Flores et al. (2015), estudando seis cultivares de batata-doce, também observaram que as plantas cultivadas em meio suplementado com 30g L^{-1} de sacarose foram as que apresentaram a maior taxa de brotações (1,5 brotações por explante). Conforme salientam Marino et al. (2010), a sacarose afeta significativamente as respostas fisiológicas das plantas, atuando como fonte de energia/esqueletos de carbono, possibilitando o surgimento de brotações. Além da concentração de sacarose, o posicionamento horizontal dos explantes no biorreator de imersão temporária, pode estar associado ao surgimento de novas brotações, visto que dificulta o fluxo de auxinas do ápice para a base desses explantes, fazendo com que a dominância apical seja rompida (MACKAY; KITTO, 1988).

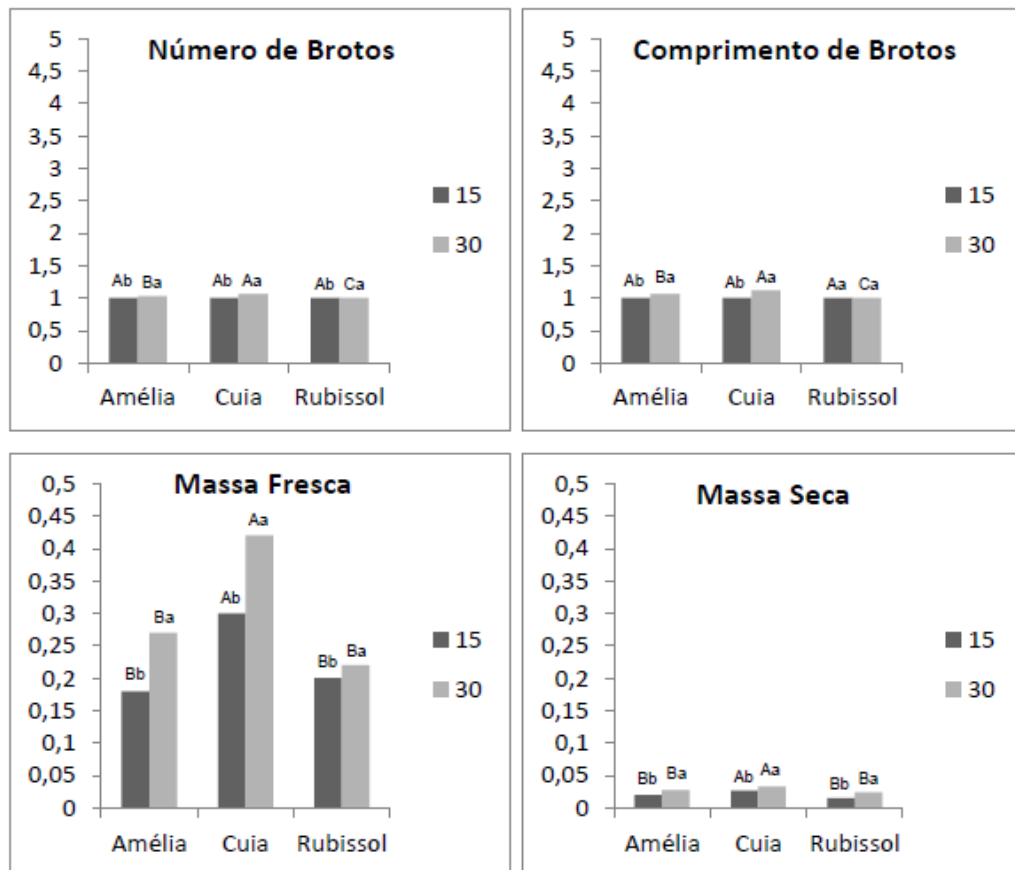


Figura 5. Médias dos parâmetros morfológicos das cultivares de batata-doce BRS Amélia, BRS Cuia e BRS Rubissol, nas concentrações de 15 e 30g L⁻¹ de sacarose no meio de cultivo em biorreator de imersão temporária sob espectro vermelho e branco. (A) Número de brotos; (B) Comprimento de brotos (cm); (C) Massa fresca (g planta⁻¹); (D) Massa seca (g planta⁻¹). Médias seguidas por letras maiúsculas distintas (cultivar) e médias seguidas por letras minúsculas (concentração de sacarose) diferem entre si, pelo teste de Tukey ao nível de probabilidade de erro a 5%. Pelotas-RS, 2017.

As plantas submetidas à metade da concentração de sacarose (15g L⁻¹), não apresentaram média de comprimento de brotações superiores a 1cm. Por outro lado, as plantas do meio de cultura suplementado com 30g L⁻¹ diferiram significativamente entre si, no qual a cultivar BRS Cuia apresentou o maior comprimento médio de brotações (1,12cm) (Figura 5; Anexo A).

Nicoloso et al. (2003) e Ribeiro et al. (2007), ao estudarem o efeito de diferentes concentrações de sacarose no meio de cultivo in vitro de Ginseng Brasileiro (*Pfaffia paniculata*) e manjeriço roxo (*Ocimum basilicum* L.), observaram resultados semelhantes, visto que, o comprimento médio das brotações dessas espécies, acompanhou o incremento de sacarose (de 30 até 60g L⁻¹) no meio de cultivo, demonstrando que os níveis de sacarose no substrato de cultivo in vitro

influenciam vários processos metabólicos nas culturas, apresentando efeito sobre o crescimento e diferenciação dos tecidos (GEORGE, 1996). Segundo Rocha et al. (2010), as brotações obtidas na concentração de 30g L⁻¹, são mais desejáveis, visto que apresentaram maior comprimento, o que facilita a separação dos explantes multiplicados, como também apresentam maior facilidade de enraizamento.

Níveis crescentes de sacarose resultaram em aumento da biomassa in vitro, conforme pode ser observado na Figura 5. O meio suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose foi responsável pela promoção da maior média de massa fresca total com destaque para a cultivar BRS Cuia (0,42g). A massa seca total acompanhou os resultados da massa fresca total, na concentração de 15g L⁻¹ foi verificada uma média inferior quando comparada com a concentração de 30g L⁻¹ (Figura 5; Anexo A). A cultivar BRS Cuia continuou apresentando a maior massa seca total (0,027g em 15g L⁻¹ e 0,033g em 30g L⁻¹), quando comparada com as demais cultivares avaliadas. Isto demonstra maior vigor da 'BRS Cuia' em relação às cultivares BRS Rubissol e BRS Amélia.

Ferreira et al. (2016), observaram que plantas de cana-de-açúcar cultivadas em meio na concentração de 30g L⁻¹ de sacarose, apresentaram maior média de massa fresca e seca total, quando comparadas as plantas cultivadas em metade da concentração. Segundo Calvete et al. (2002), o maior conteúdo de sacarose no meio de cultivo corresponde à maior concentração de reservas no tecido foliar, o que irá aumentar a capacidade das folhas de permanecer por mais tempo na planta e a área foliar é um importante determinante para a produção de massa seca (HAIMERONG; KUBOTA 2003).

As reservas acumuladas durante o cultivo in vitro, com incremento da biomassa, servem como suporte para as plantas durante a aclimatização, enquanto as anomalias morfológicas e fisiológicas geradas pelas condições especiais de cultivo são corrigidas (CAPELLADES et al., 1991; PREMKUMAR et al., 2001).

Conteúdo de pigmentos fotossintéticos (clorofila a, b e total)

Não foi observada interação entre os fatores concentração de sacarose e cultivares, sendo verificado apenas o efeito isolado do fator concentrações de sacarose. Já, o fator cultivar não foi significativo. De forma análoga ao que ocorreu

com as análises das características morfológicas, o conteúdo de clorofila *a*, *b* e *total* nas plantas de batata-doce foi maior na presença de 30g L⁻¹ de sacarose no meio de cultivo (Tabela 1).

Os resultados obtidos nesse trabalho diferem de Vieira et al. (2015), os quais observaram em folhas de bananeira (*Musa acuminata*), maior conteúdo de clorofila (*a*, *b* e *total*), associada a menores concentrações de sacarose no meio de cultivo. Embora diversos autores defendam que a presença de sacarose no meio de cultivo está associada à redução nos teores de clorofila (KOZAI, 2003; DECCETTI, 2004; GEORGE, 2008), para a batata-doce nas condições desse estudo isto não foi verificado. De acordo com Almeida (2001), mesmo as plantas apresentando taxa fotossintética baixa nas condições *in vitro*, o suprimento de carbono exógeno provavelmente interfere de forma positiva em rotas metabólicas envolvidas na produção de clorofila, o que explicaria o maior acúmulo de pigmentos observado na concentração superior de sacarose.

Tabela 1. Índice de Clorofila (C_{lh}) A, B e total em folhas de batata-doce, das cultivares BRS Amélia, BRS Cuia e BRS Rubissol, cultivadas em sistema de imersão temporária na combinação do espectro vermelho e branco sob duas concentrações de sacarose no meio de cultivo (15 e 30g L⁻¹)

Cultivares	C_{lh} A (mM)	C_{lh} B (mM)	C_{lh} Total (mM)
BRS Amélia	12,89 ^{ns}	2,91 ^{ns}	15,81 ^{ns}
BRS Cuia	13,79	5,51	17,30
BRS Rubissol	13,69	3,31	17,00
Concentração de Sacarose (g L⁻¹)			
15	12,15b	2,85b	15,00b
30	14,76a	3,63a	18,40a
C.V. (%)¹	23,30	35,18	23,77

C.V. (%)¹ Coeficiente de Variação. Médias seguidas por letras minúsculas distintas, na mesma coluna diferem entre si, pelo teste de Tukey ao nível de probabilidade de erro a 5%. ^{ns} Não significativo. Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 2017.

Aclimatização

O meio de cultura contendo 30g L⁻¹ de sacarose proporcionou as maiores porcentagens de aclimatização, sendo que a cultivar BRS Cuia apresentou maior porcentagem de sobrevivência (97,5%) quando comparada as cultivares BRS Amélia e BRS Rubissol (87,5 e 80%, respectivamente) (Tabela 2 e Figura 6).

Esses resultados estão de acordo com Calvete et al. (2002) e Bandinelli et al. (2013), os quais verificaram que o aumento da concentração de sacarose do meio foi acompanhado pelo aumento da sobrevivência ex vitro das plantas de morangueiro e batata. Alguns autores defendem que a presença de fontes externas de carbono no meio de cultivo leva ao acúmulo de açúcares nas folhas, inibindo o processo fotossintético, conseqüentemente, levando as plantas cultivadas in vitro a apresentarem heterotrofismo e redução do crescimento, o que leva a baixa taxa de sobrevivência das mesmas ex vitro (LANGFORD; WAINWRIGHT, 1987; KOZAI et al., 1991; GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

No entanto, segundo Langford e Wainwright (1987) e Capellades et al., (1990), manter os níveis de sacarose no meio de cultivo próximos a 30g L⁻¹, para a maioria das espécies, é recomendável para que a planta armazene reservas de energia suficientes para sobreviver às mudanças de ambiente, visto que os mecanismos pelos quais a concentração de açúcares influencia na aclimatização não são muito claros.

Tabela 2. Porcentagem de aclimatização de três cvs. de plantas de batata-doce, cultivadas em biorreator de imersão temporária, sob combinação de espectro vermelho e branco, submetidas a duas concentrações de sacarose 15 e 30g L⁻¹

Cultivar	Concentração de sacarose	Nº de plantas transplantadas	Sobrevivência (%)
BRS Amélia	15	40	77,5
	30	40	87,5
BRS Cuia	15	40	85
	30	40	97,5
BRS Rubissol	15	40	70
	30	40	80

Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 2017.



Figura 6. Plantas de batata-doce cultivadas in vitro. (A) Plantas transplantadas para casa de vegetação; (B) Plantas de batata-doce cultivar BRS Cuia, cultivadas em 30g L^{-1} de sacarose, após 35 dias em casa de vegetação. Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 2017.

Parâmetros morfológicos após aclimatização

Não foi verificada interação entre os fatores cultivares e concentrações de sacarose nos parâmetros morfológicos avaliados após 35 dias de cultivo em casa de vegetação. No entanto, foi verificado efeito isolado dos dois fatores. Como observado no cultivo in vitro, a concentração de sacarose de 30g L^{-1} continuou proporcionando médias superiores a de 15g L^{-1} . Em relação ao fator cultivar, quando analisada a variável comprimento da parte aérea, as cultivares BRS Cuia e BRS Amélia apresentaram aproximadamente 3,5cm. A cultivar BRS Cuia também demonstrou maior no número de folhas ($4,25$ folhas por planta⁻¹) e comprimento de raiz (4,30cm) (Tabela 3). Não foi possível avaliar o número de raízes, visto que, as mesmas encontravam-se emaranhadas, assim como não foi observada presença de novas brotações.

Os resultados estão de acordo com Galdiano et al. (2013) e Freitas et al. (2015), os quais observaram em plantas de orquídeas e bromélias cultivadas in vitro, que exibiram crescimento mais vigoroso (como maior comprimento da parte aérea, número de folhas e raízes) no meio de cultivo na concentração de 30g L^{-1} de sacarose, mantiverem as maiores médias nos parâmetros de crescimento avaliados 30 dias após transplântio para casa de vegetação, assim como as maiores taxas de sobrevivência ex vitro.

Tabela 3. Comprimento da parte aérea (CPA), número de folhas por planta (NF) e comprimento médio de raízes (CMR), de plantas de batata-doce, previamente cultivadas em BIT na combinação de espectro vermelho e branco, em duas concentrações de sacarose (15e 30g L⁻¹), após 35 dias de aclimatização

Cultivares	CPA (cm)	NF (folhas/planta)	CMR (cm)
BRS Amélia	3,22a	3,55b	3,91b
BRS Cuia	3,47a	4,25a	4,30a
BRS Rubissol	2,64b	3,05c	3,33c
Concentração de Sacarose (g L⁻¹)			
15	2,56b	3,56b	3,62b
30	3,66a	3,66a	4,07a
C.V. (%)¹	21,26	26,54	11,32

C.V. (%)¹ Coeficiente de variação. Médias seguidas por letras minúsculas distintas, na mesma coluna diferem entre si, pelo teste de Tukey ao nível de probabilidade de erro a 5%. Embrapa, Clima Temperado, Pelotas-RS, 2017.

A maior taxa de sobrevivência após 35 dias de aclimatização, assim como as médias dos parâmetros morfológicos, pode ser explicada pelos resultados anteriormente obtidos, visto que o possível acúmulo de reservas nas folhas das plantas cultivadas em maior concentração de sacarose pode estar relacionado à sobrevivência da planta, enquanto ela se adapta ao ambiente ex vitro, além disso, a presença de raízes e comprimento adequado das mesmas fornece o suprimento de água para a planta durante a aclimatização (DIÁZ-PÉREZ et al., 1995; DECCETTI, 2004).

