

CAMILLA MENDES PEDROZA PESSOA



**FONTES DE LUZ, MEIOS DE CULTURA E CARBOIDRATOS NA FISIOLOGIA DO  
CRESCIMENTO E CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DE *Dioscorea alata* L.**

RIO BRANCO – ACRE  
2021

CAMILLA MENDES PEDROZA PESSOA

**FONTES DE LUZ, MEIOS DE CULTURA E CARBOIDRATOS NA FISIOLOGIA DO  
CRESCIMENTO E CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DE *Dioscorea alata* L.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Produção Vegetal, Centro de Ciências Biológicas e da Natureza, da Universidade Federal do Acre, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutora em Produção Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Frederico H. da S. Costa

RIO BRANCO – ACRE  
2021

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da UFAC

---

- P475f Pessoa, Camilla Mendes Pedroza, 1988- .  
Fontes de luz, meios de cultura e carboidratos na fisiologia do crescimento e conservação *in vitro* de *Dioscorea alata* L. / Camilla Mendes Pedroza Pessoa ; orientador : Prof. Dr. Frederico H. da S. Costa. -- 2021.  
107. : il. ; 30 cm.
- Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Acre. Centro de Ciências Biológicas e da Natureza. Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal. Doutorado em Produção Vegetal. Rio Branco, Acre, 2021.  
Inclui referências e apêndice.
1. Inhome. 2. Crescimento lento. 3. Fontes de luz. I. Costa, Frederico H. da S. (orientador) II. Título

---

CDD: 338

CAMILLA MENDES PEDROZA PESSOA

**FONTES DE LUZ, MEIOS DE CULTURA E CARBOIDRATOS NA FISIOLOGIA DO  
CRESCIMENTO E CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DE *Dioscorea alata* L.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Produção Vegetal, Centro de Ciências Biológicas e da Natureza, da Universidade Federal do Acre, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutora em Produção Vegetal.

**APROVADA EM 30/03/2021**

**BANCA EXAMINADORA**



---

Dr. Frederico Henrique da Silva Costa  
Universidade Federal do Acre



---

Dr. Marcio de Oliveira Martins  
Universidade Federal do Acre



---

Dr. Jonny Everson Scherwinski Pereira  
EMBRAPA - Recursos Genéticos e Biotecnologia



Documento assinado digitalmente

Paulo Cesar Poeta Fermino Junior

Data: 24/08/2021 10:58:25-0300

CPF: 014.349.309-47

Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>

---

Dr. Paulo Cesar Poeta Fermino Junior  
Universidade Federal de Santa Catarina



---

Dr. Diego Silva Batista  
Universidade Federal da Paraíba

Aos meus pais,  
Gilson e Kika, por toda uma vida dedicada à formação íntegra dos filhos.  
Ao meu filho  
Filipe, por ser o meu poço de Fortaleza.

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

Muito além de mera formalidade, agradeço:

A Deus, centro da minha vida, pelo seu amor incondicional, pelas graças diárias recebidas e por sempre me carregar no colo.

Aos meus pais, Gilson e Kika, orientadores da vida, e meus irmãos, Greicyanne e Henrick, que sempre entenderam meus sonhos e sonharam comigo. Pelo silêncio confortante, pelas orações incessantes, pelo amor incondicional, pela entrega à distância.

Ao meu esposo, Jalceyr Pessoa, pelo jogo jogado junto, pela compreensão em meio à ausência, pela entrega ao nosso projeto de vida, por todo amor demonstrado em ações.

Ao meu filho, meu pequeno Filipe, pelo renascimento, por ser a minha fonte diária de força, alegria e resiliência.

À Universidade Federal do Acre e ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal pela oportunidade de crescimento profissional.

Ao Instituto Federal do Acre pela concessão do Afastamento para conclusão do Curso.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos e pelo fomento à pesquisa através do Projeto PGPSE Processo Nº 0353/201688887.115978/2016-01.

Ao professor Frederico Henrique da Silva Costa, pela orientação, compreensão e confiança ao longo desse trajeto.

Ao professor Marcio Oliveira Martins, pela disponibilidade e apoio nas análises fisiológicas e bioquímicas.

Ao pesquisador Jonny Everson Scherwinski Pereira, pelas conversas, orientações e disponibilidade de tempo e espaço físico.

Ao professor José Genivaldo do Vale Moreira pelo apoio estatístico.

Aos colegas do laboratório de Anatomia e Biotecnologia Vegetal da UFAC, Adevânia, Clarice, Gabriela, Gabrielly, Hendril, Izabelle, Janai, Janaína, Jeyson, João Bosco, Laryssa e Nadja, por todos os momentos partilhados de trabalho, pelo apoio, pelos cafés, almoços, conversas paralelas e valiosas trocas de conhecimento científico e humano.

Aos integrantes do grupo “Hotel DMR” (since 2011), Diego, Mayana, Moryb, Naysa e Rusthon, pela amizade, apoio e por terem contido os meus surtos estatísticos.

Aos servidores do IFAC, em especial àqueles do convívio diário, Antonieta, Kelvyla e Nelzira, pela amizade, compreensão e palavras de incentivo. Aos participantes do café do NAES, Braúlio, Edivaldo, Matheus, Naiara e Raelisson pelos papos matinais e vespertinos.

Ao meu tio Marcelo Mendes, pelo exemplo de garra e perseverança.

Aos colegas de turma 2016 e ao longo do Doutorado, pela partilha de conhecimento e por todos os momentos vividos.

Chegar ao fim de uma etapa e ter a quem agradecer é um privilégio. Sinal que ao longo do percurso precisei de uma mão amiga e ela estava lá. Não só uma, talvez as duas, os braços e os abraços. A todos que me estenderam “a mão” o meu mais sincero, muito obrigada!

## RESUMO

O cultivo convencional do inhame tem apresentado problemas desde à obtenção de túberas-  
sentes de qualidade até a infecção das plantas pelo ataque de vírus e fungos. Com o cultivo  
*in vitro*, os problemas do cultivo tradicional são sanados e pesquisas com enfoque no  
desenvolvimento de protocolos de propagação e conservação estão cada vez mais frequentes.  
A otimização no desenvolvimento das culturas *in vitro* está atrelada ao conhecimento das  
necessidades fisiológicas dos vegetais. Diante disso, o presente trabalho objetivou estudar as  
respostas fisiológicas de plantas de inhame submetidas a técnicas de propagação: com o uso de  
diferentes qualidades de luz, e de formulação nutritiva; e técnicas de conservação: com o uso  
de diferentes agentes osmóticos em distintas concentrações. No primeiro capítulo, objetivou-se  
estudar a influência da fonte de luz e formulação nutritiva no desenvolvimento, fisiologia e  
anatomia de plantas de inhame durante o cultivo *in vitro*, pré-aclimatização e aclimatização.  
Neste trabalho utilizou-se três fontes luminosas (fluorescente, LED e Módulo) e duas  
formulações nutritivas (MS e WPM). A exposição de plantas de inhame durante as fases *in  
vitro* e de pré-aclimatização à luz Fluorescente favoreceu a morfogênese e a fotossíntese líquida  
em inhame. O meio de cultura WPM foi mais eficaz que o MS na promoção do acúmulo de  
biomassa e de teores de pigmentos fotossintéticos de plantas aclimatizadas de inhame. Plantas  
de inhame aclimatizadas apresentaram parênquima clorofiliano mais organizado, com menores  
espaços intercelulares, feixes vasculares de menor calibre e estômatos aparentemente mais  
funcionais. O segundo capítulo abordou a influência de tipos e concentrações de agentes  
osmóticos, no crescimento e desenvolvimento, durante a conservação *in vitro*, recrescimento e  
aclimatização de inhame. Utilizou-se três agentes osmóticos em quatro concentrações e um  
tratamento testemunha. As avaliações de crescimento ocorreram aos 180, 270 e 360 dias do  
período de conservação, aos 60 dias de recrescimento e aos 120 dias de aclimatização. As  
avaliações bioquímicas foram realizadas ao final do período de crescimento lento. Através da  
análise de variáveis canônicas foi possível observar a formação de cinco e quatro grupos de  
tratamentos para as variedades “White” e “Purpurae”, respectivamente, para ambas a  
representação da variação total foi superior a 90%. A altura da brotação foi a característica de  
crescimento que mais contribuiu para a diversidade entre os tratamentos, para as duas  
variedades. Dentre as variáveis bioquímicas, houve a formação de três e quatro grupos de  
tratamento, para “White” e “Purpurae”, respectivamente, e as duas primeiras variáveis  
canônicas representaram mais de 90% da variação total, para ambas as variedades. O teor de  
amido e de açúcares solúveis totais, para as duas variedades, foram as características que mais  
contribuíram na variabilidade entre os tratamentos. Durante a fase de recrescimento, plantas da  
variedade “White” tiveram médias de altura da brotação e de número de folhas expandidas  
superiores nos tratamentos com sacarose e sorbitol. Nesta mesma fase, plantas da variedade  
“Purpurae” evidenciaram maior altura da brotação, número de folhas expandidas e número de  
gemas com sacarose, sorbitol e no tratamento testemunha. Na aclimatização, a variedade  
“Purpurae” para a altura da brotação, evidenciou maiores médias no tratamento com sorbitol  
50 mM. Nesta fase, plantas “White” não tiveram efeito significativo para as variáveis  
analisadas. As concentrações de 50 mM de sacarose ou de sorbitol, e de 100 mM de sorbitol,  
para a variedade “White”, promovem maior sobrevivência durante o período de conservação.  
Conclui-se que a altura da brotação e o número de folhas expandidas aos 360 dias estão entre  
as variáveis que favorecem maior variabilidade entre os tratamentos durante o período de  
conservação *in vitro* da variedade “White”. Sobrevivência de 100%, ao final do período de  
conservação *in vitro*, das plantas de inhame da variedade “Purpurae” foi promovida pela adição  
de 50 mM de sorbitol ao meio de cultura. As variáveis altura da brotação aos 270 dias e número  
de gemas aos 360 dias permitiram maior diversidade entre os tratamentos durante o crescimento  
lento de inhame da variedade “Purpurae”. As variáveis bioquímicas que tiveram maior

contribuição na variabilidade entre os tratamentos, para ambas as variedades, são açúcares solúveis totais e amido. A utilização de sacarose e sorbitol, na concentração de 50 mM, foi eficaz na regeneração e aclimatização de plantas de inhame submetidas a 360 dias de crescimento lento. O manitol não foi eficaz na manutenção de inhame *in vitro*.

Palavras-chave: inhame; crescimento lento; fontes de luz.

## ABSTRACT

The conventional cultivation of yam has presented problems from obtaining tubers of quality seeds to infection of plants by the attack of viruses and fungi. Within vitro cultivation, the problems of traditional cultivation are solved and research focusing on the development of propagation and conservation protocols is increasingly frequent. The optimization in the development of in vitro cultures is linked to the knowledge of the physiological needs of plants. Therefore, in general, the present work aimed to study the physiological responses of yam plants submitted to propagation techniques: using types and quality of light, and nutritional formulation; and conservation techniques: using types and concentrations of osmotic agents. In the first chapter, the objective was to study the influence of spectral quality of light and nutritive formulation on the development, physiology and anatomy of yam plants during in vitro cultivation, pre-acclimatization and acclimatization. In this work, three light sources and two nutritional formulations were used. The exposure of yam plants during the *in vitro* and pre-acclimatization phases to Fluorescent light favored morphogenesis and liquid photosynthesis in yam. The WPM culture medium was more effective than MS in promoting the accumulation of biomass and photosynthetic pigment contents of acclimatized yam plants. Acclimatized yam plants had more organized chlorophyll parenchyma, with smaller intercellular spaces, smaller vascular bundles and apparently more functional stomata. The second chapter addressed the influence of types and concentrations of osmotic agents, on growth and development, during in vitro conservation, regrowth and acclimatization of yams. Three osmotic agents in four concentrations and one control treatment were used. Growth evaluations took place at 180, 270 and 360 days after the conservation period, at 60 days of regrowth and at 120 days of acclimatization. Biochemical evaluations were performed on plants at the end of the slow growth period. Through the analysis of canonical variables, it was possible to observe the formation of five and four groups of treatments for the varieties "White" and "Purpureae", respectively, for both the representation of the total variation was greater than 90%. Shoot height was the growth characteristic that most contributed to the diversity between treatments, for both varieties. Among the biochemical variables, three and four treatment groups were formed, for "White" and "Purpureae", respectively, and the first two canonical variables represented more than 90% of the total variation, for both varieties. The content of starch and total soluble sugars, for both varieties, were the characteristics that most contributed to the variability between treatments. During the regrowth phase, plants of the "White" variety had average sprouting height and superior number of expanded leaves in the treatments with sucrose and sorbitol. In this same phase, plants of the "Purpureae" variety showed higher sprouting height, number of expanded leaves and number of buds with sucrose, sorbitol and in the control treatment. In acclimatization, the variety "Purpureae" for the height of the sprout, showed higher averages in the treatment with 50 mM sorbitol. At this stage, "White" plants had no significant effect on the variables analyzed. It is concluded that the bud height and the number of expanded leaves at 360 days are among the variables that favor greater variability between treatments during the *in vitro* conservation period of the "White" variety. Survival of 100%, at the end of the *in vitro* conservation period, of yam plants of the variety "Purpureae" was promoted by the addition of 50 mM sorbitol to the culture medium. The variables bud height at 270 days and number of buds at 360 days allowed for greater diversity among treatments during the slow growth of yam of the variety "Purpureae". The biochemical variables that had the greatest contribution in the variability between treatments, for both varieties, are total soluble sugars

and starch. The use of sucrose and sorbitol, at a concentration of 50 mM, was effective in the regeneration and acclimatization of yam plants submitted to 360 days of slow growth. Mannitol was not effective in maintaining yam *in vitro*.