Conteúdo de pigmentos fotossintéticos (clorofila *a*, *b* e *total*), após aclimatização

Após 35 dias de cultivo ex vitro, as variáveis índices de clorofila *a*, *b* e *total* não foram influenciadas pelos fatores avaliados (Tabela 4). Diferindo dos resultados obtidos nesse trabalho, nas plantas de fumo (*Nicotiana tabacum* L.), e orquídeas (*Dendrobium*), foi observada maior quantidade de pigmentos fotossintetizantes, nas plantas previamente cultivadas em meio de cultivo acrescido de 30g L⁻¹ de sacarose (SOLAROVA et al., 1989; , LIM et al., 1992). Houve aumento na concentração em relação ao período das plantas no cultivo in vitro, o que pode ser explicado pelo surgimento de novas folhas com atividade fotossintética mais ativa, devido à disponibilidade de CO₂ e o aumento da intensidade luminosa na casa de vegetação, quando comparado ao cultivo no laboratório.

Tabela 4. Índice de Clorofila (Cih) A, B e total em folhas de batata-doce, das cultivares BRS Amélia, BRS Cuia e BRS Rubissol, cultivadas em sistema de imersão temporária na combinação do espectro vermelho e branco sob duas concentrações de sacarose no meio de cultivo (15 e 30g L⁻¹), após aclimatização

Cultivares	Cih A (mM)	Cih B (mM)	Cih Total (mM)
BRS Amélia	22,43 ^{ns}	8,64 ^{ns}	32,99 ^{ns}
BRS Cuia	24,13	9,67	34,27
BRS Rubissol	24,37	9,71	34,09
Concentração de Sacarose (g L⁻¹)			
15	23,56 ^{ns}	9,21 ^{ns}	32,93 ^{ns}
30	23,73	9,46	33,30
C.V. (%)¹	11,00	15,60	11,04

C.V. (%)¹ Coeficiente de variação. ^{ns} Não significativo. Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 2017.

Os resultados obtidos neste trabalho indicam um comportamento heterotrófico das plantas no cultivo in vitro, visto que as maiores taxas de crescimento estão associadas às plantas cultivadas na maior concentração de sacarose (30g L⁻¹). No entanto, a aeração do sistema de biorreator de imersão temporária, pode ter contribuído com as taxas de sobrevivência e crescimento das plantas ex vitro, pela redução da umidade relativa e da concentração de etileno no interior dos frascos de cultivo, possibilitando crescimento aparentemente saudável das plantas in vitro e diminuindo o aparecimento de desordens fisiológicas observadas no sistema convencional como a hiperidricidade (ARIGITA et al., 2002; KOZAI; NGUYEN, 2003).

4.2 Experimento 2 - Concentrações de sacarose e espectro vermelho e azul no cultivo de batata-doce em biorreator de imersão temporária

De acordo com a análise estatística, houve interação entre as concentrações de sacarose e as cultivares, para todos os parâmetros morfológicos avaliados. Quando observado crescimento da parte aérea, as plantas cultivadas na concentração de 15g L⁻¹ de sacarose apresentaram altura significativamente inferior as plantas cultivadas na presença de 30g L⁻¹ de sacarose (Figura 7).

Resultados similares foram obtidos por Souza et al. (1990), em estudo com batata-doce, onde a maior média de comprimento da parte aérea (6,20cm), foi verificada nas plantas cultivadas em meio de cultura MS contendo 30g L⁻¹ de sacarose. A influência positiva da presença de sacarose, no crescimento da parte aérea de plantas cultivadas in vitro também foi verificada em plantas de

maracujazeiro (COUCEIRO, 2002) e em videiras, (GRIBAUDO et al., 2003), no meio de cultivo suplementado com 30g L^{-1} de sacarose.

A utilização do meio de cultivo líquido pode estar associada ao maior crescimento da parte aérea, já que esse tipo de meio proporciona um contato maior com o explante, favorecendo a maior absorção dos nutrientes contidos no meio MS (TEIXEIRA, 2006; RIBEIRO et al., 2008). Diante disso, além da sacarose fornecer energia para o crescimento das plantas, funciona como um regulador do potencial osmótico do meio de cultivo, conforme aumenta sua concentração diminui a entrada de água nos explantes, reduzindo a ocorrência de hiperidricidade, a qual é uma desordem fisiológica associada ao baixo desenvolvimento das plantas cultivadas in vitro (SEKO; NISHIMURA, 1996).

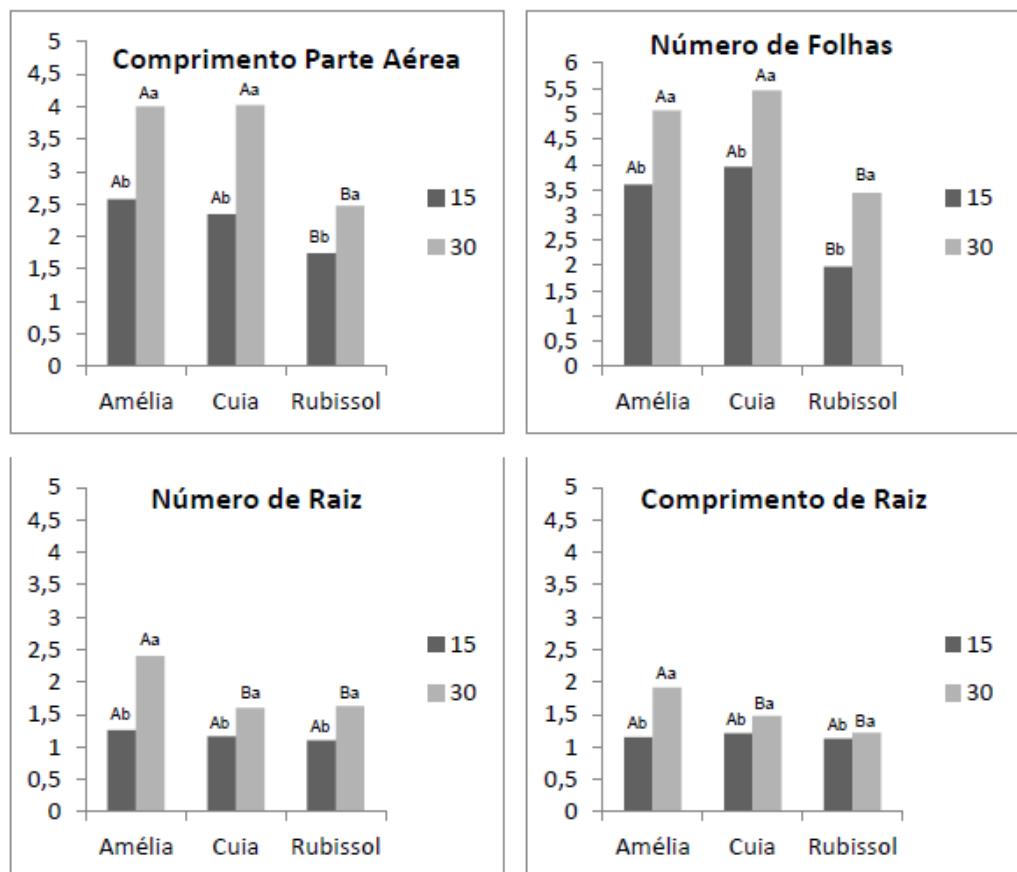


Figura 7. Médias dos parâmetros morfológicos das cultivares de batata-doce BRS Amélia, BRS Cuia e BRS Rubissol, nas concentrações de 15 e 30g L^{-1} de sacarose no meio de cultivo em biorreator de imersão temporária sob espectro vermelho e azul. (A) Comprimento da parte aérea (cm); (B) Número de folhas; (C) Número de raiz; (D) Comprimento de raiz (cm). Médias seguidas por letras maiúsculas distintas (cultivar) e médias seguidas por letras minúsculas (concentração de sacarose) diferem entre si, pelo teste de Tukey ao nível de probabilidade de erro a 5%. Pelotas-RS, 2017.

As plantas cultivadas em meio de cultivo com metade da concentração de sacarose (15g L^{-1}) também apresentaram menor média no número de folhas quando comparadas com aquelas cultivadas em 30g L^{-1} de sacarose (Figura 7). O que diferiu dos resultados obtidos por Ambrósio e Melo (2004), os quais relataram redução no número de folhas em plantas de samambaia conforme aumentava a concentração de sacarose no meio de cultura. O mesmo foi observado para as plantas de beterraba e batata (BANDINELLI et al., 2013).

No entanto, Grout e Millan (1985), afirmam que a redução da sacarose no cultivo *in vitro* pode afetar o número de folhas formadas, o que diminuiria as taxas de sobrevivência *ex vitro*, visto que as mesmas são consideradas como órgãos estoque de nutrientes. Segundo Lima et al. (2000), as características genéticas e as condições internas das células podem ser afetadas pela aquisição e distribuição das fontes de carboidratos, os quais são essenciais para o crescimento e desenvolvimento da área foliar.

Assim como as variáveis anteriores, a menor média do número de raízes foi associada à concentração de 15g L^{-1} de sacarose (Figura 7). Estes resultados corroboram com os obtidos por Conner et al. (1992), os quais observaram que plantas de quatro cultivares de aspargo desenvolvidas em meio com alta concentração de sacarose (30 a 60g L^{-1}), produziram raízes em maior número e taxas superiores de crescimento e sobrevivência quando transplantadas para casa de vegetação, em relação às plantas cultivadas em concentrações mais baixas. O aumento no número das raízes, associado à maior concentração de sacarose (30g L^{-1}), está relacionado com o fato da sacarose no substrato de cultivo *in vitro* influenciar vários processos metabólicos nas culturas, apresentando efeito sobre o crescimento e diferenciação dos tecidos, visto que, normalmente, as condições *in vitro* não são adequadas para que a planta realize fotossíntese e a fonte de carbono externo passa a ser sua única fonte de energia (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998; LEITE et al., 2000).

Embora alguns autores sugiram que as raízes produzidas *in vitro* não apresentem funcionalidade e sirvam apenas de reservas de nutrientes até que novas raízes sejam formadas na etapa *ex vitro* (DEBERGH; MAENE 1981; BORKOWSKA, 2001), de acordo com George (1996), as plântulas que desenvolvem raízes *in vitro* apresentam maior capacidade em estabilizar a perda hídrica durante a fase de aclimatização, estando relacionadas com o aumento da sobrevivência *ex vitro*.

O comprimento médio das raízes foi superior nas plantas cultivadas em 30g L⁻¹. Nessa concentração a cultivar BRS Amélia exibiu o maior comprimento (1,91cm) diferindo significativamente das demais cultivares (Figura 7). Del Rosário e Guzman (1981) obtiveram efeito positivo promovido pela alta concentração de açúcar no crescimento de raízes de embriões de coqueiro “makapuno”, usando meio de cultura MS. Do mesmo modo, experimentos com *Diurislongifolia* (*Orchidaceae*), mostraram que o crescimento das raízes acompanhou o aumento da concentração de sacarose de 20 à 40g L⁻¹ (COLLINS; DIXON, 1992).

Embora a média do comprimento de raízes seja modesta, é válido salientar que assim como as folhas, as raízes obtidas no cultivo in vitro estão relacionadas com o sucesso na etapa de aclimatização das plantas, sendo que as raízes mais curtas mostram-se mais adequadas, visto que, são mais fáceis de manusear no momento do transplante, e apresentam-se em fase de crescimento ativo, facilitando a aclimatização das plantas (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Foi constatada a presença de brotações em todas cultivares em estudo (Figura 8). Na concentração de 30g L⁻¹, as cultivares BRS Cuia e BRS Amélia exibiram em torno de 1,10 brotações por explante⁻¹, enquanto que a cv. BRS Rubissol apresentou o menor número de brotações 1,0 por explante⁻¹ (Figura 9).

Ferreira Júnior (2015), estudando as mesmas cultivares em biorreator de imersão temporária, no meio acrescido de 30g L⁻¹ de sacarose, observou médias semelhantes para o número de brotações (média de 1,73 brotos por planta). Esses resultados também estão de acordo com o estudo realizado por Rocha et al. (2013), com cana-de-açúcar, no qual obtiveram maior número de brotações nas plantas submetidas a meio de cultivo com 30g L⁻¹ de sacarose.

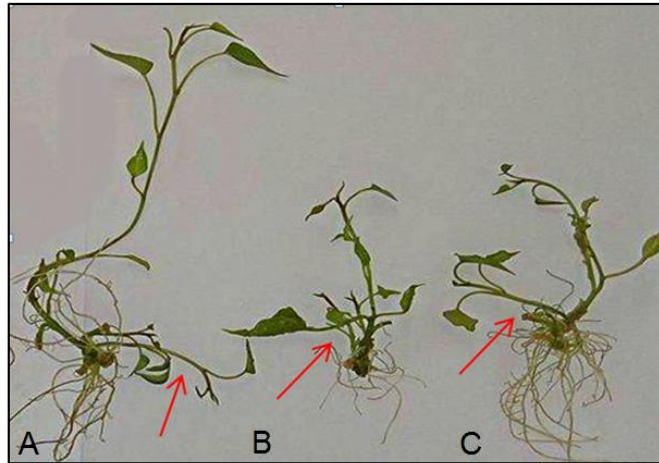


Figura 8. Presença de brotações em plantas de batata-doce: (A) 'BRS Cuia'; (B) 'BRS Amélia' e (C) 'BRS Rubissol', cultivadas em biorreator de imersão temporária, na concentração de 30g L⁻¹ de sacarose no meio de cultivo. Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 2017.

Segundo Sivparsad e Gubba (2012), o potencial para formar brotações in vitro em batata-doce é genótipo-específico. Entretanto, de acordo com Gamborg (1970), o efeito da citocinina na divisão celular pode depender da disponibilidade do açúcar, em que meios contendo concentração alta de sacarose favorecem a diferenciação e crescimento de brotações. Juntamente com a sacarose, o uso do sistema de biorreatores de imersão temporária tem aumentado o número das brotações in vitro, já que permite maior contato da cultura com o meio, possibilita a aeração dos frascos estimulando o crescimento e a obtenção de maior produção vegetal, e proporciona a agitação da cultura no biorreator, que resulta na perda de dominância apical (TAKAYAMA; AKITA, 2006).

Na concentração 30g L⁻¹ de sacarose, também foi observado o maior comprimento de brotações, na qual a cultivar BRS Amélia apresentou a maior média (1,94cm) (Figura 9). Estudos envolvendo bananeiras cv. Terra (LEMOS et al., 2001) e helicônia (RODRIGUES et al., 2006), na presença de 30g L⁻¹ de sacarose, cultivadas em biorreator de imersão temporária, resultaram em brotações com maior comprimento e duas vezes mais brotos, que nas concentrações inferiores, dados semelhantes ao encontrados neste trabalho.

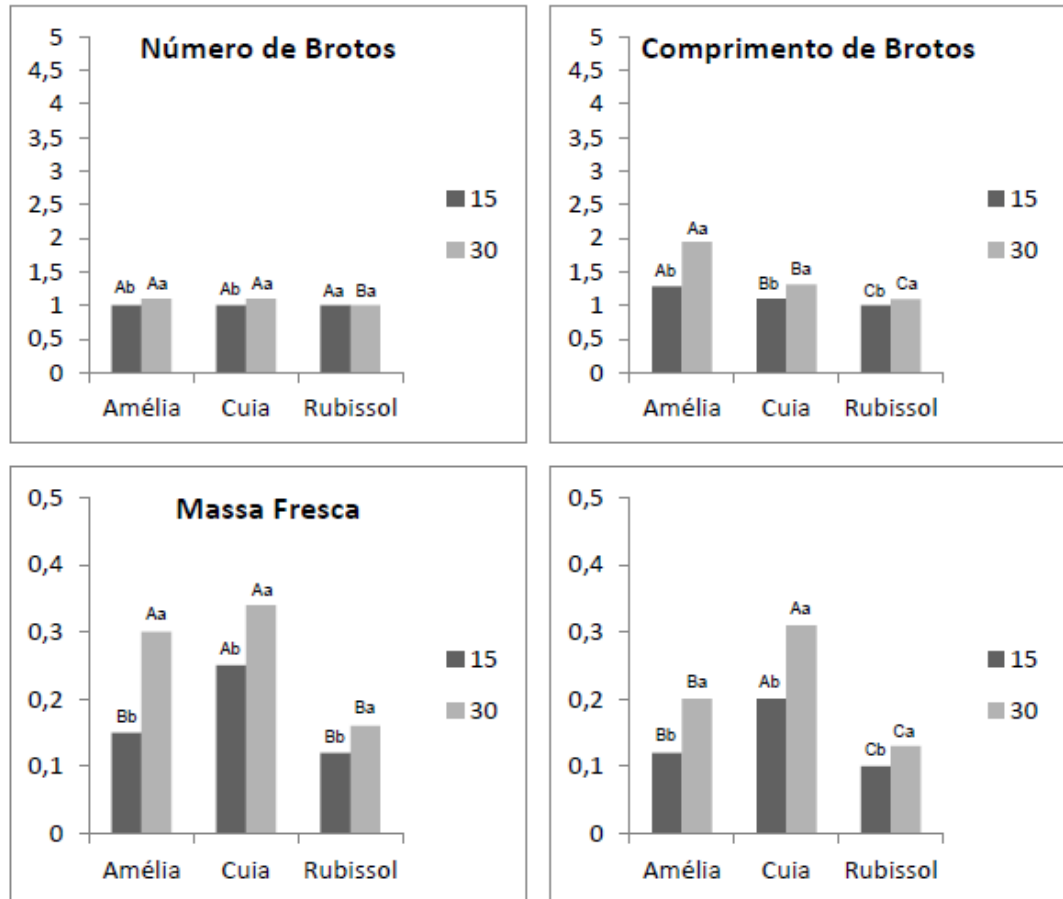


Figura 9. Médias dos parâmetros morfológicos das cultivares de batata-doce BRS Amélia, BRS Cuia e BRS Rubissol, nas concentrações de 15 e 30g L⁻¹ de sacarose no meio de cultivo em biorreator de imersão temporária sob espectro vermelho e azul. (A) Número de brotos; (B) Comprimento de brotos (cm); (C) Massa fresca (g planta⁻¹); (D) Massa seca (g planta⁻¹). Médias seguidas por letras maiúsculas distintas (cultivar) e médias seguidas por letras minúsculas (concentração de sacarose) diferem entre si, pelo teste de Tukey ao nível de probabilidade de erro a 5%. Pelotas-RS, 2017.

A sacarose adicionada ao meio nutritivo age como regulador osmótico do meio de cultivo, auxiliando a impedir a presença de hiperidricidade, ademais é determinante no crescimento e nas respostas fisiológicas das plantas *in vitro*, atuando tanto como fonte de energia e de carbono, possibilitando o crescimento das plantas *in vitro* (SHIBLI et al., 2006; FLORES et al., 2013). Além disso, para Zenk et al. (1977) as altas concentrações de sacarose induzem a biossíntese de auxinas, as quais, juntamente com as giberelinas, promovem o alongamento das brotações.

Normalmente, as respostas de biomassa confirmam as avaliações no crescimento das plantas. Conforme esperado, a biomassa das plantas de todas as cultivares foi influenciada pela concentração de sacarose, onde tanto a massa fresca quanto a massa seca total foram favorecidas pela concentração de 30g L⁻¹ de

sacarose (Figura 9). Os resultados foram similares a Rocha et al. (2007), os quais observaram maior massa fresca e seca total para plantas de banana anã cultivadas em meio suplementado 30g L⁻¹ de sacarose. Estudos comprovaram que 75 a 85 % do aumento da biomassa se deve à incorporação de carbono pela adição de sacarose, visto que níveis crescentes de sacarose contribuem consideravelmente para o surgimento de raízes, bem como para aumentar a quantidade de reserva de carboidratos, principalmente nas folhas (RICK et al., 1997). Cerca de um terço desse estoque é empregado no desenvolvimento de novas folhas, as quais contribuirão para o crescimento e sobrevivência dessas plantas quando transferidas para o ambiente ex vitro (DARNEL; BIRKHOOLD, 1996).

Conteúdo de pigmentos fotossintéticos (clorofila *a*, *b* e *total*)

Para os índices de clorofila *a*, *b* e *total*, apenas foi observada influência do fator concentração de sacarose. O fator cultivar não teve efeito nestas variáveis. Na concentração de 30g L⁻¹ foi a que apresentou as melhores médias para as três variáveis (Tabela 5). Corroborando com os resultados obtidos por Serret et al. (2001), em um estudo com plantas de gardênia submetidas ao cultivo in vitro com diferentes concentrações de sacarose (0; 1,5 e 3%), verificaram que a baixa concentração de sacarose diminuiu os teores de clorofila. Segundo Engel e Poggiani (1991), a eficiência fotossintética está ligada ao teor de pigmentos cloroplastídicos das plantas, afetando o crescimento e influenciando a adaptabilidade das mesmas aos diversos ambientes.

Tabela 5. Índice de Clorofila (Cih) A, B e total em folhas de batata-doce, das cultivares BRS Amélia, BRS Cuia e BRS Rubissol, cultivadas em sistema de imersão temporária na combinação do espectro vermelho e azul, sob duas concentrações de sacarose no meio de cultivo (15 e 30g L⁻¹)

Cultivares	Cih A (mM)	Cih B (mM)	Cih Total (mM)
BRS Amélia	15,30 ^{ns}	3,53 ^{ns}	18,83 ^{ns}
BRS Cuia	13,99	3,21	17,20
BRS Rubissol	13,45	3,33	16,76
Concentração de Sacarose (g L⁻¹)			
15	13,21b	3,03b	16,25b
30	15,18a	3,63a	18,81a
C.V.(%)¹	23,06	27,49	22,53

C.V. (%)¹ Coeficiente de variação. Médias seguidas por letras minúsculas distintas, na mesma coluna diferem entre si, pelo teste de Tukey ao nível de probabilidade de erro a 5%. ^{ns} Não significativo. Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 2017.

Aclimatização

As maiores porcentagens de aclimatização foram observadas nas plantas cultivadas em meio de cultura contendo 30g L⁻¹ de sacarose (Tabela 6). Trabalhando com a mesma espécie Flores et al. (2015) e Sivparsad e Gubba (2012), também obtiveram melhores porcentagens de aclimatização nas plantas submetidas a meio de cultura contendo 30g L⁻¹ de sacarose.

Tabela 6. Porcentagem de aclimatização de três cvs. de plantas de batata-doce, cultivadas em biorreator de imersão temporária, sob combinação de espectro vermelho e azul, submetidas a duas concentrações de sacarose 15 e 30g L⁻¹

Cultivar	Concentração de sacarose	Nº de plantas transplantadas	Sobrevivência (%)
BRS Amélia	15	40	82,2
	30	40	90
BRS Cuia	15	40	87,5
	30	40	97,5
BRS Rubissol	15	40	80
	30	40	85

O carboidrato acrescido ao meio de cultura atua como recurso energético e fornece carbonos precursores para a biossíntese de oligossacarídeos, aminoácidos e outras moléculas necessárias para o crescimento, além disso, pode aumentar as reservas de amido e sacarose nas plantas micropropagadas e auxiliar na aclimatização (CALDAS et al., 1998; HAZARIKA, 2003).

Parâmetros morfológicos após aclimatização

Não foi observada interação entre os fatores cultivar e sacarose, no entanto verificou-se efeito isolado de ambos. Na variável comprimento da parte aérea a maior média foi representada pela 'BRS Cuia' (4,11cm), assim como número de folhas (5,80) e comprimento de raiz. Com relação ao fator sacarose, constata-se o efeito positivo da aclimatização ex vitro sobre as mudas de batata-doce cultivadas em 30g L⁻¹ de sacarose no meio de cultura (Tabela 7). Estes dados corroboram com os relatados por Calvete (1998) para o morangueiro, o qual obteve maior taxa de sobrevivência nas plantas previamente cultivadas em 30g L⁻¹.

Nota-se em função dos dados anteriores, que as plantas cultivadas em 30g L⁻¹ de sacarose, provavelmente acumularam mais reservas de solutos, as quais podem ter sido utilizadas durante a aclimatização e, com isto, proporcionaram maior taxa de sobrevivência e crescimento ex vitro. Calvete (1998), afirma que o acúmulo de sólidos nos tecidos, confere maior resistência às folhas, sugerindo que a presença de reservas de carbono nas folhas pode ser a principal forma de sustentar a sobrevivência das plantas, durante as primeiras semanas de aclimatização ex vitro. Segundo Grattapaglia e Machado (1998), a variabilidade na resposta morfogênica in vitro, leva à necessidade de se definirem protocolos de micropropagação diferenciados, já que além das espécies, cada cultivar pode apresentar um comportamento próprio.

Tabela 7. Comprimento da parte aérea (CPA), número médio de folhas por planta (NF) e comprimento médio de raízes (CMR), de plantas de batata-doce, previamente cultivadas em BIT na combinação de espectro vermelho e azul, em duas concentrações de sacarose (15e 30g L⁻¹), após 35 dias de aclimatização

Cultivares	CPA (cm)	NF (folhas/planta)	CMR (cm)
BRS Amélia	3,07c	3,35c	3,42a
BRS Cuia	4,11a	5,80a	3,65a
BRS Rubissol	3,60b	5,15b	3,19b
Concentração de Sacarose (g L⁻¹)			
15	2,95b	4,36b	3,21b
30	4,23a	5,16a	3,63a
C.V.(%)¹	24,81	20,18	8,86

C.V. (%)¹ Coeficiente de variação. Médias seguidas por letras minúsculas distintas, na mesma coluna diferem entre si, pelo teste de Tukey ao nível de probabilidade de erro a 5%. Embrapa, Clima Temperado, Pelotas-RS, 2017.

Conteúdo de pigmentos fotossintéticos (clorofila a, b e total), após aclimatização

Após 35 dias de aclimatização, os índices de clorofila não foram influenciados pelos fatores avaliados (Tabela 8).

Tabela 8. Índice de Clorofila (Clh) A, B e total em folhas de batata-doce, das cultivares BRS Amélia, BRS Cuia e BRS Rubissol, cultivadas em sistema de imersão temporária na combinação do espectro vermelho e azul sob duas concentrações de sacarose no meio de cultivo (15 e 30g L⁻¹), após aclimatização

Cultivares	Clh A (mM)	Clh B (mM)	Clh Total (mM)
BRS Amélia	24,10 ^{ns}	9,43 ^{ns}	33,71 ^{ns}
BRS Cuia	25,11	10,50	35,63
BRS Rubissol	25,42	9,95	36,61
Concentração de Sacarose (g L⁻¹)			
15	24,16 ^{ns}	9,61 ^{ns}	35,21 ^{ns}
30	25,59	10,32	35,42
C.V.(%)¹	11,54	14,59	10,96

C.V. (%)¹ Coeficiente de variação. ^{ns} Não significativo. Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 2017.

O aumento nos índices de clorofila *a*, *b* e *total* após aclimatização, estão relacionados com o aumento no número de folhas e o estímulo da atividade fotossintética das mesmas, visto que, não é mais fornecida a fonte exógena de carbono, assim como o fornecimento da luz natural e maior acesso ao CO₂ (ROCHA, 2005).

Segundo Debergh (1991), para facilitar a aclimatização das plantas deve-se eliminar o uso de sacarose no meio de cultivo. Entretanto, os resultados encontrados nesse trabalho não confirmam essa hipótese, visto que as plantas cultivadas em concentração reduzida de sacarose apresentaram crescimento e taxa de sobrevivência deficiente, provavelmente para que isso seja viável é necessário diminuir os intervalos de aeração e buscar uma intensidade de luz adequada, para estimular a fotossíntese in vitro.

4.3 Experimento 3 - Concentrações de sacarose e espectro vermelho e branco no cultivo de batata-doce em sistema de micropropagação convencional

Verificou-se diferença significativa entre as cultivares e entre as concentrações de sacarose quando avaliado comprimento de parte aérea. A menor média foi observada na cultivar BRS Amélia (1,78cm), diferindo das cultivares BRS Cuia e BRS Rubissol, as quais apresentaram em torno de 2,5cm de altura. A concentração de sacarose de 30g L⁻¹ proporcionou médias significativamente superiores a de 15g L⁻¹ (Tabela 9).

Estes resultados diferem do comportamento verificado para *Melissa officinalis*, uma espécie herbácea, a qual apresentou redução da altura e área foliar das plantas

cultivadas em meios com concentrações de 30 g L⁻¹ de sacarose (RIBEIRO et al., 2007). O mesmo foi observado por Ferreira Júnior (2015), que trabalhando com as mesmas cultivares de batata-doce verificou aumento na parte aérea das plantas cultivadas na concentração de 15g L⁻¹, divergindo dos resultados obtidos nesse trabalho. Tais respostas contraditórias podem ser em função da idade dos explantes utilizados, bem como o tipo de lâmpadas utilizadas pelo referido autor, ou seja, lâmpadas fluorescentes branca-frias, que apresentam espectro de emissão de luz diferentes da utilizada no presente trabalho.

No cultivo in vitro, a sacarose atua como uma fonte de energia e fornece carbonos que serão utilizados durante a respiração e são precursores para a biossíntese de componentes estruturais e funcionais como oligossacarídeos, aminoácidos e outras moléculas necessárias para o crescimento (CALDAS et al. 1998).