Keywords: yam; slow growth; light sources.

## LISTA DE FIGURAS

### Capítulo 1

Figura 1	Cultivo <i>in vitro</i> de inhame. Microplantas de <i>D. alata</i> var. <i>purpureae</i> (A) e <i>D. alata</i> var. <i>white</i> (B); inhame cultivado em lâmpadas LED (C), Módulo GreenPower (D) e Fluorescente (E), Rio Branco, Acre.....	38
Figura 2	Plantas de <i>D. alata</i> var. <i>purpureae</i> (A) e <i>D. alata</i> var. <i>white</i> (B) com 60 dias de aclimatização em casa de vegetação (C) e estufa (D), Rio Branco, Acre...	39
Figura 3	Teor de carotenoides de plantas de <i>D. alata</i> var. <i>white</i> cultivadas <i>in vitro</i> , em função do meio, Rio Branco, Acre.....	45
Figura 4	Altura da parte aérea de plantas de <i>D. alata</i> var. <i>purpureae</i> pré-aclimatizadas, em função da fonte de luz, Rio Branco, Acre.....	46
Figura 5	Fotossíntese líquida ( $P_N$ ), eficiência no uso da água (EUA), eficiência de carboxilação (EC) e pressão parcial de $CO_2$ ( $C_i$ ) de plantas de <i>D. alata</i> var. <i>purpureae</i> pré-aclimatizadas, em função da fonte de luz, Rio Branco, Acre.....	47
Figura 6	Pressão parcial de $CO_2$ de plantas de <i>D. alata</i> var. <i>white</i> pré-aclimatizadas, em função da fonte de luz (A) e do meio nutritivo (B), Rio Branco, Acre.....	48
Figura 7	Condutância estomática em função da fonte de luz de plantas de <i>D. alata</i> var. <i>white</i> pré-aclimatizadas, em função da fonte de luz, Rio Branco, Acre.	49
Figura 8	Altura da parte aérea de <i>D. alata</i> var. <i>purpureae</i> aclimatizadas, em função da fonte de luz, Rio Branco, Acre.....	50
Figura 9	Fotossíntese líquida ( $P_N$ ), condutância estomática (gs), pressão parcial de $CO_2$ ( $C_i$ ) e eficiência no uso da água (EUA) de plantas de <i>D. alata</i> var. <i>purpureae</i> aclimatizadas, em função da fonte de luz, Rio Branco, Acre .....	52
Figura 10	Teor de clorofila <i>b</i> de plantas de <i>D. alata</i> var. <i>white</i> aclimatizadas, em função do meio nutritivo, Rio Branco, Acre.....	52
Figura 11	Fotossíntese líquida ( $P_N$ ), eficiência de carboxilação (EC) e pressão parcial de $CO_2$ ( $C_i$ ) de plantas de <i>D. alata</i> var. <i>white</i> aclimatizadas, em função da fonte de luz, Rio Branco, Acre.....	54
Figura 12	Secções transversais do limbo foliar de plantas de <i>D. alata</i> var. <i>purpureae</i> propagadas <i>in vitro</i> em função da fonte de luz e do meio nutritivo, Rio Branco, Acre .....	58
Figura 13	Secções transversais do limbo foliar de plantas de <i>D. alata</i> var. <i>purpureae</i> aclimatizadas em função da fonte de luz e do meio nutritivo, Rio Branco, Acre.	58
Figura 14	Secções transversais do limbo foliar de plantas de <i>D. alata</i> var. <i>white</i> propagadas <i>in vitro</i> em função da fonte de luz e do meio nutritivo, Rio Branco, Acre.....	59

Figura 15	Secções transversais do limbo foliar de plantas de <i>D. alata</i> var. <i>white</i> aclimatizadas em função da fonte de luz e do meio nutritivo, Rio Branco, Acre.	59
-----------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

## Capítulo 2

Figura 1	Sobrevivência de plantas de <i>D. alata</i> var. <i>white</i> durante o crescimento lento <i>in vitro</i> , Rio Branco, Acre.....	77
Figura 2	Gráfico de dispersão bidimensional dos escores dos tratamentos aplicados durante o crescimento lento <i>in vitro</i> de <i>D. alata</i> var. <i>white</i> nas duas primeiras variáveis canônicas, Rio Branco, Acre.....	79
Figura 3	Sobrevivência de plantas de <i>D. alata</i> var. <i>purpureae</i> durante o crescimento lento <i>in vitro</i> , Rio Branco, Acre.....	80
Figura 4	Gráfico de dispersão bidimensional dos escores dos tratamentos aplicados durante o crescimento lento <i>in vitro</i> de <i>D. alata</i> var. <i>purpureae</i> nas duas primeiras variáveis canônicas, Rio Branco, Acre.....	81
Figura 5	Gráfico de dispersão bidimensional dos tratamentos nas análises bioquímicas aos 360 dias do crescimento lento <i>in vitro</i> de <i>D. alata</i> var. <i>white</i> nas duas primeiras variáveis canônicas, Rio Branco, Acre.....	84
Figura 6	Contribuição relativa das variáveis bioquímicas para a diversidade entre os tratamentos aos 360 de crescimento lento de <i>D. alata</i> var. <i>white</i> , Singh (1981).....	84
Figura 7	Gráfico de dispersão bidimensional dos tratamentos nas análises bioquímicas aos 360 dias do crescimento lento <i>in vitro</i> de <i>D. alata</i> var. <i>purpureae</i> nas duas primeiras variáveis canônicas, Rio Branco, Acre.....	86
Figura 8	Contribuição relativa das variáveis bioquímicas para a diversidade entre os tratamentos aos 360 de crescimento lento de <i>D. alata</i> var. <i>purpureae</i> , Singh (1981).	86

## LISTA DE TABELAS

### Capítulo 1

Tabela 1	Número de folhas expandidas (NFE), número de gemas (NG) e altura da parte aérea (ALT) de plantas de <i>D. alata</i> var. <i>purpurae</i> cultivadas <i>in vitro</i> , em função da fonte de luz e do meio nutritivo, Rio Branco, Acre.....	42
Tabela 2	Teor de pigmentos (clorofila <i>b</i> , carotenoides e clorofila total) de plantas de <i>D. alata</i> var. <i>purpurae</i> cultivadas <i>in vitro</i> , em função da fonte de luz e do meio nutritivo, Rio Branco, Acre.....	43
Tabela 3	Número de folhas expandidas (NFE) e altura da parte aérea (ALT) de plantas de <i>D. alata</i> var. <i>white</i> cultivadas <i>in vitro</i> , em função da fonte de luz e do meio nutritivo, Rio Branco, Acre.....	44
Tabela 4	Teor de pigmentos fotossintéticos (clorofila <i>a</i> , <i>b</i> e total) de plantas de <i>D. alata</i> var. <i>white</i> cultivadas <i>in vitro</i> , em função da fonte de luz, Rio Branco, Acre.....	44
Tabela 5	Número de folhas expandidas (NFE), número de gemas (NG) e altura da parte aérea (ALT) de plantas de <i>D. alata</i> var. <i>white</i> pré-aclimatizadas, em função da fonte de luz e do meio nutritivo, Rio Branco, Acre.....	47
Tabela 6	Teor de pigmentos (clorofila <i>a</i> , carotenoides e clorofila total) de plantas de <i>D. alata</i> var. <i>purpurae</i> aclimatizadas, em função da fonte de luz e do meio nutritivo, Rio Branco, Acre.....	50
Tabela 7	Massa fresca e seca da parte aérea e raiz de plantas de <i>D. alata</i> var. <i>purpurae</i> aclimatizadas, em função do meio nutritivo, Rio Branco, Acre.....	51
Tabela 8	Massa fresca e seca da parte aérea, e massa fresca da raiz de plantas de <i>D. alata</i> var. <i>white</i> aclimatizadas, em função do meio nutritivo e da fonte de luz, Rio Branco, Acre.....	53
Tabela 9	Anatomia foliar de plantas de <i>D. alata</i> var. <i>purpurae</i> propagadas <i>in vitro</i> em função da fonte de luz, Rio Branco, Acre.....	55
Tabela 10	Espessura da epiderme abaxial (EEAB) de plantas de <i>D. alata</i> var. <i>purpurae</i> propagadas <i>in vitro</i> em função da fonte de luz e do meio nutritivo, Rio Branco, Acre.....	55
Tabela 11	Espessura da epiderme adaxial (EEAD) e número de células do parênquima paliçádico (NPP) de plantas de <i>D. alata</i> var. <i>white</i> propagadas <i>in vitro</i> em função da fonte de luz e do meio nutritivo, Rio Branco, Acre.....	56
Tabela 12	Espessura do Parênquima paliçádico (EPP) e Número de células do parênquima paliçádico (NPP) de plantas de <i>D. alata</i> var. <i>purpurae</i> aclimatizadas em função da fonte de luz e do meio nutritivo, Rio Branco, Acre.	56
Tabela 13	Anatomia foliar de plantas de <i>D. alata</i> var. <i>white</i> aclimatizadas em função da fonte de luz e do meio nutritivo, Rio Branco, Acre.....	57

## Capítulo 2

Tabela 1	Autovalores, variância e variância acumulada das variáveis canônicas obtidas das variáveis originais, nas análises de crescimento durante o período de conservação <i>in vitro</i> de <i>D. alata</i> var. <i>white</i> , Rio Branco, Acre.....	78
Tabela 2	Contribuição relativa dos caracteres para a diversidade entre os tratamentos durante o crescimento lento de <i>D. alata</i> var. <i>white</i> , Singh (1981).....	80
Tabela 3	Autovalores, variância e variância acumulada das variáveis canônicas obtidas das variáveis originais, nas análises de crescimento durante o período de conservação <i>in vitro</i> de <i>D. alata</i> var. <i>purpurae</i> , Rio Branco, Acre.	81
Tabela 4	Contribuição relativa dos caracteres para a diversidade entre os tratamentos durante o crescimento lento de <i>D. alata</i> var. <i>purpurae</i> , Singh (1981).....	82
Tabela 5	Autovalores, variância e variância acumulada das variáveis canônicas obtidas das variáveis originais, nas análises bioquímicas aos 360 dias do crescimento lento <i>in vitro</i> de <i>D. alata</i> var. <i>white</i> , Rio Branco, Acre.....	83
Tabela 6	Autovalores, variância e variância acumulada das variáveis canônicas obtidas das variáveis originais, nas análises bioquímicas aos 360 dias do crescimento lento <i>in vitro</i> de <i>D. alata</i> var. <i>purpurae</i> , Rio Branco, Acre.....	85
Tabela 7	Altura da brotação e número de folhas expandidas de plantas de <i>D. alata</i> var. <i>white</i> aos 60 dias de recrescimento, Rio Branco, Acre.....	87
Tabela 8	Altura da brotação, número de folhas expandidas e de gemas de plantas de <i>D. alata</i> var. <i>purpurae</i> aos 60 dias de recrescimento, Rio Branco, Acre.....	87
Tabela 9	Altura da brotação (ALT), número de folhas expandidas (NFE) e de folhas senescentes (NFS) de plantas de <i>D. alata</i> var. <i>white</i> aos 120 dias de aclimatização, Rio Branco, Acre.....	88
Tabela 10	Altura da brotação (ALT), número de folhas expandidas (NFE) e de folhas senescentes (NFS) de plantas de <i>D. alata</i> var. <i>purpurae</i> aos 120 dias de aclimatização, Rio Branco, Acre.....	88

## LISTA DE APÊNDICES

Apêndice 1	Resumo da análise de variância para o número de folhas expandidas (NFE), número de gemas (NG) e altura da parte aérea (ALT) de plantas de <i>D. alata</i> var. <i>purpurae</i> cultivadas <i>in vitro</i> , em função da fonte de luz e do meio nutritivo, Rio Branco, Acre.....	97
Apêndice 2	Resumo da análise de variância para o teor de pigmentos (clorofila <i>a</i> , <i>b</i> , carotenoides e clorofila total) de plantas de <i>D. alata</i> var. <i>purpurae</i> cultivadas <i>in vitro</i> , em função da fonte de luz e do meio nutritivo, Rio Branco, Acre.....	97
Apêndice 3	Resumo da análise de variância para o número de folhas expandidas (NFE), número de gemas (NG) e altura da parte aérea (ALT) de plantas de <i>D. alata</i> var. <i>white</i> cultivadas <i>in vitro</i> , em função da fonte de luz e do meio nutritivo, Rio Branco, Acre.....	97
Apêndice 4	Resumo da análise de variância para o teor de pigmentos (clorofila <i>a</i> , <i>b</i> , carotenoides e clorofila total) de plantas de <i>D. alata</i> var. <i>white</i> cultivadas <i>in vitro</i> , em função da fonte de luz e do meio nutritivo, Rio Branco, Acre .....	98
Apêndice 5	Resumo da análise de variância para o número de folhas expandidas (NFE), número de gemas (NG) e altura da parte aérea (ALT) de plantas de <i>D. alata</i> var. <i>purpurae</i> pré-aclimatizadas, em função da fonte de luz e do meio nutritivo, Rio Branco, Acre.....	98
Apêndice 6	Resumo da análise de variância para o teor de pigmentos (clorofila <i>a</i> , <i>b</i> , carotenoides e clorofila total) de plantas de <i>D. alata</i> var. <i>purpurae</i> pré-aclimatizadas, em função da fonte de luz e do meio nutritivo, Rio Branco, Acre.....	98
Apêndice 7	Resumo da análise de variância para a fotossíntese líquida (PN), condutância estomática ( $g_s$ ), eficiência no uso da água (EUA), eficiência de carboxilação (EC), e pressão parcial de CO <sub>2</sub> (C <sub>i</sub> ) de plantas de <i>D. alata</i> var. <i>purpurae</i> pré-aclimatizadas, em função da fonte de luz e do meio nutritivo, Rio Branco, Acre.....	99
Apêndice 8	Resumo da análise de variância para o número de folhas expandidas (NFE), número de gemas (NG) e altura da parte aérea (ALT) de plantas de <i>D. alata</i> var. <i>white</i> pré-aclimatizadas, em função da fonte de luz e do meio nutritivo, Rio Branco, Acre.....	99
Apêndice 9	Resumo da análise de variância para o teor de pigmentos (clorofila <i>a</i> , <i>b</i> , carotenoides e clorofila total) de plantas de <i>D. alata</i> var. <i>white</i> pré-aclimatizadas, em função da fonte de luz e do meio nutritivo, Rio Branco, Acre.....	99

Apêndice 10	Resumo da análise de variância para a condutância estomática ( $g_s$ ) e pressão parcial de $CO_2$ ( $C_i$ ) de plantas de <i>D. alata</i> var. <i>white</i> pré-aclimatizadas, em função da fonte de luz e do meio nutritivo, Rio Branco, Acre .....	100
Apêndice 11	Resumo da análise de variância para o número de folhas expandidas (NFE), número de gemas (NG) e altura da parte aérea (ALT) de plantas de <i>D. alata</i> var. <i>purpurae</i> aclimatizadas, em função da fonte de luz e do meio nutritivo, Rio Branco, Acre.....	100
Apêndice 12	Resumo da análise de variância para o teor de pigmentos (clorofila <i>a</i> , <i>b</i> , carotenoides e clorofila total) de plantas de <i>D. alata</i> var. <i>purpurae</i> aclimatizadas, em função da fonte de luz e do meio nutritivo, Rio Branco, Acre .....	100
Apêndice 13	Resumo da análise de variância para a massa fresca da parte aérea (MFPA) e da raiz (MFR), e massa seca da parte aérea (MSPA) e raiz (MSR) de plantas de <i>D. alata</i> var. <i>purpurae</i> aclimatizadas, em função da fonte de luz e do meio nutritivo, Rio Branco, Acre.....	101
Apêndice 14	Resumo da análise de variância para a fotossíntese líquida (PN), condutância estomática ( $g_s$ ), eficiência no uso da água (EUA), eficiência de carboxilação (EC), e pressão parcial de $CO_2$ ( $C_i$ ) de plantas de <i>D. alata</i> var. <i>purpurae</i> aclimatizadas, em função da fonte de luz e do meio nutritivo, Rio Branco, Acre.....	101
Apêndice 15	Resumo da análise de variância para o número de folhas expandidas (NFE), número de gemas (NG) e altura da parte aérea (ALT) de plantas de <i>D. alata</i> var. <i>white</i> aclimatizadas, em função da fonte de luz e do meio nutritivo, Rio Branco, Acre.....	101
Apêndice 16	Resumo da análise de variância para o teor de pigmentos (clorofila <i>a</i> , <i>b</i> , carotenoides e clorofila total) de plantas de <i>D. alata</i> var. <i>white</i> aclimatizadas, em função da fonte de luz e do meio nutritivo, Rio Branco, Acre .....	102
Apêndice 17	Resumo da análise de variância para a massa fresca da parte aérea (MFPA) e da raiz (MFR), e massa seca da parte aérea (MSPA) e raiz (MSR) de plantas de <i>D. alata</i> var. <i>white</i> aclimatizadas, em função da fonte de luz e do meio nutritivo, Rio Branco, Acre.....	102
Apêndice 18	Resumo da análise de variância para a fotossíntese líquida (PN), condutância estomática ( $g_s$ ), eficiência no uso da água (EUA), eficiência de carboxilação (EC), e pressão parcial de $CO_2$ ( $C_i$ ) de plantas de <i>D. alata</i> var. <i>white</i> aclimatizadas, em função da fonte de luz e do meio nutritivo, Rio Branco, Acre.....	102
Apêndice 19	Resumo da análise de variância para a anatomia foliar de plantas de <i>D. alata</i> var. <i>purpurae</i> propagadas <i>in vitro</i> em função da fonte de luz, Rio Branco, Acre.....	103

Apêndice 20	Resumo da análise de variância para a anatomia foliar de plantas de <i>D. alata</i> var. <i>white</i> propagadas <i>in vitro</i> em função da fonte de luz, Rio Branco, Acre .....	103
Apêndice 21	Resumo da análise de variância para a anatomia foliar de plantas de <i>D. alata</i> var. <i>purpurae</i> aclimatizadas em função da fonte de luz e do meio nutritivo, Rio Branco, Acre.....	103
Apêndice 22	Resumo da análise de variância para a anatomia foliar de plantas de <i>D. alata</i> var. <i>white</i> aclimatizadas em função da fonte de luz e do meio nutritivo, Rio Branco, Acre.....	103
Apêndice 23	Resumo da análise de variância para o número de folhas expandidas (NFE), número de gemas (NG) e altura da parte aérea (ALT) de plantas de <i>D. alata</i> var. <i>white</i> aos 60 dias de recrescimento, Rio Branco, Acre .....	104
Apêndice 24	Resumo da análise de variância para o número de folhas expandidas (NFE), número de gemas (NG) e altura da parte aérea (ALT) de plantas de <i>D. alata</i> var. <i>purpurae</i> aos 60 dias de recrescimento, Rio Branco, Acre .....	104
Apêndice 25	Resumo da análise de variância para o número de folhas expandidas (NFE), número de folhas senescentes (NFS) e altura da parte aérea (ALT) de plantas de <i>D. alata</i> var. <i>white</i> aclimatizadas, Rio Branco, Acre.....	104
Apêndice 26	Resumo da análise de variância para o número de folhas expandidas (NFE), número de folhas senescentes (NFS) e altura da parte aérea (ALT) de plantas de <i>D. alata</i> var. <i>purpurae</i> aclimatizadas, Rio Branco, Acre.....	104

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	<b>18</b>
<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>20</b>
2.1 CARACTERÍSTICAS E IMPORTÂNCIA DO GÊNERO <i>Dioscorea</i> .....	20
2.2 CULTIVO <i>IN VITRO</i> DE INHAME.....	22
2.3 FOTOMORFOGÊNESE NO CULTIVO <i>IN VITRO</i> .....	22
2.4 CONSERVAÇÃO DE PLANTAS .....	23
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>26</b>

### Capítulo 1

**Fontes de luz e meios de cultura no desenvolvimento, anatomia e fotossíntese durante o cultivo *in vitro* e aclimatização de inhame (*Dioscorea alata*)**

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>35</b>
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>37</b>
2.1 CULTIVO <i>IN VITRO</i> .....	37
2.2 PRÉ-ACLIATIZAÇÃO EM SALA DE CULTIVO <i>IN VITRO</i> .....	38
2.3 ACLIMATIZAÇÃO.....	39
2.4 TROCAS GASOSAS.....	40
2.5 ANÁLISES ANATÔMICAS.....	40
2.6 DETERMINAÇÃO DOS TEORES DE CLOROFILAS E CAROTENOIDES .....	40
2.7 DETERMINAÇÃO DA MASSA FRESCA E SECA.....	41
2.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	41
<b>3 RESULTADOS.....</b>	<b>42</b>
3.1 CULTIVO <i>IN VITRO</i> .....	42
3.2 PRÉ-ACLIATIZAÇÃO .....	45
3.3 ACLIMATIZAÇÃO.....	49
3.4 QUALIDADE DA LUZ E MEIO NUTRITIVO NOS PARÂMETROS ANATÔMICOS.....	55
<b>4. DISCUSSÃO .....</b>	<b>60</b>
<b>5 CONCLUSÕES .....</b>	<b>63</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>64</b>

### Capítulo 2

**Sacarose, Manitol e Sorbitol na conservação *in vitro* de *Dioscorea alata* L**

<b>RESUMO .....</b>	<b>69</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>71</b>
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>73</b>
2.1 CONDIÇÕES DO CRESCIMENTO LENTO <i>IN VITRO</i> .....	73

2.2 CONDIÇÕES DE RECRESIMENTO.....	73
2.3 RUSTIFICAÇÃO E ACLIMATIZAÇÃO <i>EX VITRO</i> .....	74
2.4 ANÁLISES BIOQUÍMICAS.....	74
<b>2.4.1 Determinação de prolina livre</b> .....	75
<b>2.4.2 Determinação de aminoácidos solúveis</b> .....	75
<b>2.4.3 Determinação de carboidratos</b> .....	75
2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	76
<b>3 RESULTADOS</b> .....	<b>77</b>
3.1 CRESCIMENTO LENTO DE <i>Dioscorea alata</i> .....	77
3.2 RECRESIMENTO.....	87
3.3 ACLIMATIZAÇÃO.....	88
<b>5 CONCLUSÕES</b> .....	<b>91</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>92</b>
<b>APÊNDICES</b> .....	<b>96</b>

## INTRODUÇÃO GERAL

A cultura do inhame (*Dioscorea* sp.) apresenta importância social e econômica significativa para o Brasil, com produção em regiões de clima tropical, como Nordeste, Norte e Sudeste (BREISSAN et al., 2005; SANTOS et al., 2007a), constituindo um bom negócio agrícola em função do consumo pela população. Apesar da significativa importância dessa planta para o Brasil, uma acentuada redução na produção tem sido verificada nas últimas décadas, que está ligada à baixa oferta de túberas-sementes de boa qualidade e o seu alto custo (SANTOS et al., 2007b).