O meio de cultura é um dos fatores que mais influencia no crescimento e desenvolvimento das plantas in vitro, determinando seu estado nutricional, a presença e a concentração de nutrientes e fontes de carbono são responsáveis pelo máximo crescimento vegetativo nessa fase e variam de acordo com a espécie e genótipos (CAPALDI, 2002). Marschner (1986), ainda salienta que as maiores taxas de crescimento das plantas no meio semissólido ocorrem nos períodos iniciais do cultivo, graças a maior velocidade de absorção dos nutrientes pelos explantes, devido a maior disponibilidade dos mesmos no meio de cultura.

Foi observado apenas efeito isolado dos fatores no número de folhas das plantas. As cultivares BRS Cuia e BRS Rubissol apresentaram em torno de 4,5 folhas por planta⁻¹, enquanto que a cultivar BRS Amélia apresentou 2,70 folhas por planta⁻¹, média significativamente inferior às demais cultivares. As plantas cultivadas na concentração de 30g L⁻¹ sacarose apresentaram média de folhas por planta superior aquelas cultivadas na concentração de 15g L⁻¹ (Tabela 9). Resultados similares foram encontrados por Ndagijimana et al. (2014), que utilizando várias concentrações de sacarose (0, 15, 30, 60 e 90g L⁻¹) para duas cultivares de batata-doce (Ukerewe e Gihingamukungu), observaram que na concentração de 30g L⁻¹ de sacarose as plantas apresentaram maior comprimento de parte aérea, bem como maior número de folhas.

Tabela 9. Comprimento da parte aérea (CPA), número médio de folhas por planta (NF) e número médio de raízes (NR), de plantas de batata-doce cvs. BRS Amélia, BRS Cuia e BRS Rubissol, cultivadas em meio de cultivo semissólido, sob espectro luminoso vermelho e branco em duas concentrações de sacarose (15e 30g L⁻¹)

Cultivares	CPA (cm)	NF (folha/planta)	NR (raiz/planta)
BRS Amélia	1,78b	2,70b	1,72 ^{ns}
BRS Cuia	2,51a	4,46a	1,88
BRS Rubissol	2,44a	4,53a	1,84
Concentração de Sacarose (g L⁻¹)			
15	1,79b	3,20b	1,33b
30	2,72a	4,64a	2,33a
C.V. (%)¹	41,35	41,05	48,65

C.V.(%)¹ Coeficiente de variação. Médias seguidas por letras minúsculas distintas, na mesma coluna diferem entre si, pelo teste de Tukey ao nível de probabilidade de erro a 5%. ^{ns} Não significativo. Embrapa, Clima Temperado, Pelotas-RS, 2017.

De acordo com Masle (2000), altas concentrações de carbono afetam a expansão e divisão celular na área foliar, no entanto o papel da sacarose no desenvolvimento foliar ainda é pouco conhecido, havendo evidências de que ela esteja associada com o controle do ciclo celular (RIOU-KHAMLICHI et al., 2000). É sugerido que as folhas formadas in vitro, na presença de carboidrato, iniciam importante papel na fotossíntese, contribuindo para a emissão e a expansão de novas folhas in vitro e durante o posterior desenvolvimento ex vitro (YUÉ et al., 1993). Além disso, Hartmann et al. (1990), afirmam que a presença de folhas estimula o enraizamento, visto que as auxinas não são os únicos fatores responsáveis pela rizogênese, sendo necessários outros fatores que normalmente são produzidos pelas folhas e gemas fisiologicamente ativas (CHALFUN et al., 1997).

O fator cultivar não interferiu no número de raízes emitidas (em torno de 1,8 raízes por planta⁻¹), no entanto a concentração de sacarose influenciou esta variável, observando-se que em 30g L⁻¹ de sacarose as plantas apresentaram médias superiores (Tabela 9 e Figura 10).

Para o porta-enxerto de pereira (OH x F97) também foi verificado maior número de raízes nas plantas cultivadas em meios contendo concentrações superiores de sacarose (30 a 45g L⁻¹) (LEITE; FINARDI, 2000). Geralmente as condições utilizadas para o cultivo in vitro não permitem que as plantas realizem a fotossíntese de forma adequada, dessa forma é necessário o fornecimento de sacarose no meio de cultura, a fim de promover o crescimento e a diferenciação dos tecidos (ERIG; SHUCH, 2005; KOZAI et al., 2005).



Figura 10. Plantas de batata-doce cultivadas in vitro em meio semissólido: (A) 'BRS Amélia', (B)'BRS Cuia' e (C) 'BRS Rubissol' contendo 15g L^{-1} de sacarose; (D) 'BRS Amélia', (E) 'BRS Cuia' e (F) 'BRS Rubissol' contendo 30g L^{-1} de sacarose. Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 2017.

Foi observada interação dos fatores cultivar e sacarose, quando avaliado comprimento de raiz. Para todas as cultivares a concentração de 30g L^{-1} , equivaleu as maiores médias, nas quais a cultivar BRS Cuia apresenta média de 6,19cm, equivalendo ao maior comprimento de raiz entre as cultivares (Tabela 10). Resultados similares com a mesma espécie foram obtidos por Souza et al. (1990), em que as maiores concentrações de sacarose no meio de cultura (30 e 40g L^{-1}), proporcionaram plantas com raízes mais longas e ramificadas. De acordo com Rolland et al. (2006), fontes de carbono, nesse caso a sacarose, são essenciais para a produção de hormônios do crescimento (auxinas), as quais induzem o desenvolvimento radicular, no entanto a concentração adequada vai depender da espécie e possivelmente do genótipo em estudo.

Tabela 10. Comprimento médio de raízes (CMR), massa fresca total e massa seca total, de plantas de batata-doce cvs. BRS Amélia, BRS Cuia e BRS Rubissol, cultivadas em meio de cultivo semissólido, sob espectro luminoso vermelho e branco em duas concentrações de sacarose (15e 30g L⁻¹)

Parâmetros Morfológicos	Sacarose (g L ⁻¹)	Cultivares		
		BRS Amélia	BRS Cuia	BRS Rubissol
CMR (cm)	15	1,45Cb	3,85Ab	2,47Bb
	30	2,56Ca	6,19Aa	4,33Ba
C.V (%)¹			48,24	
Massa Fresca (g planta ⁻¹)	15	0,11Bb	0,21Ab	0,13Bb
	30	0,22Ba	0,29Aa	0,24Ba
C.V (%)¹			33,10	
Massa Seca (g planta ⁻¹)	15	0,008Bb	0,018Aa	0,012Bb
	30	0,012Ba	0,030Aa	0,022Aa
C.V (%)¹			48,91	

C.V.(%)¹ Coeficiente de variação. Médias seguidas por letras maiúsculas distintas, na mesma linha (cultivar) e médias seguidas por letras minúsculas, na mesma coluna (concentração de sacarose) diferem entre si, pelo teste de Tukey ao nível de probabilidade de erro a 5%. Embrapa, Clima Temperado, Pelotas-RS, 2017.

Para as variáveis massa fresca e massa seca total, foi verificada interação dos fatores cultivar e sacarose. As maiores médias foram observadas na concentração de 30g L⁻¹ de sacarose. A cultivar BRS Amélia apresentou a menor média de massa seca (0,012g), correspondendo as demais variáveis avaliadas em que apresentou as menores taxas de crescimento (Tabela 10).

Esses resultados corroboram com os resultados obtidos por Ferreira Júnior (2015), estudando as mesmas cultivares, observou que a cultivar BRS Amélia apresentou menores taxas de crescimento em meio semissólido que as cultivares BRS Cuia e BRS Rubissol. Segundo Castro e Andrade (1995) e Oliveira et al., (2008), muitas vezes, faz-se necessário testar diferentes composições de meio nutritivo no sentido de otimizar a produção de mudas nas diferentes cultivares, visto que seus comportamentos são distintos. O incremento da massa fresca e massa seca total também foi verificado por Fila et al. (1998) e Desjardins (1995), no qual as plantas de videira e morango cultivadas em meio de cultivo concentrações iguais ou superiores a 30g L⁻¹ de sacarose. O fato das plantas apresentarem maior massa total na concentração de 30g L⁻¹, está associado à sacarose ser o açúcar mais comum translocado em plantas, representando, muitas vezes, mais de 95% da massa da matéria seca (ZIMMERMANN; ZIEGLER, 1975; GEORGE; CLERK, 2008).

Não foi observada a presença de brotações nas plantas cultivadas em meio semissólido, o que difere do estudo realizado por Ferreira Júnior (2015), com plantas de batata-doce das mesmas cultivares, as quais apresentaram em torno de 1,5 brotação por planta. No entanto, o autor utilizou lâmpadas fluorescentes brancas, as quais não são monocromáticas, podendo exibir comprimento de onda da luz azul, a qual está relacionada com a quebra da dominância apical, devido à associação com degradação das auxinas. Segundo Etienne e Berthouly (2002), o meio semissólido está frequentemente associado a baixa taxa de multiplicação, característica que pode estar relacionada com a pouca possibilidade de trocas gasosas no sistema tradicional.

Conteúdo de pigmentos fotossintéticos (clorofila a, b e total)

O fator cultivar não influenciou no conteúdo de pigmentos fotossintéticos, entretanto, foi observado efeito das concentrações de sacarose, nas quais a concentração de 30g L^{-1} , apresentou as maiores médias para todas as variáveis (Tabela 11). Este resultado se contrapõe as de Dalton e Street (1977) e Gro et al. (1993), os quais observaram, respectivamente, em espinafre (*Spinacea oleracea* L.) e amendoim (*Arachis hypogea* L.), que o conteúdo de clorofila a, b e total, decresceram conforme a concentração de sacarose no meio de cultura aumentou.

Diversos trabalhos relatam que a presença de sacarose no meio de cultivo tem sido considerada a principal causa da redução nos teores de clorofila, enquanto que baixos níveis de sacarose no meio de cultura foram correlacionados com um potencial elevado de produção de carboidrato pelas vias fotossintéticas (KANECHI et al., 1998). No entanto de acordo com Tichá et al. (1998), a adição de açúcares ao meio de cultura parece ter um papel ambíguo, ao mesmo tempo pode influenciar no decréscimo das concentrações de clorofilas de algumas espécies ou apresentar ação benéfica no acúmulo de clorofilas para outras, como foi o caso da batata-doce nas condições desse estudo.

Tabela 11. Índice de Clorofila (Clh) A, B e total em folhas de batata-doce, das cultivares BRS Amélia, BRS Cuia e BRS Rubissol, cultivadas em meio semissólido na combinação do espectro vermelho e branco sob duas concentrações de sacarose no meio de cultivo (15 e 30g L⁻¹)

Cultivares	Clh A (mM)	Clh B (mM)	Clh Total (mM)
BRS Amélia	16,29 ^{ns}	3,67 ^{ns}	19,96 ^{ns}
BRS Cuia	13,57	3,14	16,72
BRS Rubissol	15,60	3,74	19,35
Concentração de Sacarose (g L⁻¹)			
15	13,46b	3,14b	16,61b
30	16,81a	3,89a	20,70a
C.V. (%)¹	29,13	37,62	28,93

C.V. (%)¹ Coeficiente de variação. Médias seguidas por letras minúsculas distintas, na mesma coluna diferem entre si, pelo teste de Tukey ao nível de probabilidade de erro a 5%. ^{ns}Não significativo. Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 2017.

Aclimatização

A maior porcentagem de sobrevivência (93,3%) foi observada nas plantas da cultivar BRS Cuia advindas do meio de cultura acrescido de 30g L⁻¹ de sacarose (Tabela 12). Outras espécies cultivadas em concentração de sacarose a 30g L⁻¹, apresentaram melhores taxas de aclimatização, quando comparada a concentrações menores de sacarose, como no cultivo in vitro de tabaco (FURBANK et al., 1997; TICHÁ et al., 1998) e batata (COURNAC et al., 1991).

A sobrevivência ex vitro pode estar associada aos múltiplos papéis dos açúcares solúveis na fisiologia celular, já que fornecem substratos para síntese de macromoléculas e também podem servir como um sinal molecular para a regulação de enzimas chaves do metabolismo do carbono (LE et al., 2001). As adaptações induzidas às plântulas cultivadas in vitro quando levadas ao ambiente ex vitro consistem em modificações morfoanatômico-fisiológicas necessárias às plantas para que possam sobreviver em um novo ambiente (CARVALHO et al., 1999).

Em batata-doce, e na maioria das culturas, a micropropagação convencional é feita em condições heterotróficas, onde os explantes são cultivados em frascos hermeticamente ou semi-hermeticamente fechados, impedindo que ocorram trocas gasosas entre o ambiente interno e externo, não favorecendo a atividade fotossintética das plantas in vitro e mantendo a umidade elevada, o que leva a alterações fisiológicas nas plantas e dificulta sua aclimatização (BARBOZA et al., 2006; DEB; IMCHEN, 2010; FLORES et al., 2015).

Tabela 12. Porcentagem de aclimatização de três cvs. de plantas de batata-doce, cultivadas em meio semissólido, sob combinação de espectro vermelho e branco, submetidas a duas concentrações de sacarose 15 e 30g L⁻¹

Cultivar	Concentração de sacarose	N° de plantas transplantadas	Sobrevivência (%)
BRS Amélia	15	15	60
	30	15	73,3
BRS Cuia	15	15	80
	30	15	93,3
BRS Rubissol	15	15	53,3
	30	15	66,6

Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 2017.

Parâmetros morfológicos após aclimatização

Após 35 dias de transplante para casa de vegetação, não houve interação entre os fatores sacarose e cultivar para as variáveis analisadas, sendo observado apenas o efeito isolado dos mesmos. Em relação ao comprimento da parte aérea a cultivar BRS Cuia diferiu das demais apresentando a maior média de 5,32cm por planta⁻¹, assim como para número de folhas (4,90 folhas por planta⁻¹). Já para a variável comprimento de raiz a 'BRS Amélia' apresentou a maior média (3,94cm). Em relação ao efeito da sacarose a concentração de 30g L⁻¹ foi significativamente superior a concentração de 15g L⁻¹ (Tabela 13).

Esses resultados diferem do estudo com *Ceratoria siliqua* L., o qual mostrou que diminuindo a concentração de carboidratos adicionados ao meio de cultivo, as plantas demonstraram área foliar maior e taxa de aclimatização mais eficiente (VINTERHALTER et al., 2001). Entretanto, para orquídeas, Moreira et al. (2013), observaram que a maior concentração de sacarose no meio de cultivo, proporcionou plantas com maior crescimento e maiores taxas de sobrevivência ex vitro (KADLECEK et al. 2001). Isso demonstra que o aumento ou redução da concentração de carboidratos no meio de cultivo irá depender da espécie e das cultivares em estudo (SOLAROVA et al., 1989; LIM et al., 1992; CALVETE, 1998; LEITE et al., 2000).