O inhame é uma túbera de alto potencial nutricional e energético, rico em vitaminas: A, C (ácido ascórbico), e do complexo B (tiamina, riboflavina e niacina); proteínas; minerais (fósforo, cálcio, ferro) e carboidratos. Além de ser fonte natural de hormônio para as mulheres, podendo ser usado na agroindústria (CONSUMO, 2008). Cerca de 10 espécies de Dioscoreaceae são utilizadas na alimentação humana (LEBOT, 2009), o que aumenta o potencial econômico dos tubérculos em todas as regiões do Brasil. Além disso, as túberas constituem matéria-prima para a produção de diosgenina, um metabólito secundário fonte natural de progesterona, utilizada na síntese de hormônios esteroidais e corticosteroides (OASHI, 1999).

O florescimento das espécies de *Dioscorea*, no Brasil é raro (MONTEIRO; PERESSIN, 2002) e os elevados índices de ataque de patógenos à cultura do inhame, juntamente com a escassez de informações acerca do uso de técnicas biotecnológicas para produção de mudas e conservação *ex situ* de germoplasma sugerem que pesquisas sejam desenvolvidas com este gênero. Além dos problemas fitossanitários que incidem sobre as túberas comerciais e túberas-sementes, é necessário um longo período para produção de rizomas, limitando a produção e padronização em larga escala (CHEN et al., 2007).

Por ser cultivado em pequenas e médias propriedades (NASCIMENTO et al., 2015), o inhame é plantado por agricultores tradicionais, que também cultivam outras plantas de propagação vegetativa, como mandioca, batata e batata-doce (SIQUEIRA, 2011). Contudo, devido às mudanças socioeconômicas sofridas nos últimos tempos, perdas dos recursos genéticos vegetais são propícias a acontecer (NASCIMENTO et al., 2015).

Nesse contexto, a utilização das técnicas de cultura de tecidos promove agregação de valor às culturas, viabilizando a produção em larga escala, limpeza clonal e a conservação e intercâmbio de germoplasma (OLIVEIRA et al., 2013). Embora existam pesquisas sobre o uso da biotecnologia em *Dioscorea*, as informações ainda são escassas, levando em conta o potencial e a eficiência das técnicas biotecnológicas, e o interesse socioeconômico e

farmacológico do Inhame. Logo, estudos sobre as variações morfofisiológicas e genéticas são imprescindíveis para desenvolver protocolos eficientes de propagação e conservação (SARKAR et al., 2001).

Até o presente momento, são raros os protocolos visando a conservação *ex situ* por crescimento lento, e que avaliem os efeitos de diferentes fontes de luz no crescimento e desenvolvimento de *Dioscorea*. Sendo assim, esta pesquisa proposta buscou avaliar a utilização de formulações nutritivas e fontes de luz na propagação, bem como os efeitos do estresse osmótico como estratégia de conservação *in vitro* de duas variedades de *Dioscorea alata*.

## REVISÃO DE LITERATURA

A aplicação de técnicas biotecnológicas visando à produção agrícola tem ganhado evidência devido ao seu uso no melhoramento de plantas, engenharia genética, cultivo de células, órgãos e tecidos, micropropagação massal e conservação dos recursos vegetais. A cultura de tecidos surge como ferramenta de produção de plantas em curto prazo sem sazonalidade, mediante a expressão da capacidade de proliferação e organização das células: a totipotência (KERBAUY, 1999). Para que as células vegetais se tornem competentes, tornando-se especializadas, há a necessidade de indução sob condições específicas de cultivo *in vitro* (ATTA et al., 2009). Células meristemáticas do ápice caulinar são capazes de se diferenciar em diversos tipos de tecidos e órgãos, porém, na condição *in situ*, elas não são competentes para formar um organismo completo, sugerindo que nesta situação, ela não é totipotente (VERDEIL et al., 2007), podendo tornar-se quando submetida à condição *in vitro*.

### 2.1 CARACTERÍSTICAS E IMPORTÂNCIA DO GÊNERO *Dioscorea*

O gênero *Dioscorea* pertence à família Dioscoreaceae e possui espécies que se desenvolvem em ambientes tropicais, sendo originadas na África, Ásia e América (PEDRALLI, 1990). Estima-se que no Brasil o gênero está presente em todas as regiões, encontrando-se cerca de 130 espécies (KIRIZAWA et al., 2020). Destas, 10 fazem parte da alimentação humana (LEBOT, 2009), 15 são utilizadas como plantas medicinais e por tribos indígenas das Regiões Centro-Oeste e Norte como planta tóxica durante a caça e pesca (PEDRALLI, 1988). No Brasil apenas *Dioscorea alata* L., *D. cayenensis* L., *D. rotundata* Poir, *D. bulbifera* L. e *D. trifida* L. são cultivadas e consumidas (PEDRALLI, 1988; BRESSAN et al., 2005; VEASEY et al., 2010; SIQUEIRA et al., 2014).

O inhame é uma monocotiledônea, de porte herbáceo, trepadeira, de caule subterrâneo do tipo tubérculo, responsável pelo armazenamento das propriedades da planta e pela sua propagação vegetativa, que pode ser realizada por túberas-sementes inteiras, partidas e mudas (PEDRALLI, 1988). Suas folhas apresentam grandes variações morfológicas e normalmente são alternas, opostas ou espiraladas, com lobos ou não, pecioladas em forma de seta ou coração. Suas flores são actinomorfas, pequenas, trímeras, geralmente unissexuais e algumas com odor (IPGRI/IITA, 1997). O cultivo do inhame geralmente é associado a sistemas agrícolas tradicionais, sendo parte da estratégia de subsistência de pequenos agricultores em muitos países (LEBOT, 2009; BRESSAN et al., 2005; TAMIRU et al., 2008, SIQUEIRA et al., 2014).

Algumas espécies do gênero podem formar tubérculos nas axilas foliares, denominados de bulbilhos aéreos, que acumulam água e nutrientes (DAHLGREN; CLIFFORD, 1982; RIZZINI; MORS, 1995)

*Dioscorea alata* L. está entre as dez espécies mais importantes de inhame, quando observadas as perspectivas básicas de alimentos e agricultura (LEBOT, 2009). Originária do continente Asiático e são encontradas diversas variedades, como o cará São Tomé, Nambu, Purple de Ceilão, Sorocaba, Roxo de Ilhéus, Mimoso, Caipira e cará Flórida (SANTOS, 1996). Apresenta tubérculos com formatos variáveis, embora a maioria seja de formato cilíndrico e normalmente a polpa é de coloração branca, podendo variar de creme à purpúrea (ARAÚJO, 1994).

A ampla adaptação e seu cultivo faz desta espécie uma das mais importantes de *Dioscorea* usadas na alimentação (TAY, 2013). A flexibilidade agrônômica deste inhame é relativamente melhor do que outras espécies cultivadas devido à sua facilidade de propagação vegetativa (PETRO et al., 2011). Além disso, os tubérculos subterrâneos desta espécie são conhecidos por seu alto conteúdo nutricional (SIQUEIRA et al., 2012).

A inserção das túberas de inhame na alimentação humana ocorreu devido à sua qualidade nutricional (ricas em proteínas, sais minerais e vitaminas A, C, D e do complexo B) (BAAH et al., 2009), energética (como fonte de carboidratos) (TETCHI et al., 2007), com propriedades medicinais e baixos índices de gorduras (SANTOS et al., 2007a).

A utilização de várias espécies de *Dioscorea* ocorre principalmente pela produção de diosgenina (CHU; FIGUEIREDO-RIBEIRO, 1991), metabólito secundário da classe das sapogeninas de grande importância econômica, e por ser muito semelhante à progesterona natural, é utilizada como fonte alternativa para a síntese de hormônios esteroidais (andrógenos, estrógenos e progesterona) e corticosteroides (antiinflamatórios, anticancerígenos, contraceptivos orais e desordens hormonais) (NARULA et al., 2007). Sendo assim, muitas espécies do gênero se tornaram raras com a extração desse metabólito (OASHI, 1999).

A FAOSTAT (2020) aponta que em 2018 a produtividade mundial de inhame foi de 72,5 milhões de toneladas, com 96,4 % da produção no continente africano. No Brasil a produção anual foi de 251.489 toneladas neste mesmo ano (FAO, 2020). Apesar da sua importância para a agricultura familiar e de subsistência, a baixa produtividade está atrelada à falta de material propagativo de boa qualidade, alto nível de infecção de doenças fúngicas (*Curvularia* e *Phytophthora*), uso indiscriminado de agrotóxicos, alta incidência e severidade de fitonematoides no solo e nas túberas-sementes, uso inadequado de fertilizantes químicos e baixo nível tecnológico de produtores rurais (SANTOS et al., 2007a). Outra doença importante,

que reduz drasticamente o rendimento de *D. alata*, é a antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) possuindo incidência elevada em muitos países (ABANG et al., 2003). Dansi et al., (1997) já relatavam o desaparecimento de algumas cultivares, contribuindo para o aumento da erosão genética, atribuído ao ataque de pestes e doenças.

## 2.2 CULTIVO *IN VITRO* DE INHAME

A propagação sexuada do inhame usando técnicas convencionais é lenta, o que acarreta baixa produção de tubérculos, além da possibilidade de ataque por infecções virais e nematoides (NG, 1992). O cultivo *in vitro*, pela técnica de propagação, ajuda a superar as restrições impostas pelo cultivo tradicional, através da disponibilidade de material de plantio de alta qualidade (VAILLANT et al., 2005).

A multiplicação massal de plantas isentas de doenças é uma alternativa para o desenvolvimento agrônomico e expansão das culturas. No entanto, a quantidade de subcultivos realizados para a micropropagação pode acarretar aumento da variação somaclonal (HIGA, 2006; KHATTAB et al., 2014). Fatores como o método utilizado para propagação, tipo ou fonte do material vegetal inicial, tipo e a concentração de fitorreguladores, número e duração de subculturas, genótipo e estresses associados ao ambiente *in vitro* podem contribuir para a ocorrência de alterações genéticas (BAIRU et al., 2011). Outro fator do cultivo *in vitro* de plantas está associado à concentração e ao tipo de meio de cultura (ESTRADA-LUNA et al., 2008), que diferem principalmente na concentração de macro e micronutrientes.

O meio de cultura MS descrito por Murashige e Skoog (1962) é comumente utilizado para a propagação *in vitro* de espécies de inhame (HUANG et al., 2009; MAHESH et al., 2010). Segundo Das et al., (2013), a adição de auxina ao meio de cultura MS promove crescimento satisfatório de segmentos nodais de *Dioscorea alata*. A utilização do meio MS suplementado com metiljasmonato evidenciou maior número de gemas em microplantas de *D. alata*, quando comparado ao meio 1/2WPM (JAZIK; MANTELL, 2000). Borges et al., (2004) relatam que o meio D-571 (DE LA CRUZ et al., 1992) suplementado com 1,5% de manitol + 0,1 ou 1 mg L<sup>-1</sup> e 2 g L<sup>-1</sup> de carvão ativado foi necessário para micropropagar e regenerar 100 e 98% dos explantes de *D. alata*, mantidos *in vitro* por 9 meses.

## 2.3 FOTOMORFOGÊNESE NO CULTIVO *IN VITRO*

A luz é um dos mais importantes fatores ambientais que atua como chave para o crescimento e desenvolvimento de plantas, morfogênese, biossíntese de componentes celulares e expressão gênica no ciclo de vida vegetal (HUCHÉ-THÉLIER et al., 2016). Diversos processos (fotossíntese, acúmulo de biomassa, fotomorfogênese, germinação, floração e metabolismo secundário) podem ser controlados e otimizados através da exposição a diferentes comprimentos de onda do espectro visível (MASSA et al., 2008).

As plantas possuem distintos fotorreceptores que detectam o espectro luminoso e que permitem que elas respondam quanto a intensidade, qualidade, duração e direção da luz (WHITELAM; HALLIDAY, 2007). Os fitocromos absorvem principalmente a luz vermelha e vermelha distante e são essenciais para a germinação, alongamento do caule e floração, influenciando também o gravitropismo e fototropismo (CASAL, 2013; CHEN et al., 2004). Os criptocromos e fototropinas são responsáveis pela absorção da luz azul e são importantes para a formação da clorofila, abertura estomática e na fotomorfogênese (de CARBONNEL et al., 2010).

A combinação das luzes azul, vermelho e vermelho distante favorece a regulação de várias respostas às plantas, como a fotossíntese, metabolismo secundário e fotomorfogênese (HAMDANI et al., 2019; HERNANDEZ; KUBOTA, 2016), evidenciando um efeito sinérgico entre os fitocromos e criptocromos (USAMI et al., 2004).