Tabela 13. Comprimento da parte aérea (CPA), número médio de folhas por planta (NF) e comprimento médio de raízes (CMR), de plantas de batata-doce, previamente cultivadas em meio de cultivo semissólido, na combinação de espectro vermelho e branco, em duas concentrações de sacarose (15e 30g L⁻¹), após 35 dias de aclimatização

Cultivares	CPA (cm)	NF (folhas/planta)	CMR (cm)
BRS Amélia	3,27b	3,00b	3,94a
BRS Cuia	5,32a	4,90a	3,79b
BRS Rubissol	3,82b	4,82a	3,59c
Concentração de Sacarose (g L⁻¹)			
15	3,36b	3,40b	3,55b
30	4,91a	4,20a	3,99a
C.V. (%)¹	24,51	23,76	10,94

C.V. (%)¹ Coeficiente de variação. Médias seguidas por letras minúsculas distintas, na mesma coluna diferem entre si, pelo teste de Tukey ao nível de probabilidade de erro a 5%. Embrapa, Clima Temperado, Pelotas-RS, 2017.

Conteúdo de pigmentos fotossintéticos (clorofila *a*, *b* e *total*), após aclimatização

Após 35 dias de aclimatização, os índices de clorofila não sofreram influência das cultivares nem para as concentrações de sacarose (Tabela 14). O mesmo foi observado por Buch (2005), após 30 dias de cultivo ex vitro as plantas de agave, cultivadas em diferentes concentrações de sacarose in vitro, não apresentavam mais diferença significativas para os índices de clorofila *a*, *b* e *total*.

Tabela 14. Índice de Clorofila (Clh) A, B e total em folhas de batata-doce, das cultivares BRS Amélia, BRS Cuia e BRS Rubissol, cultivadas em meio de cultivo semissólido na combinação do espectro vermelho e branco sob duas concentrações de sacarose no meio de cultivo (15 e 30g L⁻¹), após aclimatização

Cultivares	Clh A (mM)	Clh B (mM)	Clh Total (mM)
BRS Amélia	24,28 ^{ns}	9,65 ^{ns}	34,19 ^{ns}
BRS Cuia	25,86	9,88	35,99
BRS Rubissol	24,19	10,24	34,33
Concentração de Sacarose (g L⁻¹)			
15	25,23 ^{ns}	10,22 ^{ns}	35,66 ^{ns}
30	25,65	10,30	36,13
C.V.(%)¹	13,33	15,04	13,30

C.V. (%)¹ Coeficiente de variação.^{ns}Não significativo. Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 2017.

O aumento nos índices de clorofila, após aclimatização, estão relacionados com o surgimento de novas folhas e aumento da intensidade luminosa. Durante a aclimatização, as folhas emitidas no durante o cultivo in vitro, assumem

características intermediárias entre folhas crescidas in vitro e aquelas crescidas em casa de vegetação. A partir das reservas e da atividade fotossintética dessas folhas, irão surgir folhas novas a fim de estabelecer a condição autotrófica e melhorar a regulação hídrica das plantas (SUTTER; LANGHANS, 1988; CAPELLADES et al. 1990; SMITH et al., 1995).

Diante dos resultados obtidos nesse experimento, confirmou-se que as três cultivares de batata-doce, nessas condições de cultivo, apresentaram comportamento tipicamente heterotrófico, sendo dependentes da sacarose como fonte de carbono para o crescimento e desenvolvimento das plantas in vitro.

5. Conclusões

- A concentração de 30g L^{-1} de sacarose no meio de cultivo proporciona maior crescimento in vitro e taxas de sobrevivência de plantas de batata-doce ex vitro;

- O uso da combinação de espectro vermelho e azul proporciona maior comprimento da parte aérea, número de folhas e comprimento de raiz quando comparado ao espectro vermelho e branco.

- A 'BRS Rubissol' tem melhor desempenho no sistema convencional, a 'BRS Amélia' no sistema de imersão temporária, enquanto a 'BRS Cuia' desenvolve-se igualmente independente do sistema de cultivo utilizado.

6. Considerações finais

- Embora a cultivar BRS Rubissol tenha apresentado resultados mais expressivos no cultivo convencional, mais estudos devem ser realizados, visto que a utilização do biorreator de imersão temporária proporciona presença de brotações e maior taxa de aclimatização em relação ao meio semissólido. Além disso, é uma prática automatizada, a qual exige menor manipulação da cultura in vitro, diminuindo os índices de contaminação e os custos com mão de obra e com agente gelificante.

- Diante da utilização da mesma composição de meio de cultura para os dois sistemas de cultivo (biorreator de imersão temporária e convencional), é importante testar formulações diferentes, já que a sensibilidade das células e tecidos pode variar consideravelmente no meio líquido e semissólido.

- Como não foram encontrados estudos com cultivo in vitro de batata-doce em biorreator de imersão temporária, novos períodos de imersão, intervalos de aeração e intensidades luminosas devem ser testados com o propósito de promover o fotoautotrofismo in vitro. Ademais, faz-se necessário ensaio com diferentes volumes de meio de cultivo, para determinar se 50mL por explante⁻¹, utilizados nesse estudo são imprescindíveis para o sucesso da obtenção de plantas ou é possível diminuir essa quantidade, a fim de reduzir os custos de produção das mudas.

- Ao longo das pesquisas realizadas, foi possível verificar que as cultivares 'BRS Amélia', 'BRS Cuia' e 'BRS Rubissol' respondem diferentemente quanto às condições de cultivo testadas. Neste sentido, sugere-se a realização de testes com outras cultivares a fim de avaliar se o componente genético é preponderante.

Referências

- ALAM, I.; SHARMIN, A. S.; NABER, M. K.; ALAM, M. J. Effect of growth regulators on meristem culture and plantlets establishment in sweet potato [*Ipomoea batatas* L.]. **Plant Omics Journal**, Lismore, vol. 3, n. 2, p. 35-39, 2013.
- ALMEIDA, M. L.; MUNDSTOCK, C. M. O afillamento da aveia afetado pela qualidade de luz em plantas sob competição. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 31, n. 3, p. 393-400, 2001.
- ALONI, R. Role of auxin and sucrose in the differentiation of sieve and tracheary elements in plant tissue cultures. **Planta**, Bonn, v. 150, n. 3, p. 255-263, 1980.
- ALVES, J. M. C. **Cultivo in vitro de batata-doce (*Ipomoea batatas* L.)**. (1988). 82p. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras, 1988.
- AMÂNCIO, S.; REBORDÃO, J.P.; CHAVES, M.M. Improvement of acclimatization of micropropagated grapevine: Photosynthetic competence and carbon allocation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, London, v. 58, p. 31–37, 1999.
- AMBRÓSIO, S.T.; MELO, N.F. Interaction between sucrose and pH during in vitro culture of *Nephrolepis biserrata* Schott (Pteridophyta). **Acta Botânica Brasileira**, Belo Horizonte, v. 18, n. 4, p. 809-813, 2004.
- ANUÁRIO BRASILEIRO DE HORTALIÇAS. **Brazilian Vegetable Yearbook**. Santa Cruz do Sul: Gazeta. 2016. 88p.
- ARIGITA, L.; GONZÁLEZ, A.; TAMÉS, R. S. Influence of CO₂ and sucrose on photosynthesis and transpiration of *Actinidia deliciosa* explants cultured in vitro. **Physiologia Plantarum**, Sweden, v. 115, n. 1, p.166-173, 2002.
- ASSIS, M. Novas tecnologias na propagação de batata. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.20, n.197, p.30-33, 1999.
- AUSTIN, D. F. **The taxonomy, evolution and genetic diversity of sweet potatoes and related wild species**. Peru: International Potato Center (CIP). 1987. 59p.
- AZCÓN-BIETO, J. The control of photosynthetic gas exchange by assimilate accumulation in wheat. **Biological Control of Photosynthesis**, Diepenbeek, v.22, p. 231-240, 1986.
- BADR, A; ANGERS, P.; DESJARDINS, Y. Metabolic profiling of photoautotrophic and photomixotrophic potato plantlets (*Solanum tuberosum*) provides new insights into acclimatization. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, London, v.107, n.1, p.13-24, 2011.
- BAKER, E. A. The influence of environment on leaf wax development in *Brassica oleraceavar. gemmifera*. **New Phytologist**, New Jersey, v. 73, p. 955-966. 1974.

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

BARANDALLA, L.; SANCHEZ, I.; RITTER, E.; GALARRETA, J. Conservation of potato (*Solanum tuberosum*) cultivars by cryopreservation. **Spanish Journal of Agricultural Research**, Madri, v.4, p.9-13, 2003.

BARBOZA, S.B.S.C.; GRACIANO-RIBEIRO, D.; TEIXEIRA, J.B.; PORTES, T.A.; SOUZA, L.A.C. Anatomia foliar de plantas micropropagadas de abacaxi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.41, p.185-194, 2006.

BARRUETO, C.L.P. A propagação in vitro de plantas. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Natal, v.19, p.16-21, 2001.

BESSION, J.C.F. Fontes e concentrações de carboidratos no crescimento vegetativo e no enraizamento in vitro de *Miltonia flavescens*. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v.8, n.1, p.9-13, 2010.

BORÉM, A.; MIRANDA, G.V. **Melhoramento de plantas**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2005. 525 p.

BORKOWSKA, B. Morphological and physiological characteristics of micropropagated strawberry plants rooted in vitro or ex vitro. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 89, p. 195-206, 2001.

BOVELL-BENJAMIN, A.C. Sweet potato: a review of its past, present, and future role in human nutrition. **Advances in Food and Nutrition Research**, New York, v. 52, p. 1-59, 2007.

BUCH, E. **Aspectos morfo-fisiológicos e metabólicos durante a fase de pré-aclimatização e aclimatização de Agave**. 2005. 111 f. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos) – Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

BULA, R. J. Light-emitting diodes as a radiation source for plants. **Horticulture Science**, Prague, v. 26, p. 203-205, 1991.

CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M.E. Meios nutritivos. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa CENARGEN, 1998. p.87-132.

CALVETE, E.O. **Concentração de sacarose in vitro e seleção de substratos para aclimatização ex vitro de morangueiro cv campinas (*Fragaria ananassa* Duch.)**. 1998. 108f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Programa de Pós-graduação em Fitotecnia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1998.

CALVETE, E.O.; KÄMPF, A.N.; SUZIN, M. Concentração de sacarose no enraizamento in vitro de morangueiro. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 20, n. 2, p.186-191, 2002.

CAMPOS, D.M. **Orquídea: manual prático de reprodução**. 3.ed. Rio de Janeiro: Expressão e Cultura, 2002. 143p.

CAPALDI, F. R. **Avaliação de diferentes fontes de nitrogênio em explantes de *Cryptomeria japonica* D. DON “Elegans” Cultivadas in vitro: Bioquímica e Relações entre reguladores vegetais**. 2002. 84f. Dissertação (Mestrado em Recursos Florestais) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

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**, London, v.25, p.21-26, 1991.

CAPELLADES, M. Environment influences anatomy of stomata and epidermal cells in tissue-cultured *Rosa multiflora*. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Boston, v.115, n.1, p.141-145, 1990.

CAPUANO, G.; PICCIONI, E.; STANDARDI, A. Effect of different treatments on the conversion of M.26 apple rootstock synthetic seeds obtained from encapsulated apical and axillary micropropagated buds. **Journal Horticultural Science Biotechnology**, Warwick, v.73, p.299-305, 1998.

CARVALHO, A. C., TORRES, A. C., BRAGA., E. J. B., LEMOS, E. E., SOUZA, F. V., WILLADINO, L., CÂMARA, T. R. Glossário de Cultura de Tecidos de Plantas. **Plant Cell Culture and Micropropagation**, Lavras, v. 7. n.1, p. 30-60, 2011.

CARVALHO, G.R.; PASQUAL, M.; RESENDE, E.; SCARANTE, M.J. Aclimatização de plantas de cafeeiro (*Coffea arabica* L.) propagadas in vitro. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.23, p.483-490, 1999.

CASSANA, F. F.; LIMA, C. S. M.; FALQUETO, A. R.; BACARIN, M. A.; BRAGA, E. J. B.; PETERS, J. A. Fluorescência das clorofilas em plantas de batata-doce (*Ipomoea batatas* L.) cultivadas in vitro e aclimatizadas. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, p. 867-869, 2007.

CASTRO, L. A. S. e BECKER, A. **Batata-doce BRS Amélia**. (2011)a. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/clima-temperado/busca-de-produtos-processos-e-servicos/-/produto-servico/599/batata-doce---brs-amelia>> . Acesso: 03 de março de 2017.

CASTRO, L. A. S. e BECKER, A. **Batata-doce BRS- BRS Rubissol**.(2011)b. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/906299/batata-doce-BRS-Rubissol>>. Acesso: 03 de março de 2017.

- CASTRO, L. A. S.; DUTRA, L. F.; BECKER, A. Produção de mudas de batata-doce. In: _____ **Hortaliças de propagação vegetativa, tecnologia de multiplicação**. Brasília, DF: Embrapa, 2016. p. 100-127.
- CASTRO, L. A. S.; TREPTOW, R. e BECKER, A. **Potencialidade da cultivar de batata-doce BRS Cuia como matéria prima para a produção de etanol**. (2012). Disponível em: <[https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/946597/potencialidade-da-cultivar-de-batata-doce-BRS Cuia-como-materia-prima-para-a-producao-de-etanol](https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/946597/potencialidade-da-cultivar-de-batata-doce-BRS-Cuia-como-materia-prima-para-a-producao-de-etanol)>. Acesso: 03 de março de 2017.
- CASTRO, O.F.A.; ANDRADE, A.G. Cultura de meristemas de batata-doce [*Ipomoea batatas* (L.)]. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, vol.30, n.7, p.17-22, 1995.
- CHALFUN, N.N.J.; HOFFMANN, A.; CHALFUN, A.J.; JESUS, A.M. S. Efeito da auxina e do anelamento no enraizamento de estacas semi lenhosas de azaléias. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 21, p. 516-520, 1997.
- CHAMOVITZ, D. A.; DENG, W. Light signaling in plants. **Critical Reviews in Plant Science**, Orlando, v.15, p. 455-478, 1996.
- CHANG, H. S. et al. Micropropagation of *Gallia lili* (*Zantedeschia albomaculata*) via in vitro shoot tip proliferation. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, New York, v. 39, p.129-134, 2003.
- CHU, E.P.; RIBEIRO, R.C.L.F. Growth and carbohydrate changes in shoot cultures of *Dioscorea* species as influenced by photoperiod, exogenous sucrose and cytokinin concentrations. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, London, v.70, p. 241-249, 2002.
- CHUNG, J. P.; HUANG, C. Y.; DAI, T. E. Spectral effects on embryogenesis and plantlet growth of *Oncidium* 'Gower Ramsey'. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 124, p. 511-516, 2010.
- CIP - Centro Internacional de La Papa. **Sweet potato (*Ipomoea batatas* L.)** (2010). Disponível em: <<http://www.cipotato.org/sweetpotato.html>>. Acesso: 18 fevereiro, 2017.
- CIRRILO, M. A.; FERREIRA, D. F.; LIMA, P. S. G. Uma alternativa para avaliar eficiência de meios de cultivo in vitro via modelo de regressão logística. **Ciências Exatas e Tecnológicas**, Londrina, v. 24, p. 101-110, 2003.
- CLAUSSEN, J. W. Acclimation abilities of three tropical rainforest seedlings to an increase in light intensity. **Forest Ecology and Management**, Sydney, v. 80, p. 245-255, 1996.
- COLLINS, M. T.; DIXON, K. W. Micropropagation of an Australian terrestrial orchid. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, West Perth, v. 32, n. 1, p. 131-135, 1992.

CONNER, A.J.; ABERNETHY, D.J; FALLOON, P.G. Importance of in vitro storage root development for the successfull of micropropagated asparagus plants to greenhouse conditions. **HortScience**, Virgínia, v. 20, n. 4, p. 477-481, 1992.

CORRÊA, R.M.; PINTO, J.E.B.P.; BERTOLUCCI, S.K.V.; REIS, E.S.R.; SOUZA, A.V.S. Potencial do carvão ativado, filtro amarelo e interação do fotoperíodo e temperatura na formação de raízes tuberosas de batata-doce in vitro. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.33, n.3, p.423-430, 2003.

COUCEIRO, M.A. **Organogênese in vitro em segmentos de hipocótilo de maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis f. flavicarpa*)**. 2002. 95 p.Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2002.

COURNAC, L.; DIMON, B.; CARRIER, P.; LOHOU, A.; CHAGVARDIEFF, P. Growth and photosynthetic characteristics of *Solanum tuberosum* plantlets cultivated in vitro in different conditions of aeration, sucrose supply, and CO₂ enrichment. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 97, p. 112–117, 1991.

COUTO, M. **Propagação in vitro dos porta-enxertos híbridos de pessegueiro "Barrier" e "Cadman" (*Prunus sp.*)**. 2003. 83p. Dissertação (Mestrado em Agronomia - Fruticultura de Clima Temperado) - Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2003.

DALE, J.E. The control of leaf expansion. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v.39, p.267-295, 1988.

DALTON, C.C.; STREET, H.E. The influence of applied carbohydrates on the growth and greening of cultured spinach (*Spinacea oleracea* L.) cells. **Plant Science Letters**, San Diego, v.10, p.157-164, 1977.

DAMIANO, C., PALOMBI, M. A., La micropropagazione 20 anni dopo: innovazion techiche e ottimizzazione dei protocolli delle colture in vitro. **Rivista de Frutticultura**, Nápoles, v. 22, p. 48-55, 2000.

DARKO, E. et al. Photosynthesis under artificial light: The shift in primary and secondary metabolism. **Philosophical and Transactions of the Royal Society Biological**, London, v.369, p.1-7, 2014.

DARNELL, R.L.; BIRKhold, K.B. Carboydrate contribution to fruit development in two phenologically distinct rabbit eye blueberry cultivars. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Boston, v. 121, p. 1132-1136, 1996.

DAROS, M.; AMARAL JR.; A.T., PEREIRA, T.N.S.; LEAL, N.R.; FREITAS, S.P. Caracterização morfológica de acessos de batata-doce. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 20 p. 43-47, 2002.

DEB, C.R.; IMCHEN, T. An efficient in vitro hardening technique of tissue culture raised plants. **Biotechnology**, New York, v.9, p. 79-83, 2010.

DEBERG, P.C. Control of in vitro plant propagation. In: CROCOMO, O.J.; SHARP, W.R.; MELO, M. **Biotechnology para produção vegetal**. Piracicaba: CEBTEC, 1991. p.3-8.

DEBERGH, P. C. & MAENE, L. J.A scheme for commercial propagation for ornamental plants by tissue culture. **Scientia Horticulture**, Amsterdam, v. 14, p. 335 - 345, 1981.

DECETTI, S. F. C. **Ambiente de cultivo e respostas morfofisiológicas durante o processo de micropropagação de *Annona glabra* L.** 2004. 93 p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2004.

DEL ROZARIO, A. G.; DE GUZMAN, E. V. The growth of Makapuno coconut embryos in vitro as affected by mineral composition and sugar level of the medium during the liquid and solid culture. **Philippine Journal of Science**, v. 105, p. 215-222, 1981.

DESJARDINS, Y. Overview of factors influencing photosynthesis of micropropagated plants and their effect on acclimatization. In: CARRE, F. and CHAGVARDIEFF, P. **Ecophysiology and Photosynthetic in vitro cultures**, Cadarache: CEA, 1995. p.145 – 160.

DIÁZ-PÉREZ JC; SHACKEL KA; SUTTER EG. Effects of in vitro formed roots and acclimatization on water status and gas exchange of tissue cultured apple shoots. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Boston, v.120, p. 435-440, 1995.

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

DING, Y. Effects of a new light source (cold cathode fluorescent lamps) on the growth of tree peony plantlets in vitro. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.125, p. 167-169, 2010.

DUTRA, L. F.; WENDLING, I.; BRONDANI, G. E. A micropropagação de eucalipto. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Brasília, v. 58, p. 49-59, 2009.

EDMOND, J.B.; AMMERMAN, G.R. **Sweet potatoes: production processing marketing**. Wesport: The Air Publishing Company, 1971.105p.

EMBRAPA - **Banco Ativo de Germoplasma de Batata-doce.** (2015). Disponível em: < <http://plataformarg.cenargen.embrapa.br/rede-vegetal/projetos-componentes/pc14-bancos-de-germoplasma-de-raizes-e-tuberculos/planos-de-acao/pa3-banco-ativo-de-germoplasma-de-batata-doce>> Acesso em: 20 de dezembro de 2016.

- ENGEL, V. L.; POGGIANI, F. Estudo da concentração de clorofilas nas folhas e seu espectro de absorção de luz em função do sombreamento em mudas de quatro espécies florestais nativas. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Brasília, v. 3, n. 1, p. 39-45, 1991.
- ERIG, A. C.; SCHUCH, M. W. Tipo de luz na multiplicação in vitro de framboeseira (*Rubus idaeus* L.) 'Batum'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 27, n. 2, p. 488-490, 2005.
- ETIENNE, H.; DECHAMP, E.; BARRY-ETIENNE, D.; BERTRAND, B. Bioreactors in coffee micropropagation. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Londrina, v.18, p.45-54, 2006.
- FERREIRA, D. F. Sisvar: a guide for its bootstrap procedures in multiple comparisons. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 38, p. 109-112, 2014.
- FERREIRA JÚNIOR, M. U. **Utilização de Biorreatores de Imersão Temporária na Micropropagação de Batata-Doce**. 2015. 50p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) Universidade Federal de Pelotas, 2015.
- FERREIRA, L. T.; SILVA, M. M. A.; MACEDO, C. R.; WILLADINO, L. Fonte de luz e concentração de sacarose no cultivo in vitro da cana-de-açúcar (RB867515). **Plant Cell Culture and Micropropagation**, Lavras, v.12, p. 46-52, 2016.
- FEUSER, S. **Micropropagação de abacaxizeiro (*Ananascomosus*) e avaliação da fidelidade genotípica por marcadores moleculares**. 2000. 70p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2000.
- FEUSER, S.; MELER, K.; DAQUINTA, M.; GUERRA, M.P.; NODARI, R.O. Genotypic fidelity of micropropagated pineapple (*Ananas comosus*) plantlets assessed by isozyme and RAPD markers. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, London, v.72, p.221-227, 2003.
- FILA, G.; GHASHGHAIE, J.; HOARAU, J.; CORNIC, G. Photosynthesis, leaf conductance and water relations of in vitro cultured grapevine rootstock in relation to acclimatization. **Physiology Plantae**, Porto Alegre, v.102, p. 411 - 418, 1998.
- FLORES, R. **Cultura de tecidos e produção de B-ecdisona em *Pfaffia glomerata* e *Pfaffia tuberosa* (*Amaranthaceae*)**. 2006. 168 p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2006.
- FLORES, R.; LESSA, A.O.; PETERS, J.A.; FORTES, G.R.L. Efeito da sacarose e do benomyl na multiplicação in vitro da macieira, **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.34, n. 12, p. 2363-2368, 1999.
- FLORES, R.; MAGGIO, L. P.; BEMPCK, G. S.; GODOI, R. S. FRANZIN, S. M. Otimização da produção de plantas in vitro de cultivares de *Ipomoea batatas*. **Revista de Ciências Agrárias**, Santa Maria, v.38, p. 429-437, 2015.

FLORES, R.; ULIANA, S.C.; PIMENTEL, N.; GARLET, T.M.B. Sacarose e sorbitol na conservação in vitro de *Pfaffia tuberosa* (Amaranthaceae). **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, San Diego, v.4, p.192-199, 2013.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS–FAO. **Estatísticas Banco de dados, 2016**. Disponível em: <<http://faostat3.fao.org/home/Edados>>. Acesso em: 15 janeiro de 2017.

FRANKEL, O.H.; HAWKES, J.G. DODDS, J.H. **Experiments in Plant Tissue Culture**. Cambridge: Cambridge University Press, 1986, 231 p.

FREITAS C.; CARVALHO, V.; NIEVOLA, C. C. Effect of sucrose concentrations on in vitro growth and subsequent acclimatization of the native bromeliad. **Biotemas**, Florianópolis, v.28, p. 37-42, 2015.

FURBANK, R.T.; PRITCHARD, J.; JENKINS, C.L.D. Effects of exogenous sucrose feeding on photosynthesis in the C3 plant tobacco and the C4 plant. **Australian Journal Plant Physiology**, Sydney, v. 24, p. 291–299, 1997.

GALDIANO JUNIOR, R.F. Concentrações de sacarose no desenvolvimento in vitro e na aclimatização de *Cattleya*. **Ciências Agrárias**, Santa Maria, v.34, p.583-592, 2013.

GAMBORG, O.L. The effects of amino acids and ammonium on the growth of plant cells in suspension culture. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 45, p. 372-375, 1970.

GARCIA, A., PETERS, J.A., PIEROBOM, C.R. Principais problemas da cultura da batata-doce e algumas recomendações de pesquisa. **HortiSul**, Pelotas, v. 1, p. 30-33, 1989.

GEIGER, D.R.; SERVAITES, J.C. **Response of plants to multiple stresses**. San Diego: Academic Press, 1991. 422 p.

GEORGE, E. F. **Plant Propagation by Tissue Culture**. Part 2: In Practice. Edington: Exegetics, 1996. 1361p.

GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; De KLERK, J. **Plant Propagation by Tissue Culture**. 3ed. Dordrecht: Springer. 2008. 501 p.

GEORGE, E.F. **Plant propagation by tissue culture: the components of culture media**. 2ed. Great Britain: Exegetics, 1993. 574p.

GEORGIEV, V., SCHUMANN, A., PAVLOV, A., e BLEY, T. Temporary immersion systems in plant biotechnology. **Engineering in Life Science**, Manchester, v.14, p. 607-621, 2014.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP/Embrapa, 1990. p.99-170.

GRIBAUDO, I.; RESTAGNO, M.; NOVELLO, V. Vented vessels affect growth rate of in vitro *Vitis vinifera*. **Acta Horticulture**, Amsterdam, v. 1, p. 129-133, 2003.

GRO, B.; GILLES, F.; BENDER, L.; BERGHOFER, P.; NEUMANN, K. The influence of sucrose and an elevated CO₂ concentration of photosynthesis of photoautotrophic peanut (*Arachis hypogea* L.) cell cultures. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, London, v. 33, p. 143-150, 1993.

GROUT, B.W.W.; MILLAN, S. Photosynthetic development of micropropagated strawberry plantlets following transplanting. **Annals Botany**, London, v. 55, p. 121-131, 1985.

GUPTA, S. D.; JATOTHU, B. Fundamentals and applications of light-emitting diodes (LEDs) in in vitro plant growth and morphogenesis. **Plant Biotechnology Reports**. Amsterdam, v.7, n.3, p.211- 220, 2013.

HAHN, E.J.; KOZAI, T.; PAEK, K.Y. Blue and red light emitting diodes with or without sucrose and ventilation affect in vitro growth of *Rehmannia glutinosa* plantlets. **Journal of Plant Biology**, Limerick, v.43, p.247-250, 2000.

HAIMEIRONG; KUBOTA, F. The effects of drought stress and leaf ageing on leaf photosynthesis and electron transport in photosystem 2 in sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) cultivars. **Photosynthetica**, Prague, v. 41, p. 253-258, 2003.

HALL, D.O.; RAO, K.K. **Coleção Temas de Biologia: Fotossíntese**. São Paulo: Editora Pedagógica e Universitária. 1980. 89p.

HARTMANN, H. T. **Hartman & Kester's plant propagation: principles and practices**. New Jersey: Prentice Hall, 2011. 928 p.

HARTMANN, H.T.; KESTER, D.E.; DAVIES JUNIOR, F.T. **Plant propagation: principles and practices**. 5.ed. Englewood Cliffs: Prentice-Hall, 1990. 647 p.

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

HEO, J. W. Light quality affects in vitro growth of grape 'Teleki 5BB'. **Journal of Plant Biology**, Limerick, v. 49, n. 9, p. 276-280, 2006.

HORTON, P.; RUBAN, A. Molecular design of the photosystem II light harvesting antenna: photosynthesis and photoprotection. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.56, n. 411, p. 365–373, 2005.

HUAMÁN, Z. **Descriptors for sweet potato**. Peru: Centro Internacional de la Papa/Asian Vegetable Research and Development Center, 1992. 134p.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA- IBGE. **Produção Nacional de batata-doce**, 2013. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/pam/tabela1pam.shtm>>. Acesso em: 15 janeiro de 2017.

JHA, S.N. Colour measurements and modeling. In: _____ **Nondestructive evaluation of food quality**. Berlin: Springer, 2010. p.17-40.

JONES, A. Should Nishiyama's K123 (*Ipomoea trifida*) be designated *I. batatas*? **Economic Botany**, New York, v.21, p. 163-166, 1967.

KADLECEK, P., TICHÁ, I., HASEL, D., CAPKOVÁ, V., SCHAFER, C. Importance of in vitro pretreatment for ex vitro acclimatization and growth. **Plant Science**, Limerick, v.161, p. 695-701, 2001.

KANECHI, M. et al. The effects of carbon dioxide enrichment, natural ventilation, and light intensity on growth, photosynthesis, and transpiration of cauliflower plantlets cultured in vitro photoautotrophically and photomixotrophically. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Boston, v.123, n.2, p.176-181, 1998.