Pesquisas com enfoque direcionado à utilização de diferentes fontes de luz no crescimento *in vitro* de plantas estão comuns devido às limitações das lâmpadas comumente usadas (xenônio, fluorescente, mercúrio, halogênio / tungstênio de quartzo, LED branco) em não reproduzir o espectro solar e provocando baixo desempenho fotossintético e perfil de metabólitos (LANDI et al., 2020).

## 2.4 CONSERVAÇÃO DE PLANTAS

A conservação de germoplasma vegetal tem como princípio preservar ao máximo os recursos genéticos, visando assegurar a existência e a contínua disponibilidade de plantas para diversos fins (SANTOS; SALOMÃO, 2017). Dentre as três estratégias existentes de conservação, destaca-se a forma *ex situ*, caracterizada por englobar diversas técnicas e métodos, como o crescimento lento e criopreservação em nitrogênio líquido, manutenção de coleções de germoplasma, em campo ou em casas de vegetação, e de sementes em câmaras frias (VALOIS et al., 2001). Este tipo de conservação tem sido empregado em espécies cultivadas, no entanto,

devido ao crescente desmatamento, tem-se crescido a necessidade de se conservar espécies nativas, raras ou ameaçadas de extinção (ENGELMANN, 2011).

Técnicas de cultura de tecidos têm sido utilizadas como ferramenta para a manutenção e multiplicação *ex situ* do germoplasma de diversas espécies (FONSECA et al., 2015). Os bancos de germoplasma *in vitro* visam à conservação do patrimônio genético, em condições de laboratório, buscando a redução ou paralisação do metabolismo celular (CARVALHO et al., 2011)

A conservação *in vitro* baseia-se no cultivo de plantas fora do seu habitat natural, sob condições controladas em laboratório e utilização de técnicas da cultura de tecidos vegetais (ENGELMANN, 1991), com o objetivo de manter bancos de germoplasma, preservando a diversidade genética, principalmente quando se tem sementes recalcitrantes (PENCE, 2011).

O crescimento lento é um método de conservação *in vitro* de curto e médio prazo (ENGELMANN, 2004), mediante a promoção da alteração nas condições físicas (temperatura, fotoperíodo, densidade de fluxo de fótons, ajuste osmótico) e/ou químicas do meio de cultura (componentes salinos e retardadores de crescimento) que favorecem a redução do metabolismo celular, e, conseqüentemente, desaceleração do crescimento vegetal (CARVALHO et al., 2011; LIMA-BRITO et al., 2011; SILVA; SCHERWINSKI-PEREIRA, 2011). Outras estratégias incluem o aumento dos intervalos entre os subcultivos (SARASAN et al., 2006), sem contudo afetar a viabilidade do material conservado (ENGELMANN, 2011). O que possibilita a disponibilidade de material para o melhoramento genético e o intercâmbio de germoplasma entre instituições.

No geral, temperaturas entre 15 a 20 °C estão associadas a menores taxas de crescimento, sem que ocorram mudanças morfoanatômicas nos tecidos, além de aumentarem o intervalo de transferência para novo meio (SILVA; SCHERWINSKI-PEREIRA, 2011; LIMA-BRITO et al., 2011).

Retardantes de crescimento, como o paclobutrazol e ancimidol, agem inibindo a biossíntese de giberelina, uma vez que bloqueiam as reações de oxidação na etapa de conversão do ent-caureno a ácido caurenoico. Como consequência, reduzem o comprimento da parte aérea da planta sem causar fitotoxidez e alterações no desenvolvimento (RADEMACHER, 2000; THAKUR et al., 2006).

Alguns agentes osmóticos têm sido utilizados com o intuito de reduzir o crescimento *in vitro*. Os mais comuns são sacarose, manitol e sorbitol, que ao serem adicionados ao meio de cultura agem reduzindo a água intracelular, fazendo com que o crescimento ocorra de forma mais lenta (DUMET et al., 1993). O manitol e o sorbitol são açúcares alcoólicos geralmente

não metabolizados por tecidos vegetais, devido ao fato de uma gama de espécies não possuir via natural para a biossíntese destes e por isso são empregados para a redução do potencial hídrico do meio de cultura na conservação *in vitro* (GEORGE, 1993; THORPE et. al., 2008; ARRIGONI-BLANK et al., 2014). No entanto, determinadas concentrações de açúcares álcoois pode ocasionar significativa redução na viabilidade dos explantes, por meio da deterioração oriunda da toxidez, oxidação ou pela redução da disponibilidade de água no meio (FORTES; PEREIRA, 2001).

O estresse hídrico provocado pela redução da disponibilidade de água no meio desencadeia processos bioquímicos e fisiológicos, alterando a ação das enzimas antioxidantes, provocando a peroxidação lipídica e acúmulo de espécies reativas de oxigênio (PASTORI; FOYER, 2002). Com isso, muitas plantas, em resposta ao déficit hídrico, sintetizam e acumulam solutos orgânicos, como carboidratos e prolina (BRAY, 1997).

A prolina é um aminoácido que se acumula em resposta a estresses osmóticos, apresentando papel protetor na adaptação das células vegetais submetidas à desidratação. Devido se acumular normalmente no citoplasma, a prolina contribui para o ajustamento osmótico, em resposta à perda de água, sem interferir no metabolismo celular (ASHRAF; FOOLAD, 2007).

Pelo exposto, a manutenção da viabilidade das plantas conservadas é imprescindível para que elas possam ser utilizadas como fonte de explante para a multiplicação *in vitro*. Por isso, é importante que se avalie a capacidade regenerativa, bem como os possíveis impactos metabólicos provocados, como atividade das enzimas oxidativas, teor de prolina, teor de pigmentos fotossintéticos, determinação de carboidratos, além das análises de crescimento.

## REFERÊNCIAS

- ABANG, M. M.; WINTER, S.; MIGNOUNA, H. D.; GREEN, K. R.; ASIEDU, R. Molecular taxonomic, epidemiological and population genetic approaches to understanding yam anthracnose disease. **African Journal Biotechnology**, v. 12, p. 486–496, 2003.
- ARAÚJO, P. S. R. **Efeitos da fertilização orgânica e mineral sobre a produção de cará (*Dioscorea alata* L.) var. Florido**. 1994. 76p. Tese (Doutorado). Universidade de São Paulo, Piracicaba. 1994.
- ARRIGONI-BLANK, M. F.; TAVARES, F. F.; BLANK, A. F.; SANTOS, M. C. dos; MENEZES, T. S. A.; SANTANA, A. D. D. *In vitro* conservation of sweet potato genotypes. **The Scientific World Journal**, v. 1, p. 1-7, 2014.
- ASHRAF, M.; FOOLAD, M. R. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. **Environmental and Experimental Botany**, v. 59, p. 206-216, 2007.
- ATTA, R.; LAURENS, L.; BOUCHERON-DUBUISSON, E.; GUIVARC'H, A.; CARNERO, E.; GIRAUDAT-PAUTOT, V.; RECH, P.; CHRIQUI, D. Pluripotency of arabidopsis xylem pericycle underlies shoot regeneration from root and hypocotyl explants grown *in vitro*. **The Plant Journal**, v. 57, n. 4, p. 626-644, 2009.
- BAAH, F. D.; MAZIYA-DIXON, B.; ASIEDU, R.; ODURO, I.; ELLIS, W. O. Nutritional and biochemical composition of *D. alata* (*Dioscorea* spp.) tubers. **Journal Food Agricult Environ**, v. 7, p. 373–378, 2009.
- BAIRU, M. W.; AREMU, A. O.; STADEN, J. V. Somaclonal variation in plants: causes and detection methods. **Plant Growth Regulation**, v. 63, v. 2 p. 147-173, 2011.
- BORGES, M.; CEIRO, W.; MENESES, S.; AGUILERA, N.; VÁZQUEZ, J.; INFANTE, Z.; FONSECA, M. Regeneration and multiplication of *Dioscorea alata* germplasm maintained *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 76, n. 1, p. 87-90, 2004.
- BRAY, E. A. Plant responses to water deficit. **Trends in plant science**, v. 2, n. 2, p. 48-54, 1997.
- BRESSAN, E.A.; VEASEY, E.A.; PERONI, N.; FELIPIM, A.P.; SANTOS, K.M.P. Collecting yam (*Dioscorea* spp.) and sweet potato (*Ipomoea batatas*) germplasm in traditional agriculture small-holdings in the Vale do Ribeira, São Paulo, Brazil. **Plant Genetic Resources Newsletter**, vol. 144, n. 144, p. 8-13, 2005.
- 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**, v. 7, n. 1, p. 30-60, 2011
- CASAL, J. J. Photoreceptor signalling networks in plant responses to shade. **Annu. Rev. Plant Biol**, v. 64, p. 403–427, 2013.

CHEN, F.; FU, Y.; WANG, D; GAO, X.; WANG, L. The effect of plant growth regulators and sucrose on the micropropagation and microtuberization of *Dioscorea nipponica* Makino. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 26, n. 1, p. 38-45, 2007.

CHEN, M.; CHORY, J.; FANKHAUSER, C. Light signal transduction in higher plants. **Annu. Rev. Genet**, v. 38, p. 87–117, 2004.

CHU, E. P.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R. C. L. Native and exotic species of *Dioscorea* used as food in Brazil. **Economic Botany**, v.45, n 4, p. 467-479, 1991.

CONSUMO - Biodiversidade - Segurança alimentar. **Ecos: o ano internacional das batatas**, 1 ed., v. 7, abr. 2008. Disponível em: <[www.centroecologico.org.br/boletim\\_download.php?id\\_boletim=88&tipo=pdf](http://www.centroecologico.org.br/boletim_download.php?id_boletim=88&tipo=pdf)>. Acesso em: 15 de ago. 2020.

DAHLGREN, R. M. T.; CLIFFORD, H. T. 1982. **The Monocotyledons: A comparative study**. London: Academic Press, 378p.

DANSI, A.; ZOUNDJIHEKPON, J.; MIGNOUNA, H. D.; QUIN, F. M. Collecte d'ignames cultivées du complexe *Dioscorea cayenensis* - *rotundata* Benin. **Plant Genetic Resources Newsletter**, v. 112, n. 1, p. 81-85, 1997.

DE CARBONNEL, M.; DAVIS, P.; ROELFSEMA, M. R.; INOUE, S.; SCHEPENS, I.; LARIGUET, P.; GEISLER, M.; SHIMAZAKI, K.; HANGARTER, R.; FANKHAUSER, C. The Arabidopsis phytochrome kinase substrate protein is a phototropin signaling element that regulates leaf flattening and leaf positioning. **Plant Physiology**, v. 152, p. 1391–1405, 2010.

DE LA CRUZ, G.; LABRADA, M.; RODRÍGUEZ, O. Metodología de micropropagación del ñame (*Dioscorea alata* L.) **Informe Técnico**. p. 6. IIA “Jorge Dimitrov”. Granma, ACC. 1992.

DUMET, D. Importance of source for de acquisition of tolerance to desiccation and cryopreservation of oil palm somatic embryos. **Cryo-letters**, v.14, p. 243-250, 1993.

ENGELMANN, F. Plant cryopreservation: progress and prospects. **In Vitro Cell & Developmental Biology - Plant**, v. 40, n. 5, p. 427-433, 2004.

ENGELMANN, F. In vitro conservation of tropical plant germplasm - a review. **Euphytica**, v. 57, n. 3, p. 227-243, 1991.

ENGELMANN, F. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 47, n.1, p. 5-16, 2011.

ESTRADA-LUNA, A. A.; MARTÍNEZ-HERNÁNDEZ, J. J.; TORRES-TORRES, M. E.; CHABLÉ-MORENO, F. In vitro micropropagation of the ornamental prickly pear cactus *Opuntia lanigera* Salm–Dyck and effects of sprayed GA3 after transplantation to ex vitro conditions. **Scientia Horticulturae**, v. 117, n. 4, p. 378-385, 2008.

FAO. **World Agricultural Information Center**, 2005. Disponível em: < <http://http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize> >. Acesso em: 20 ago. 2020.

FONSECA, P. T.; NEPOMUCENO, C. F.; SILVA, T. S.; SANTANA, J. R. F. de. Conservação *in vitro* de *Erythrina velutina* a partir de embriões zigóticos. **Sitientibus série Ciências Biológicas**, v. 15, DOI 10.13102/scb737. 2015.

FORTES, G.R.L.; PEREIRA, J.E.S. Preservação *in vitro* da batata com ácido acetil salicílico e duas fontes de carboidrato. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.34, n.10, p.1261-4, 2001.

GEORGE, E.F. **Plant propagation by tissue culture**. Part. 1. The technology. 2.ed. Edington, Wilts, London: Exegetics, 1993. 1574p.

HAMDANI, S.; KHAN, N.; PERVEEN, S.; QU, M.; JIANG, J.; ZHU, X.G. Changes in the photosynthesis properties and photoprotection capacity in rice (*Oryza sativa*) grown under red, blue, or white light, **Photosynth Res**, v. 139, p. 107-121, 2019.

HERNÁNDEZ, R.; KUBOTA, C. Physiological responses of cucumber seedlings under different blue and red photon flux ratios using LEDs. **Environmental and experimental botany**, v. 121, p. 66-74, 2016.

HIGA, T. C. **Morfogênese e conservação *in vitro* para *Tabeluia heptaphylla* (Vellozo) Toledo (Bignoniaceae)**. 2006. 154 f. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

HUANG, X. L.; YANG, B.; HU, C. G.; YAO, J. L. *In vitro* induction of inflorescence in *Dioscorea zingiberensis*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 99, n. 2, p. 209-215, 2009.

HUCHÉ-THÉLIER, L.; CRESPEL, L.; LE GOURRIEREC, J.; MOREL, P.; SAKR, S.; LEDUC, N. Light signaling and plant responses to blue and UV radiations - Perspectives for applications in horticulture. **Environmental and Experimental Botany**, v. 121, p. 22-38, 2016.

IPGRI/IITA. 1997. Descriptors for Yam (*Dioscorea* spp.). Rome, Italy: International Institute of Tropical Agriculture, Ibadan, Nigeria/International Plant Genetic Resources Institute, 61p.

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

KHATTAB, S.; EL-SHERIF, F.; EL-GARHY, H. A.; AHMEDC, S.; IBRAHIMC, A. Genetic and phytochemical analysis of the *in vitro* regenerated *Pilosocereus robinii* by ISSR, SDS-PAGE and HPLC. **Gene**, v. 533, n. 1, p. 313-321, 2014.

KIRIZAWA, M.; XIFREDA, C.C.; COUTO, R. 2020. Dioscoreaceae. In: **Lista de espécies da flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB000104>>. (Acesso em 12/08/2020).

LANDI, M.; ZIVCAK, M.; SYTAR, O.; BRESTIC, M.; ALLAKHVERDIEV, S. I. Plasticity of photosynthetic processes and the accumulation of secondary metabolites in plants in response

to monochromatic light environments: A review. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics**, v. 1861, p. 148131, 2020.

LEBOT, V. Tropical root and tuber crops. **Cassava, sweet potato, yams and aroids**. Wallingford: CABI, 2009. 413p.

LEMA-RUMIŃSKA, J.; KULUS, D. Micropropagation of Cacti - a review. **Haseltonia**, v. 19, n. 1, p. 46-63, 2014.

LIMA-BRITO, A.; ALBUQUERQUE, M. M. S.; ALVIM, B. F. M.; RESENDE, S. V.; BELLINTANI, M. C.; SANTANA, J. R. F. de. Agentes osmóticos e temperatura na conservação *in vitro* de sempre-viva. **Ciência Rural**, v. 41, n. 8, p. 1354-1361, 2011.

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

MASSA, G. D.; KIM, H. H.; WHEELER, R. M.; MITCHELL, C. A. Plant productivity in response to LED lighting. **HortScience**, v. 43, p. 1951-1956, 2008.

NARULA, A.; KUMAR, S.; SRIVASTAVA, P. S. Genetic fidelity of *in vitro* regenerants, encapsulation of shoot tips and high diosgenin content in *Dioscorea bulbifera* L., a potential alternative source of diosgenin. **Biotechnol Lett**, v. 29, p. 623-629, 2007.

NASCIMENTO, W.F.; SIQUEIRA, M.V.B.M.; FERREIRA, A.B.; MING, L.C.; PERONI, N.; VEASEY, E.A. Distribution, management and diversity of the endangered Amerindian yam (*Dioscorea trifida* L.). **Brazilian Journal of Biology**, v.75, p.104- 113 2015.

NG, S. Y. C. Micropropagation of white yam (*Dioscorea rotundata* Poir.). **In: High-tech and Micropropagation III**, Springer, Berlin, Heidelberg, 1992, p. 135-159.

OASHI, M. C. G. **Estudo da cadeia produtiva como subsídio para pesquisa e desenvolvimento do agronegócio do sisal na Paraíba**. 1999. 205p. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 1999.

OLIVEIRA, L. S. de; DIAS, P. C.; BRONDANI, G. E. Micropropagação de espécies florestais brasileiras. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 33, n. 76, p. 439-453, 2013.

PASTORI, G.M.; FOYER, C. Common components, networks and pathways of cross-tolerance to stress. The central role of 'redox' and abscisic acid-mediated controls. **Plant Physiology** v.129, p.460-468, 2002.

PEDRALLI, G. O inhame esse desconhecido. **Ciência Hoje**, v. 8, n. 46, p. 58-62, 1988.

PEDRALLI, G. Collecting yam germplasm in Brazil. **Plant Genetic Resources Newsletter**, v. 22, n. 1, p. 83-84, 1990.

PEDRALLI, G. O inhame esse desconhecido. **Ciência Hoje**, v. 8, n. 46, p. 58-62, 1988.

PENCE, V. C. Evaluating costs for the in vitro propagation and preservation of endangered plants. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 47, n. 1, p. 176-187, 2011.

PERULLO, N.; DETERMANN, R. O.; CRUSE-SANDERS, J. M.; G. S. Seed cryopreservation and micropropagation of the critically endangered species swamp pink (*Helonias bullata* L.). **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 51, n. 3, p. 284-293, 2015.

PETRO, D.; ONYEKA, T.; ETIENNE, S.; RUBENS, S. An interspecific genetic map of water yam (*Dioscorea alata* L.) based on AFLP markers and QTL analysis for anthracnose resistance. **Euphytica**, v. 179, p. 405–416, 2011.

RADEMACHER, W. Growth retardants: effects on gibberellin biosynthesis and other metabolic pathways. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**. v.51, p. 501-531, 2000.

RIZZINI CT; MORS WB. 1995. **Botânica Econômica Brasileira**. 2 ed., Rio de Janeiro, Âmbito Cultural, 248p.

SAKAR, D.; CHAKRABARTI, S. K.; NAIK, P. S. Slow-growth conservation of potato microplants: efficacy of ancymidol for long-term storage *in vitro*. **Euphytica**, v. 117, p. 133-142, 2001.

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

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

SANTOS, E. S., FONTINÉLLI, I. S. C., LACERDA, J. T., MATIAS, E. C., & BARBOSA, M. M. Sistema alternativo de produção de sementes de inhame (*Dioscorea* sp.). **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, v. 1, n. 1, p. 19-24, 2007b.

SANTOS, I.R.I.; SALOMÃO, A.N. *In vitro* Germination of zygotic embryos excised from cryopreserved endocarps of queen palm (*Syagrus romanzoffiana* (Cham.) Glassman). **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 53, p. 418-424, 2017.

SARASAN, V.; CRIPPS, R.; RAMSAY, M. M.; ATHERTON, C.; MCMICHEN, M.; PRENDERGAST, G.; ROWNTREE, J. K. Conservation in vitro of threatened plants—progress in the past decade. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 42, n. 3, p. 206-214, 2006.

SHARMA, S.; PAMIDIMARRIA, D. V. N. S.; ANANDA, K. G. V.; REDDY, M. P. Assessment of genetic stability in micropropagules of *Jatropha curcas* genotypes by RAPD and AFLP analysis. **Industrial Crops and Products**, v. 34, n. 2, p. 1003-1009, 2011.

SILVA, T. L.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. *In vitro* conservation of *Piper aduncum* and *Piper hispidinervum* under slow-growth conditions. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, DF,v.46, n. 4, p. 384-389, 2011.

SIQUEIRA, M.V.B.M. Yam: a neglected and under utilized crop in Brazil. **Horticultura Brasileira**, vol. 29, n. 1, p. 16-20, 2011.

SIQUEIRA, M. V. B. M.; DEQUIGIOVANNI, G.; CORAZON-GUIVIN, M. A.; FELTRAN, J. C.; VEASEY, E. A. DNA fingerprinting of water yam (*Dioscorea alata*) cultivars in Brazil based on microsatellite markers. **Horti Bras**, v. 30, p. 653–659, 2012.

SIQUEIRA, M. V. B. M; BONATELLI, M. L.; GÜNTHER, T.; GAWENDA, I.; SCHMID, K. J.; PAVINATO, V. A.; VEASEY, E. A. Water yam (*Dioscorea alata* L.) diversity pattern in Brazil: an analysis with SSR and morphological markers. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 61, p. 611-624, 2014.

TAMIRU, M.; BECKER, H. C.; MAASS, B. L. Diversity, distribution and management of yam landraces (*Dioscorea* spp.) in Southern Ethiopia. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 55, n. 1, p. 115-131, 2008.

TAY, D. Tropical and subtropical root and tuber crops. In: NORMAH, M. N.; CHIN, H. F.; REED, B. M. (eds) **Conservation of tropical plant species**. Springer, New York, pp 249–292, 2013

TETCHI, F. A.; ROLLAND-SABATE, A.; AMANI, G. N.; COLONNA, P. Molecular and physicochemical characterization of starches from yam, cocoyam, cassava, sweet potato and ginger produced in the Ivory Coast. **Journal Sci Food Agr**, v. 87, p. 1906–1916, 2007.

THAKUR, R.; SOOD, A.; NAGAR, P. K.; PANDEY, S.; SOBTI, R. C.; AHUJA, P. S. Regulation of growth of *Lilium* plantlets in liquid medium by application of paclobutrazol or ancymidol, for its amenability in a bioreactor system: growth parameters. **Plant cell reports**, v. 25, n. 5, p. 382-391, 2006.

THORPE, T.; STASSOLA, C.; YENG, E. C.; DE KLERK, G-J.; ROBERTS, A.; GEORGE, E.F. 2008. The components of plant culture media II: organic additions, osmotic and pH effects, and support systems. In: GEORGE EF; HALL MA; KLERK GJ (eds). **Plant propagation by tissue culture**, vol. 1. New York: Springer. p. 115-173.

USAMI, T.; MOCHIZUKI, N.; KONDO, M.; NISHIMURA, M.; NAGATANI, A. Cryptochromes and phytochromes synergistically regulate *Arabidopsis* root greening under blue light. **Plant Cell Physiology**, v. 45, p. 1798–1808, 2004.

VAILLANT, V.; BADE, P.; CONSTANT, C. Photoperiod affects the growth and development of yam plantlets obtained by *in vitro* propagation. **Biologia Plantarum**, v. 49, n. 3, p. 355-359, 2005.

VALOIS, A. C. C.; NASS, L. L.; GOES, M. **Conservação *ex situ* de recursos genéticos vegetais**. In: NASS, L. L.; VALOIS, A. C. C.; MELO, I. S. DE; VALADARES-INGLIS, M.A. (Ed.). Recursos genéticos e melhoramento de plantas. Rondonópolis: Fundação MT, 2001. p. 29-55.

VEASEY, E. A.; SIQUEIRA, M.V.B.M.; GOMES, L.R.; NASCIMENTO, W.F.; FERREIRA, A.B.; SILVA, D.; SILVA, E.; MING, L.C.; PERONI, N.; SANTOS, A.H. 2010. **Ocorrência e diversidade de espécies cultivadas do gênero *Dioscorea* em diversos agroecossistemas**

**brasileiros.** In MING, L.C., AMOROZO, M. C.M. and KFFURI, CW. Agrobiodiversidade no Brasil: experiências e caminhos da pesquisa. Recife: NUPEEA. p. 45-74.

VERDEIL, J. L.; AEMANNO, L.; NIEMENAK, N.; TRANBARGER, T. J. Pluripotent versus totipotent plant stem cells: dependence versus autonomy? **Trends in Plant Science**, v. 12, n. 6, p. 245-252, 2007

WHITELAM, G.; HALLIDAY, K. 2007. **Light and plant development.** Blackwell Publishing, Oxford, UK.