KHAN, P. S. S. V.; KOZAI, T.; NGUYEN, Q. T.; KUBOTA, C.; DHAWAN, V. Growth and net photosynthetic rates of *Eucalyptus tereticornis* Smith under photomixotrophic and various photoautotrophic micropropagation conditions. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, London, v. 71, p. 141-146, 2002.

KHATOUNIAN, C.A. **Produção de alimentos para consumo doméstico no Paraná: caracterização e culturas alternativas**. Londrina: IAPAR, 1994. 193 p.

KIM, S.J.; HAHN, E.J.; HEO, J.W.; PEAK, K.Y. Effects of LEDs on net photosynthetic rate, growth and leaf stomata of chrysanthemum plantlets in vitro. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.101, p.143-151, 2004.

KOZAI, T., XIAO, Y., NGUYEN, Q. T., AFREEN, F., e ZOBAYED, S. M. Photoautotrophic (Sugar Medium Free) Micropropagation System for Large-Scale Commercialization. **Propagation of Ornamental Plants**, Sanremo, p. 23-34, 2005.

KOZAI, T.; IWABUCHI, K.; WATANABE, K.; WATANABE, I. Photoautotrophic and photomixotrophic growth of strawberry plantlets in vitro and changes in nutrient composition of the medium. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, London, v. 25, p. 107-115, 1991.

KOZAI, T.; KUBOTA, C.; JEONG, B.R. Environmental control for the large scale production of plants through *in vitro* techniques. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, London, v. 51, p. 49-56, 1997.

KOZAI, T.; NGUYEN, Q.T. Photoautotrophic micropropagation of woody and tropical plants. **Micropropagation of woody trees and fruits**. Norwell, v. 75, p. 757-781, 2003.

KRYSZCZUK, A.; KELLER, J.; GRUBE, M.; GUZOWSKA, E. Z. Cryopreservation of potato (*Solanum tuberosum* L.) shoot tips using vitrification and droplet method. **Journal of Food Agriculture and Environment**. Turku, v.4 p. 196-200, 2006.

LANGFORD, P.J.; WAINWRIGHT, M. Effects of sucrose concentration on the photosynthesis ability of rose shoots in vitro. **Annals of Botany**, London, v.60, p.633-640, 1987.

LE, V.Q.; SAMSON, G.; DESJARDINS, Y. Opposite effects of exogenous sucrose on growth, photosynthesis and carbon metabolism of in vitro plantlets of tomato grown under two levels of irradiances and CO₂ concentration. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 158, p. 599-605, 2001.

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

LEE, N.; WESZTEIN, Y.; SOMMER, H.E. Quantum flux density effects on the anatomy and surface morphology of in vitro and in vivo developed sweet gum leaves. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Boston, v.113, p.167-171, 1988.

LEITE, G.B.; FINARDI, N.; FORTES, G.R.L. Efeitos de concentrações de sacarose no meio de cultura e da intensidade luminosa no enraizamento in vitro do porta-enxerto de pereira oh x f97. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.24, n.2, p.353-357, 2000.

LEMO, E. E. P.; FERREIRA, M.S.; ALENCAR, L. M. C.; OLIVEIRA, J. G. L.; MAGALHÃES, V. S. Micropropagação de clones de banana cv. Terra em biorreator de imersão temporária. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 23, n. 3, p. 482- 487, 2001.

LI, H. M.; TANG, C.; XU, Z. The effects of different light quantities on rapeseed (*Brassica napus* L.) plantlet growth and morphogenesis in vitro. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.150, p.117- 124, 2013.

LIM, L. Effects of light intensity, sugar and CO₂ concentrations on growth and mineral uptake of *Dendrobium* plantlets. **Journal of Horticultural Science**, Amsterdam, v.67, p.601- 611, 1992.

LIMA, J. D.; DAMATTA, F. M.; MOSQUIM, P. R. Growth attributes, xylem sap composition, and photosynthesis in common bean as affected by nitrogen and phosphorus deficiency. **Journal of Plant Nutrition**, Manchester, v.23. p. 937-947, 2000.

LINHARES, S.; GEWANDSNAJDER, F. **Biologia Hoje**, São Paulo: Editora Ática, 1998.

LIU, M. Evaluation of leaf morphology, structure and biochemical substance of balloon flower plantlets in vitro under different light spectra. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.174, p.112-118, 2014.

LOEBENSTEIN, G. Origin, distribution and economic importance. In: _____ **The sweet potato**. Oklahoma: Springer. 2009. p. 9-12.

LORENZO, J.C.; BLANCO, M.A.; PELÁEZ, O.; GONZÁLEZ, A.; CID, M.; IGLESIAS, A.; GONZÁLEZ, B.; ESCALONA, M. Sugarcane micropropagation and phenolic excretion. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, London, v.65, p.1-8, 2001.

LORENZO, J.C.; GONZÁLEZ, B.C.; ESCALONA, M.; TEISSON, C.; ESPINOSA, P; BORROTO, C. Sugarcane shoot formation in an improved temporary immersion system. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, London, v.55, p.79-83, 1998.

MACKAY, W.A.; S.L. KITTO. Factors affecting in vitro shoot proliferation of French tarragon. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Boston, v.113, p. 282-287, 1988.

MAGALHÃES, J.S. **Identificação de genótipos de batata-doce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam) factíveis à embriogênese somática e anatomia do desenvolvimento dos embriões**. 2005. 64f. Dissertação (Mestrado em Botânica), Universidade de Brasília, Brasília, 2012.

MARIN, J.A.; GELLA, R. Isdessecation the cause of the poor survival rate in the acclimatization of micropropagated *Prunus cerasus* L. **Acta Horticulturae**, Coimbra, v.230, p.105-112, 1988.

MARINO, G. Effect of carbohydrates on in vitro low-temperature storage of shoot cultures of apricot. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 126, p. 434-440, 2010.

MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. London: Academic Press, 674p., 1986.

MARTINS, J. R. **Aspectos da germinação de sementes e influencia da luz no desenvolvimento, anatomia e composição química do óleo essencial em *Ocimum gratissimum* L.** 2006. 176p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2006.

MASLE, J. The effects of elevated (CO₂) on cell division rates, growth patterns and blade anatomy in young wheat plants are modulated by factors related to leaf position, vernalization and genotype. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 122, p. 1399 - 1416, 2000.

MC COWN, B.H. Adventitious rooting of tissue cultured plants. In: DAVIS, T.; HAISSIG, B.E.; SANKLA, N. **Adventitious root formation in cuttings**, v. 2, p. 289-299, 1988.

MCALISTER, B. Use of temporary immersion bioreactor system (RITA®) for production of commercial *Eucalyptus* clones in Mondi Forests. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, London, v. 81, n. 3, p. 347-358, 2005.

MIRANDA, J.E.C.; FRANÇA, F.H.; CARRIJO, O.A.; SOUZA A.F.; PEREIRA, W.; LOPES, C.A. **Batata-doce (*Ipomoea batatas* (L) Lam)**. Brasília: Embrapa Hortaliças Circular Técnica, 3. 1989. 20 p.

MOHAMED M.A.H.; ALSADON A.A. Influence of ventilation and sucrose on growth and leaf anatomy of micropropagated potato plantlets. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.123, p.295-300, 2010.

MOREIRA, A. L. *Cattleya walkeriana* growth in different micropropagation systems. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 43, n. 10, p. 1804-1810, 2013.

MORINI, S.; MULEO, R. Effects of light quality on micropropagation of woody species. **Micropropagation of woody trees and fruits**, Norwell, v.33, p. 3-35, 2003.

MURASHIGE T. Plant cell and organ culture as horticultural practice. **Acta Horticulture**, Amsterdam, v.78p.17-30, 1977.

NDAGIJIMANA, V.; KAHIA, J.; ASIIMWE, T.; SALLAH, P. Y.; WAWERU, B.; MUSHIMIYIMANA, I. In vitro effects of gibberellic acid and sucrose concentration on micropropagation of two elite sweet potato cultivars in Rwanda. **International Journal for Biotechnology and Molecular Biology Research**, Amsterdam, v. 5, p. 1-6, 2014.

NGUYEN, Q.T.; KOZAI, T.; NGUYEN, U.V. Effects of sucrose concentration, supporting material and number of air exchanges of the vessel on the growth of in vitro coffee plantlets. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, London, v.58, p.51-57, 1999.

NICOLOSO, F.T.; ERIG, A.C.; RUSSOWSKI, D.; MARTINS, C.F. Efeito de doses e fontes de carboidratos no crescimento de plantas de ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata*) cultivadas in vitro. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.27, n.1, p.84-90, 2003.

NIEMI, K. et al. Light sources with different spectra affect root and mycorrhiza formation in Scot pine in vitro. **Tree Physiology**, Victoria, v.25, n.1, p.123-128, 2005.

OLIVEIRA, A.C.B.; SEDIYAMA, M.A.N.; SEDIYAMA, T.; FINGER, F.L.; CRUZ, C.D. Variabilidade genética em batata-doce com base em marcadores isoenzimáticos. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 20, p. 576-582, 2002.

OLIVEIRA, C.M. Efeito de fitorreguladores na micropropagação in vitro de batata-doce. **Global Science and Technology**, Rio Verde, v. 06, p. 108-115, 2013.

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

OLIVEIRA, M. M. Aplicações e avanços na área da biotecnologia vegetal. **Revista Boletim de Biotecnologia**, Braga, v. 66, p. 22-27, 2011.

PASQUAL, M. **Meios de cultura**. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2001. 74p.

PENCHEL, R. M.; OTONI, W. C.; XAVIER, A. Tecnologia de biorreatores de propagação fotoautotrófica in vitro. **Biotecnologia florestal**. Viçosa, v.32, p. 75-92, 2007.

PEREIRA A.S.; BERTONCINI O; SILVA G.O.; CASTRO C.M.; GOMES C.B.; HIRANO E; BORTOLETTO A.C.; MELO P.E; et al. BRS Clara: cultivar de batata para mercado fresco, com resistência à requeima. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 31.p. 664-668, 2013.

PEREIRA, J.E.S.; FORTES, G.R.L. Protocolo para produção de material propagativo de batata em meio líquido. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 9, p.35-43, 2003.

PESTANA, C. M. D. **Efeitos do processamento sobre a disponibilidade de carotenoides, fenólicos totais e atividade antioxidante em quatro cultivares de batata-doce (*Ipomoea batatas* L.) biofortificados**. 2011. 88p. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos). Universidade de São Paulo, 2011.

PINTO, R. A. **Projeto e implementação de lâmpadas para a iluminação de interiores empregando diodos emissores de luz (LEDs)**. 2008. 138 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Elétrica). Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria. 2008.

PIVETTA, K. F. L.; MARTINS, T. A.; GALDIANO JUNIOR, R. F.; GIMENES, R.; FARIA, R. T. F.; TAKANE, R. J. Crescimento in vitro de plântulas de *Caularthron bicornutum* em diferentes concentrações de sacarose. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.40, p.1897-1902, 2010.

PREMKUMAR, A.; MERCADO, J.A.; QUESADA, M.A. Effects of *in vitro* tissue culture conditions and acclimatization on the contents of Rubisco, leaf soluble proteins, photosynthetic pigments, and C/N ratio. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v.158, p.835-840, 2001.

RECH FILHO, A.; LISCHKA, R.W.; DAL VESCO, L.L.; MÜLLER, C.V.; ALVES, G.M.; CUNHA, L.; GUERRA, M.P. Efeitos do Paclobutrazol na morfogênese in vitro de *Vriesea gigantea*. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Londrina, v.15, p.154, 2003.

RECH, A. **Biorreatores de imersão temporária e unidades encapsuláveis como ferramentas na consolidação de protocolos de micropropagação de bromélias**. 2004. 87 p. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos) Universidade Federal de Santa Catarina, 2004.

REDENBAUGH K.; FUJII J. A.; SLADE D. Hydrated Coatings for Synthetic. **Research Journal of Biological Science**, Melbourne, v.1, n.5, p.74-78, 2012.

- REIS, E.S. Teor e composição química do óleo essencial de *Melissa officinalis* L. in vitro sob influência do meio de cultura. **Acta Scientiarum: Agronomy**, Maringá, v.31, n.2, p.331-5, 2009.
- REZENDE, R. K. S. et al. Organogênese em capítulos florais e avaliação de características anatômicas da folha de *Gerbera jamesonii* Adlam. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 3, p. 821-827, 2008.
- RIBEIRO, J. M.; BASTOS, D. C. **Biorreatores: aspectos gerais e sua utilização para cultura de tecidos vegetais**. Petrolina: Embrapa Semi-Árido, 2008. 26 p.
- RIBEIRO, M. F. A. Fontes de carbono na multiplicação in vitro de porta-enxertos de marmeleiro 'MC' e 'Adams'. **Plant Cell Culture and Micropropagation**, Lavras, v.11, p.54-61, 2015.
- RIBEIRO, M. V. Concentrações de sacarose e tipos de vedação no cultivo in vitro de *Melissa officinalis* L. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, p. 843-845, 2007.
- RICK, J.; PIQUERAS, A.; DEBERGH, P. Sucrose and metabolism in a double system for micropropagation of *Rosa multiflora*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, London, v. 47, p. 269-278, 1997.
- RIOU-KHAMLICH, C.; MENGES, M.; HEALY, J. M. S.; MURRAY, J. A. H. Sugar control of the plant cell cycle: differential regulation of Arabidopsis D-type cyclin gene expression. **Molecular and Cell Biology**, Basel, v. 20, p.4513-4521, 2000.
- ROCHA, H.S. **Luz e sacarose na micropropagação da bananeira 'prata anã': alterações morfoanatômicas**. 2005. 98 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia)—Universidade Federal de Lavras, 2005.
- ROCHA, H.S; SILVA, C. R. R.; ARAÚJO, A. G.; SILVA, A. B. Propagação in vitro de bananeira 'prata anã: intensidades luminosas e concentrações de sacarose nas fases de multiplicação e enraizamento. **Plant Cell Culture and Micropropagation**, Lavras, v.3, p.10-16, 2007.
- ROCHA, P. S. G. Diodos emissores de luz e concentrações de BAP na multiplicação in vitro de morangueiro. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, p. 22-28, 2010.
- ROCHA, P. S. G.; OLIVEIRA, R. P.; SCIVITTARO, W. B. Sugarcane micropropagation using light emitting diodes and adjustment in growth-medium sucrose concentration. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.43, n.7, p.1168-1173, 2013.
- RODRIGUES, P. H. V.; TEIXEIRA, F. M.; LIMA, A. M. L. P.; AMBROSANO, G. M. B. Propagation of heliconia plantlets in temporarily immersion bioreactor. **Bragantia**. Campinas, v. 65, p. 29-35, 2006.
- ROLLAND, F.; BAENA-GONZALEZ, E.; SHEEN, J. Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 57, p. 675-709, 2006.