## Capítulo 1

**Fontes de luz e meios de cultura no desenvolvimento, anatomia e fotossíntese durante o cultivo *in vitro* e aclimatização de inhame (*Dioscorea alata*)**

## RESUMO

O experimento teve como objetivo avaliar os efeitos de diferentes qualidades de luz e de formulações nutritivas no desenvolvimento, fotossíntese e anatomia de plantas de inhame (*Dioscorea alata* var. *white* e *Dioscorea alata* var. *purpurae*) durante o cultivo *in vitro*, pré-aclimatização e aclimatização. O trabalho foi disposto em delineamento inteiramente casualizado, com arranjo fatorial 3 x 2, com três fontes de luz (lâmpadas LED, Módulo GreenPower e Fluorescente) e duas formulações nutritivas (MS e WPM). Segmentos caulinares utilizados como material vegetal foram oriundos de plantas já estabelecidas *in vitro*, cada um deles contendo 1 cm de comprimento e uma gema axilar. As culturas permaneceram 60, 21 e 60 dias nos ambientes *in vitro*, pré-aclimatização e aclimatização, respectivamente. As etapas do cultivo *in vitro* e pré-aclimatização ocorreram em sala de cultivo *in vitro*, com temperatura de  $25 \pm 2$  °C e fotoperíodo de 16 horas, fornecida pelas lâmpadas testadas. A aclimatização ocorreu em casa de vegetação, com sombreamento de 75%. Foram avaliadas características de crescimento, fisiológicas e anatômicas durante as três fases do crescimento. As duas variedades tiveram comportamentos distintos aos estímulos impostos. A variedade “Purpurae” teve melhor crescimento nas fases *in vitro* e pré-aclimatização quando cultivado em lâmpadas Fluorescentes. Na aclimatização, plantas oriundas das lâmpadas Módulo e Fluorescente, apresentaram maior altura da brotação e teor de pigmentos e maiores trocas gasosas foram observadas em plantas vindas do ambiente com irradiação promovida por Lâmpadas LED e Fluorescente. Já a variedade “White”, nas mesmas condições de cultivo *in vitro* obteve maior número de folhas em lâmpadas LED e Fluorescente e maiores teores de clorofilas no tratamento com LED. Durante a pré-aclimatização, plantas oriundas do cultivo *in vitro* em meio WPM apresentaram maiores médias para número de gemas e altura da parte aérea utilizando as fontes de luz LED e Módulo. Para o número de folhas, não houve interação dos fatores e maiores médias foram obtidas quando utilizadas as lâmpadas LED e Fluorescente. Não houve efeito significativo para o teor de pigmentos nesta fase. Durante a aclimatização, efeito isolado para a fonte de luz foi observado na massa fresca da raiz, com evidência para as lâmpadas Módulo e Fluorescente. Plantas oriundas do cultivo em meio WPM apresentaram maior massa fresca e seca da parte aérea. Plantas oriundas das fontes de luz Fluorescente apresentaram maior fotossíntese líquida e eficiência de carboxilação. Diante disso, sugere-se a utilização da lâmpada Fluorescente e do meio WPM no cultivo *in vitro* do inhame.

Palavras-chave: *Dioscorea alata*; fotomorfogênese; trocas gasosas.

## 1 INTRODUÇÃO

A morfologia e a fisiologia das plantas cultivadas *in vitro* são reguladas por diversos fatores ambientais como a luz, temperatura, umidade e dióxido de carbono (US-CAMAS et al., 2014) e composição do meio de cultivo. A formulação nutritiva usualmente utilizada no cultivo *in vitro* de diversas espécies de inhame é descrita por Murashige e Skoog (1962), conforme relato de Das et al, (2013). Porém, outros tipos de formulações nutritivas podem ser viáveis para o desenvolvimento desta cultura, como por exemplo o meio D-571, utilizado por Borges et al., (2004) na manutenção de inhame *in vitro*.

A luz participa ativamente de várias vias metabólicas nas plantas e mudanças no espectro, alterando a sua qualidade, podem favorecer o desenvolvimento *in vitro* afetando a anatomia foliar, durante o processo de expansão, por exemplo (KOPSELL; SAMS, 2013; SÁEZ et al. 2013). Sendo assim, é fundamental o controle da irradiância nas salas de cultivo *in vitro*.

Os fotorreceptores são responsáveis pela absorção da luz em diferentes espectros nas plantas e a ativação destes resulta em diferenciadas respostas morfogênicas (HENNIG et al., 2001; KAMI et al., 2010; LU et al., 2015). Os fitocromos são fotorreceptores que absorvem a luz no comprimento de onda vermelho e vermelho distante, que tem papel determinante no acúmulo de biomassa (YANG et al., 2016). Fototropinas e Criptocromos absorvem a luz azul e são responsáveis pelo controle da abertura estomática, crescimento das plantas, fototropismo e desenvolvimento das folhas (CHRISTIE, 2007; PEDMALE et al., 2016).

A integração da qualidade, duração e intensidade da luz vermelha ou vermelha distante (620-750 nm), luz azul (450-495), UV-A (320-500 nm) ou UV-B (280-320 nm) e vias de sinalização hormonal têm influência no crescimento e desenvolvimento das plantas por desencadearem reações fisiológicas (BRIGGS et al., 2001), além de controlarem a diferenciação de culturas de células, tecidos e órgãos de plantas (MOSHE; DALIA, 2007).

A luz branca fluorescente é tradicionalmente utilizada na cultura de tecidos *in vitro*, apresentando efeitos significativos no crescimento vegetal (SAEBO et al., 1995; SZOPA; EKIERT, 2016). Apresenta uma composição espectral ampla (320 a 800 nm) e heterogênea o que pode levar a uma baixa eficiência no fluxo de fótons fotossinteticamente ativos (PAR) (ALVARENGA et al., 2015). O uso de diodos emissores de luz (LEDs) surgiu como uma nova fonte de energia pelas vantagens apresentadas em comparação à lâmpada tradicional: têm maior vida útil, aquecimento mínimo, comprimento de onda específico e a largura da banda é estreita (NHUT; NAM, 2010), além de proporcionarem aumento dos teores de clorofila e carotenoides nos tecidos vegetais, aumento na taxa de multiplicação dos explantes e maior comprimento das

brotações (SKIN et al., 2008). Por essas características, as lâmpadas LED têm sido fonte de estudo na cultura *in vitro* de diversas espécies.

Pesquisas com diferentes quantidades e qualidades de luz têm indicado respostas distintas em plantas (SCHUERGER et al., 1995; ARENA et al., 2016), sugerindo que as respostas a esse tipo de estímulo são espécie-dependente (ARENA et al., 2016). Tendo em vista a importância de se conhecer sobre essas respostas, estudos sobre os efeitos da qualidade da luz no metabolismo vegetal devem ser ampliados. Trabalhos que relatem a utilização do meio WPM no cultivo de inhame são escassos, e pesquisas com foco em tipos de meio para *Dioscorea* podem ser promissoras.

Diante disso, o presente trabalho teve por objetivo avaliar as variações no desenvolvimento, fotossíntese e anatomia de plantas de inhame submetidas a diferentes qualidades de luz e formulações nutritivas durante os períodos *in vitro* e *ex vitro* (pré-aclimatização e aclimatização).

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Biotecnologia e Anatomia Vegetal e na Unidade Experimental da Universidade Federal do Acre, Rio Branco, Acre, no período de abril a agosto de 2018. As espécies utilizadas, *Dioscorea alata* var. *white* e *Dioscorea alata* var. *purpurea*, foram introduzidas *in vitro* e dois subcultivos foram realizados até conseguir material suficiente para a montagem do experimento.

### 2.1 CULTIVO *IN VITRO*

Segmentos nodais, contendo cerca de 1 cm e uma gema axilar, foram retirados da região mediana de plantas de inhame previamente estabelecidas *in vitro*, e utilizados como material vegetal.

Nesta etapa avaliou-se o tipo do meio de cultivo e a fonte de luz. O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, com arranjo fatorial 2 x 3, composto por dois meios de cultivo: MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) e WPM (LLOYD; MCCOWN, 1980) em três fontes de luz, com 15 repetições. As variedades de inhame foram analisadas separadamente.

As fontes de luz utilizadas diferem quanto à marca comercial, densidade de fluxo de fótons e qualidade da luz. A densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativa (PPFD) foi medida com sensor Quantum acoplado a um analisador de gás no infravermelho – IRGA modelo LI-64000 XT (LI-COR Inc., CA, EUA), posicionado à altura dos frascos de cultivo em relação à fonte de luz, embaixo de cada prateleira antes da instalação do experimento. As fontes de luz tiveram como características: lâmpada tubular fluorescente branca de marca comercial Empalux® (20 W) com  $76 \mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$  de PPFD; LED tubular branca de marca comercial Decorlux® (10 W) com  $101 \mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$  de PPFD e Módulo Green Power de cor vermelha e azul alternadas e na proporção de 5:2 em linha única, da marca comercial Philips®, com  $98 \mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$  de PPFD (Fig. 1).

O cultivo foi conduzido em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio, acrescido de 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, 2 g.L<sup>-1</sup> de carvão ativado, com pH ajustado para  $5,8 \pm 0,2$  e solidificado com 2,2 g.L<sup>-1</sup> de Phytigel™. A esterilização foi feita em autoclave de calor úmido a 121 °C e 1,3 atm por 20 minutos. As culturas foram mantidas em sala de crescimento *in vitro*, com fotoperíodo de 16 horas/dia à temperatura de  $25 \pm 2$  °C.

Figura 1. Cultivo *in vitro* de inhame. Microlantas de *D. alata* var. *purpureae* (A) e *D. alata* var. *white* (B); inhame cultivado em lâmpadas LED (C), Módulo GreenPower (D) e Fluorescente (E).



Decorridos 60 dias, avaliou-se altura da parte aérea (ALT), número de folhas expandidas (NFE), número de gemas (NG), teor de pigmentos fotossintetizantes e coletou-se material para realização de estudos anatômicos.

## 2.2 PRÉ-ACLIAMATIZAÇÃO EM SALA DE CULTIVO *IN VITRO*

Aos 60 dias de cultivo *in vitro*, as plantas produzidas tiveram suas raízes lavadas em água corrente e transferidas individualmente para copos descartáveis, com capacidade de 200 mL, contendo substrato comercial umedecido com 50 mL de água. Para manter a umidade, criou-se uma câmara úmida colocando-se outro copo em cima e vedando com filme de PVC, tornando o sistema fechado.

Os tratamentos foram mantidos em sala de cultivo à temperatura de  $25 \pm 2$  °C e 16 horas de fotoperíodo, fornecidas pelas três fontes de luz, onde permaneceram por mais 21 dias. Ao final deste período, foi avaliada a altura da parte aérea (ALT), número de folhas expandidas (NFE) e de gemas (NG), o teor de pigmentos (clorofila total, *a* e *b*, e carotenoides), fotossíntese

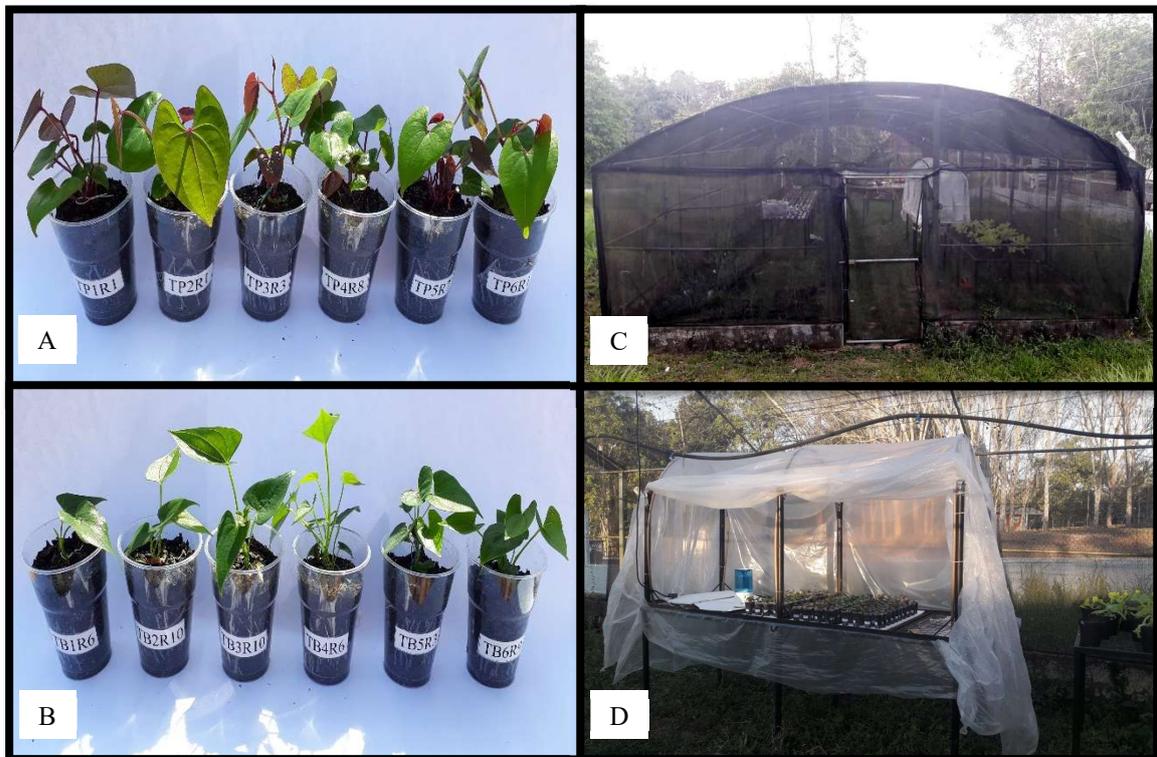
líquida ( $P_N$ ), condutância estomática ( $g_s$ ), eficiência do uso da água (EUA), eficiência de carboxilação (EC) e pressão parcial de  $CO_2$  ( $C_i$ ).