SAITOU, T.. Reduction of phytochrome level and light-induced formation of adventitious shoots by introduction of antisense genes for phytochrome A in horse radish hairy roots. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, London, v.76, n.1, p.45-51, 2004.

SALISBURY, F.B., ROSS, C.W. **Plant Physiology**. 4.ed. Belmont: Wadsworth Publishing, 1993. 682p.

SCHUERGER, A.C.; BROWN, C.S.; STRYJEWSKI, E.C. Anatomical features of pepper plants (*Capsicum annuum* L.) growth under red light emitting diodes supplemented with blue or far-red light. **Annals of Botany**, London, v.79, n.3, p.273-282, 1997.

SCIUTTI, R.; MORINI, S. Water loss and photosynthesis of plum plantlets is influenced by relative humidity during rooting in vitro. **Journal of Horticultural Science**, Amsterdam, v.10, n.2, p.221-228, 1995.

SEABROOK, J. E. A. Light effects on the growth and morphogenesis of potato (*Solanum tuberosum*) in vitro: a review. **American Journal of Potato Research**, New York, v. 82, p. 353-367, 2005.

SEKO, Y.; NISHIMURA, M. Effect of CO₂ and light on survival and growth of rice regenerants grown in vitro on sugar-free medium. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, London, v.46, p.257-264, 1996.

SEON, J.H.; CUI, Y.Y.; KOZAI, T.; PAEK, K.Y. Influence of in vitro growth conditions on photosynthetic competence and survival rate of *Rehmannia glutinosa* plantlets during acclimatization period. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, London, v. 61, p. 135–142, 2000.

SERRET, M.D.; TRILLAS, M.I. Effects of light and sucrose levels on the anatomy, ultrastructure and photosynthesis of *Gardenia jasminoides* Ellis leaflets cultured in vitro. **Journal Plant Science**, Limerick, v. 116, p. 281-289, 2001.

SHAMIR, M.; GUSSAKOVSKY, E. E.; SHPIEGEL, E.; NISSIM-LEVI, A.; RATNER, K.; OVADIA, R.; GILLER, Y. E.; SHAHAK, Y. Coloured shade nets can improve the yield and quality of green decorative branches of *Pittosporum variegatum*. **The Journal of Horticultural Science**, Amsterdam, v. 76, n. 3, p. 353-361, 2001.

SHIBLI, R. A.; SHATNAWI, M.A.; SUBAIH, W.S.; AJLOUNI, M. M. In vitro conservation and cryopreservation of plant genetic resources: A review. **World Journal of Agricultural Science**, Orlando, v. 2, p. 372-382, 2006.

SILVA, A.B.; PASQUAL, M.; TEIXEIRA, J.B.; ARAÚJO, A.G. Métodos de propagação do abacaxizeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.42, p.1257-1260, 2007.

SILVA, E.C.; PINTO, C.A.; SOUZADIAS, J.A.C; ARAÚJO, T.H. Uso de fitorreguladores em brotos destacados de batata-semente. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 29, p. 504- 509, 2011.

SILVA, J.B.C.; LOPES, C.A.; MAGALHÃES, J.S. **Cultura da Batata-doce**. Agricultura: tuberosas amiláceas latino americanas. São Paulo: Fundação Cargil. 2002. 540p.

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

SIRSKANDARAJAH, S.; MULLINS, M.G. Micropropagation of Granny Smith apple: factors affecting root formation in vitro. **Journal of Horticultural Science**, Amsterdam, v. 56, n.1, p. 71-71, 1981.

SIVPARSAD, B.J.; GUBBA, A. Development of an efficient plant regeneration protocol for sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) cv. Blesbok. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, vol. 11, n. 84, p.82-87, 2012.

SKIN, H. S. et al. The effect of light quality on the growth and development of in vitro cultured *Doritaenopsis* plant. **Acta Physiologia Plantarum**, Sweden, v. 30, p. 339-343, 2008.

SKREBSKY, E.C. Sacarose e período de cultivo in vitro na aclimatização ex vitro de ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata*). **Ciência Rural**, Santa Maria, v.34, p.1471-1477, 2004.

SMITH, E.F.; ROBERTS, A.V.; MOTTLEY, J. The preparation in vitro of chrysanthemum for transplantation to soil: Improved resistance to desiccation conferred by paclobutrazol. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, London, v.21, p.133-140, 1995.

SOLAROVA, J. Photosynthesis and growth of tobacco plants in dependence on carbon supply. **Photosynthetica**, Prague, v.23, p.629-637, 1989.

SOUZA, A.S. **Efeitos da sacarose e do fotoperíodo na propagação in vitro da cv. ebano de amora-preta e dos porta-enxertos de macieira “MM.111” e pereira *Pyrus calleryana* Deene**. 1995. 36p. Dissertação (Mestrado em agronomia). Lavras, Universidade Federal de Lavras - UFLA, 1995.

SOUZA, E.D. **Cultura de meristemas e micropropagação para eliminação de vírus de batata-doce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam) cv. Americana**. 1990. 61f. Dissertação (Mestrado em Fitomelhoramento), Universidade Federal de Pelotas, 1990.

SUDA, I.; YOSHIMOTO, M.; YAMAKAWA, P. Sweet potato potentiality: prevention for life style-related disease induced by recent food habits in Japan. **Foods and Food Ingredients Journal of Japan**, Kyoto, v. 181, p. 59-69, 1999.

SUN, J.; NISHIO, J. N.; VOGELMANN, T. C. 1998. Green light drives CO₂ fixation deep within leaves. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v.39, p.1020-1026, 1998.

- SUTTER, E.; LANGHANS, V. Stomatal and cuticular water loss from apple, cherry, and sweet gum plants after removal in vitro culture. **Journal of American Society for Horticultural Science**, Boston, v. 113, p. 234-238, 1988.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2009. 719 p.
- TAKAYAMA, S.; AKITA, M. Bioengineering aspects of bioreactor application in plant propagation. **Plant Tissue Culture Engineering**, Amsterdam, v.6, p.83-100, 2006.
- TEIXEIRA, J. B. **Produção de mudas clonais em biofábricas e uso de biorreator**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2006. 31p.
- THOMPSON, P.G.; HONG, L.L.; UKOSKIT, K.; ZHU, Z. Genetic linkage of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers in sweet potato. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Boston, v. 122, p. 79-82, 1997.
- THOTTAPPILLY, G. Introductory remarks. In: _____ **The sweet potato**. New York: Springer, 2009. p. 3-7.
- TICHÁ, I.; CAP, F.; PACOVSKA, D.; HOFMAN, P.; HASEL, D.; CAPKOVA, V.; SCHÄFER, C. Culture on sugar medium enhances photosynthetic capacity and high light resistance of plantlets grown in vitro. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 102, p.155–162, 1998.
- TORRES, A.C.; BARBOSA, N.V.R.; WILLADINO, L.; GERRA, M.P.; FERREIRA, C.F.; PAIVA, S.A. V. **Meio e condições de incubação para cultura de tecidos de plantas**. Brasília: Embrapa Cenargen – Circular Técnica 24, 2001. 20p.
- VASCONCELOS, A. G. V. et al. Hiperidricidade: uma desordem metabólica. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 42, n. 5, p. 837-844, 2012.
- VETORRAZZI, R. G. **Caracterização, Estabelecimento In Vitro e Criopreservação De Variedades Locais De Batata-Doce (Ipomoea Batatas L. Lam)**. 2016. 101f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de plantas). Universidade Estadual do Norte Fluminense, 2016.
- VIEIRA, L. N. Light-emitting diodes (LED) increase the stomata formation and chlorophyll content in *Musa acuminata* 'Nanicão Corupá' in vitro plantlets. **Theoretical and Experimental Plant Physiology**, Amsterdam, v.27, n.2, p.91- 98, 2015.
- VINTERHALTER, B., VINTERHALTER, D., NESKOVIC, M. Effect of irradiance, sugars and nitrogen on leaf size of in vitro grown *Ceratoria siliqua* L. **Biologia Plantarum**. Praha, v. 44, p.185-188, 2001.
- WANG, L.; RUAN, Y. L. Regulation of cell division and expansion by sugar and auxin signaling. **Frontiers in Plant Science**, Melbourne, v.30, n.4, p.1-9, 2013.
- WATT, M. P. The status of temporary immersion system (TIS) technology for plant micropropagation. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v.11, 25-35, 2012.

WOOLFE J. A. **Sweet potato: an untapped food resource**. Cambridge: Cambridge University, 1992. 643p.

YEH, N.; CHUNG, J. P. High-brightness LEDs: energy efficient lighting sources and their potential in indoor plant cultivation. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Golden, v. 25, p. 1-6, 2009.

YUÉ, D.; GOSSELIN, A.; DESJARDINS, Y. Re-examination of the photosynthetic capacity of in vitro cultured strawberry plantlets. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Boston, v. 118, p. 419-424, 1993.

ZANANDREA, I. ; BACARIN, M. A. ; BRAGA, E J B ; BIANCHI, V. J. ; PETERS, J. A. Morphological and Physiological photon flux influence under in vitro culture of apple roots. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 52, p. 1091-1098, 2009.

ZENK, M.H.; EL-SHAGI, H.; ARENS, H.; STOCKIGTH, J.; WEILER, E.W. & DEUS, B. Formation of the indole alkaloids serpentine in culture suspension cultures of *Catharanthus roseus*. In: BARZ, W.; REINHARD, E.; ZENK, M. **Plant tissue culture and its biotechnological application**. Berlin: Springer, 1977. p.27- 43.

ZHANG, L.M.; WANG, Q.M.; LIU, Q.C.; WANG, Q.C. **Sweet potato in China**. Biology and biotechnology of sweet potato. Oklahoma: Springer, 2009. 359p.

ZHU, L. H.; LI, X. Y.; WELANDER, M. Optimization of growing conditions for the apple rootstock M26 grown in RITA containers using temporary immersion principle. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, London, v.81, p.313-318, 2005.

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

Anexos

Anexo A – Tabela dos Parâmetros morfológicos avaliados no experimento 1

Comprimento da parte aérea (CPA), número de folhas, número de raízes, comprimento médio de raízes (CMR), número de brotações, comprimento médio de brotações (CMB), massa fresca e massa seca total de plantas de batata-doce cvs. BRS Amélia, BRS Cuia e BRS Rubissol, cultivadas em biorreator de imersão temporária, em duas concentrações de sacarose (15e 30g L⁻¹), sob espectro luminoso vermelho e branco

Parâmetros Morfológicos	Sacarose (g L ⁻¹)	Cultivares		
		BRS Amélia	BRS Cuia	BRS Rubissol
CPA (cm)	15	1,87Cb	2,43Ab	2,30Bb
	30	3,22Ba	3,77Aa	2,67Ca
C.V (%)¹		39,81		
Número de folhas	15	1,38Cb	2,16Bb	2,70Ab
	30	3,11Aa	3,35Aa	3,61Aa
C.V (%)¹		42,93		
Número de raízes	15	1,0Ab	1,0Ab	1,0Ab
	30	2,2Ba	3,3Ab	1,9Ba
C.V (%)¹		47,45		
CMR (cm)	15	1,03Ab	1,11Ab	1,01Ab
	30	1,63Aa	1,41Ba	1,21Ca
C.V (%)¹		28,98		
Número de brotações	15	1,00Ab	1,00Ab	1,00Aa
	30	1,03Ba	1,06Aa	1,00Ca
C.V (%)¹		12,41		
CMB (cm)	15	1,00Ab	1,00Ab	1,00Aa
	30	1,06Ba	1,12Aa	1,00Ca
C.V (%)¹		13,38		
Massa fresca (g planta ⁻¹)	15	0,18Bb	0,30Ab	0,20Bb
	30	0,27Ba	0,42Aa	0,22Ba
C.V (%)¹		23,21		
Massa seca (g planta ⁻¹)	15	0,020Bb	0,027Ab	0,015Bb
	30	0,028Ba	0,033Aa	0,024Ba
C.V (%)¹		43,66		

*C.V.(%)¹ Coeficiente de variação. Médias seguidas por letras maiúsculas distintas, na mesma linha (cultivar) e médias seguidas por letras minúsculas, na mesma coluna (concentração de sacarose) diferem entre si, pelo teste de Tukey ao nível de probabilidade de erro a 5%. Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 2017.

Anexo B – Tabela dos Parâmetros morfológicos avaliados no experimento 2

Comprimento da parte aérea (CPA), número de folhas, número de raízes, comprimento médio de raízes (CMR), número de brotações, comprimento médio de brotações (CMB), massa fresca e massa seca total de plantas de batata-doce cvs. BRS Amélia, BRS Cuia e BRS Rubissol, cultivadas em biorreator de imersão temporária, em duas concentrações de sacarose (15e 30g L⁻¹), sob espectro luminoso vermelho e azul

Parâmetros Morfológicos	Sacarose (g L ⁻¹)	Cultivares		
		BRS Amélia	BRS Cuia	BRS Rubissol
CPA (cm)	15	2,57Ab	2,34Ab	1,74Bb
	30	4,00Aa	4,02Aa	2,47Ba
C.V (%)¹		37,47		
Número de folhas	15	3,60Ab	3,95Ab	1,98Bb
	30	5,07Aa	5,46Aa	3,43Ba
C.V (%)¹		36,24		
Número de raízes	15	1,26Ab	1,16Ab	1,10Ab
	30	2,40Aa	1,60Ba	1,63Ba
C.V (%)¹		50,28		
CMR (cm)	15	1,15Ab	1,21Ab	1,13Ab
	30	1,91Aa	1,48Ba	1,22Ba
C.V (%)¹		34,22		
Número de brotações	15	1,00Ab	1,00Ab	1,00Aa
	30	1,10Aa	1,10Aa	1,00Ba
C.V (%)¹		19,59		
CMB (cm)	15	1,28Ab	1,10Bb	1,00Cb
	30	1,94Aa	1,31Ba	1,09Ca
C.V (%)¹		35,43		
Massa fresca (g planta ⁻¹)	15	0,15Bb	0,25Ab	0,12Bb
	30	0,30Aa	0,34Aa	0,16Ba
C.V (%)¹		45,86		
Massa seca (g planta ⁻¹)	15	0,012Bb	0,020Ab	0,010Cb
	30	0,020Ba	0,031Aa	0,013Ca
C.V (%)¹		51,37		

*C.V.(%)¹ Coeficiente de variação. Médias seguidas por letras maiúsculas distintas, na mesma linha (cultivar) e médias seguidas por letras minúsculas, na mesma coluna (concentração de sacarose) diferem entre si, pelo teste de Tukey ao nível de probabilidade de erro a 5%. Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 2017.