### 2.3 ACLIMATIZAÇÃO

Plantas com 21 dias de cultivo *ex vitro* foram retiradas da sala de cultivo *in vitro* e levadas à casa de vegetação com 75% de sombreamento e foram colocadas em condição de câmara úmida (Fig. 2) com aparelho umidificador ligado diariamente por quatro horas intercaladas. A irrigação foi realizada durante o período da manhã.

Aos 60 dias, foi avaliada a altura da parte aérea (ALT), número de folhas expandidas (NFE) e de gemas (NG), o teor de pigmentos (clorofila total, *a* e *b*, e carotenoides), fotossíntese líquida ( $P_N$ ), condutância estomática ( $g_s$ ), eficiência do uso da água (EUA), eficiência de carboxilação (EC) e pressão parcial de  $CO_2$  ( $C_i$ ), massa fresca e seca da parte aérea e raiz (MFPA, MFR, MSPA e MSR) e foram coletadas amostras foliares para estudo anatômico.

Figura 2. Plantas de *D. alata* var. *purpureae* (A) e *D. alata* var. *white* (B) com 60 dias de aclimatização em casa de vegetação (C) e estufa (D).



## 2.4 TROCAS GASOSAS

As trocas gasosas foram avaliadas utilizando-se um analisador de gás no infravermelho – IRGA (LI-64000 XT, LI-COR Inc., CA, EUA). Foram avaliadas a fotossíntese líquida ( $P_N$ ), a condutância estomática (gs) e a pressão parcial de  $CO_2$  ( $C_i$ ). Para tanto, foi utilizada a parte mediana da folha, evitando-se a nervura central. Nestas medidas, a temperatura da câmara foi mantida a 28 °C, a concentração de  $CO_2$  externa (referência) mantida em 400 ppm e a densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativa (PPFD) na folha, mantida em 100  $\mu\text{mol fótons m}^{-2}\text{s}^{-1}$  no ambiente de pré-aclimatização, e 200  $\mu\text{mol fótons m}^{-2}\text{s}^{-1}$  na aclimatização. A eficiência do uso da água (EUA) foi calculada pela relação entre a fotossíntese líquida e a transpiração foliar ( $P_N/E$ ). A eficiência de carboxilação (EC) foi verificada a partir da relação entre a fotossíntese líquida e a pressão parcial de  $CO_2$  ( $P_N/C_i$ ).

## 2.5 ANÁLISES ANATÔMICAS

As etapas de fixação, desidratação, pré-infiltração, infiltração, polimerização e emblocamento do material vegetal, foram realizadas conforme o seguinte protocolo: fixação em solução de FAA 70% (formaldeído 37-40 %, ácido acético glacial 100% e etanol 70% 1:1:18 v/v) por 48 horas, as quais foram conservadas em etanol 70% (JOHANSEN, 1940). Logo após, as amostras foram desidratadas em série alcoólica etílica crescente (80%, 90% - 100%, 100%) e incluídas em Historesina pura (Leica®).

Secções transversais seriadas de 5  $\mu\text{m}$  de espessura foram obtidas em micrótomo de rotação manual (Leica®, RM212RT) e coradas com Azul de Toluidina (0,5%) e montadas com Entellan® (Merck).

As lâminas foram visualizadas e analisadas sob microscópio de luz Leica® DM750 e os resultados registrados com sistema de captura de imagem Leica® ICC50 HD. Para caracterização histológica foram considerados caracteres qualitativos (descrição das principais estruturas) e quantitativos: espessura da epiderme nas faces adaxial e abaxial, incluindo a cutícula (EEAD e EEAB), número de células do parênquima paliçádico (NPP), espessura da camada de parênquima paliçádico e lacunoso (EPP e EPL, mm) e espessura total do limbo foliar (ELF, mm). As medidas biométricas foram realizadas com o software Fiji/ImageJ.

## 2.6 DETERMINAÇÃO DOS TEORES DE CLOROFILAS E CAROTENOIDES

A determinação dos teores de clorofilas e carotenoides foi realizada utilizando-se amostras de 50 mg de folhas picotadas, coletadas de cinco plantas, e inseridas em 5 mL de acetona 80% (v/v), onde permaneceram por 48 horas no escuro, à 4 °C. As absorvâncias dos extratos foram medidas nos comprimentos de ondas de 664, 646 e 470 nm (clorofila *a*, *b* e carotenoides, respectivamente) usando espectofotômetro UV. Os pigmentos foram estimados conforme Lichtenthaler (1987) e expressos em  $\text{mg g}^{-1}$  MF.

## 2.7 DETERMINAÇÃO DA MASSA FRESCA E SECA

A massa fresca das plantas foi obtida após a limpeza em água corrente para a retirada do substrato, em seguida tiveram as suas estruturas separadas em parte aérea e raiz e foram pesadas em balança analítica. Após, foram acondicionadas em sacos de papel em estufa de ventilação forçada de ar, à temperatura de 65° C por aproximadamente 96 horas. A pesagem do material foi feita a cada 24 horas, sendo a mesma realizada até o valor atingir massa constante.

## 2.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram submetidos ao teste de Grubbs (1969) para a verificação de dados discrepantes, pelo teste de Shapiro-Wilk (1965) para normalidade dos erros, e pelo teste de Bartlett (1937) para homogeneidade de variâncias. Na análise de variância, pelo teste F, verificou-se a significância dos efeitos (isolados e combinados) dos fatores. Quando significativos, efetuou-se o desdobramento, e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey (1949) a 5% de probabilidade.

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 CULTIVO *IN VITRO*

Não houve interação dos fatores para as variáveis de crescimento em análise, porém a fonte de luz e o tipo de meio nutritivo influenciaram, de forma isolada, no número de folhas expandidas, número de gemas e altura da parte aérea, em plantas de *D. alata* var. *purpureae* cultivadas *in vitro* (Tabela 1).

Tabela 1. Número de folhas expandidas (NFE), e gemas (NG) e altura da parte aérea (ALT) de plantas de *D. alata* var. *purpureae* cultivadas *in vitro*, em função da fonte de luz e do meio nutritivo, Rio Branco, Acre

Fonte de luz	NFE			NG			ALT (cm)		
	Meio			Meio			Meio		
	MS	WPM	$\bar{X}$	MS	WPM	$\bar{X}$	MS	WPM	$\bar{X}$
LED	5,2	5,06	<b>5,13ab</b>	4,2	4,8	<b>4,5b</b>	2,8	3,7	<b>3,25b</b>
Módulo	4,2	4,8	<b>4,5b</b>	3,7	4,9	<b>4,3b</b>	3,4	4,4	<b>3,9a</b>
FLUO	6,3	5,4	<b>5,87a</b>	5,5	5,7	<b>5,6a</b>	3,7	4,1	<b>3,9a</b>
$\bar{X}$	<b>5,24a</b>	<b>5,1a</b>		<b>4,4b</b>	<b>5,9a</b>		<b>3,3a</b>	<b>4,07a</b>	
CV (%)		<b>26,63</b>			<b>27,25</b>			<b>23,49</b>	

Notas: <sup>1</sup> Médias seguidas pela mesma letra não diferem ( $P \geq 0,05$ ) pelo teste de Tukey; <sup>2</sup> LED (LED Tubular); Módulo (Módulo GreenPower); FLUO (Tubular Fluorescente); <sup>3</sup> A análise de variância pode ser verificada no APÊNDICE 1.

Diferenças significativas para o número de folhas expandidas (NFE) foram observadas para o fator fonte de luz, sendo a lâmpada fluorescente (FLUO) e a LED estatisticamente iguais e superiores. O número de gemas (NG) foi influenciado pela fonte de luz e pelo tipo de meio. Isoladamente, a formulação WPM e a lâmpada fluorescente favoreceram maior número de gemas. Para a altura da parte aérea (ALT) as lâmpadas, fluorescente e módulo, evidenciaram médias maiores e significativamente iguais. A mistura das luzes LED azul e vermelha, no módulo, promoveu o crescimento de plantas cultivadas *in vitro*, porém o seu desenvolvimento foi afetado, uma vez que apresentaram as menores médias para NFE e NG.

Não houve diferença significativa para o teor de clorofila *a*. Efeito da interação da fonte de luz e formulação nutritiva foi observado para o teor de clorofila *b* e efeito isolado, da fonte de luz, para o teor de carotenoides e clorofila total, em *D. alata* var. *purpureae* (Tabela 2).

Tabela 2. Teor de pigmentos (mg g<sup>-1</sup> MF) de plantas de *D. alata* var. *purpureae* cultivadas *in vitro*, em função da fonte de luz e do meio nutritivo, Rio Branco, Acre

Fonte de luz	Clorofila a			Clorofila b			Clorofila total			Carotenoides		
	Meio			Meio			Meio			Meio		
	MS	WPM	$\bar{X}$	MS	WPM	$\bar{X}$	MS	WPM	$\bar{X}$	MS	WPM	$\bar{X}$
LED	1,47	1,57	<b>1,52</b>	0,7aA	0,9aA	<b>0,8</b>	2,2	2,5	<b>2,33a</b>	0,18	0,14	<b>0,16b</b>
Módulo	1,41	1,22	<b>1,32</b>	0,7aA	0,5aB	<b>0,6</b>	2,1	1,74	<b>1,91b</b>	0,22	0,26	<b>0,24a</b>
Fluo	1,50	1,40	<b>1,45</b>	0,6aA	0,7aA	<b>0,67</b>	2,1	2,1	<b>2,1ab</b>	0,33	0,27	<b>0,30a</b>
$\bar{X}$	<b>1,46</b>	<b>1,40</b>		<b>0,67</b>	<b>0,72</b>		<b>2,13a</b>	<b>2,11a</b>		<b>0,2a</b>	<b>0,2a</b>	
CV%	14,29			18,86			14,18			25,39		

Notas: <sup>1</sup> Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na linha e maiúscula na coluna, não diferem ( $P \geq 0,05$ ) pelo teste de Tukey; <sup>2</sup> LED (LED Tubular); Módulo (Módulo GreenPower); FLUO (Tubular Fluorescente); <sup>3</sup> A análise de variância pode ser verificada no APÊNDICE 2.

Independente da formulação nutritiva utilizada, plantas da variedade “Purpureae” cultivadas nas lâmpadas LED e Fluorescente evidenciaram maiores teores de clorofila *b*, assim como as que estiveram no meio MS na fonte de luz Módulo. A variável clorofila total comportou-se semelhante à clorofila *b* quando as plantas foram expostas à lâmpada LED, ficando evidenciado que nesta fonte de luz, maiores teores de clorofilas são encontrados. Diferentemente, plantas cultivadas em lâmpadas fluorescentes e Módulo obtiveram médias para o teor de carotenoides estatisticamente iguais e superiores, diferindo da LED.

Analisando os resultados do crescimento e de pigmentos fotossintéticos, evidencia-se que plantas cultivadas em lâmpadas LED com combinação de luzes azul e vermelha (Módulo) foram mais eficazes na utilização dos seus aparelhos fotossintéticos, uma vez que, mesmo apresentando menores teores de clorofila, promoveram maior crescimento.

Em plantas cultivadas *in vitro* de *D. alata* var. *white* não foi observada diferença significativa para o número de gemas (NG), todavia, efeito isolado dos fatores foi constatado para o número de folhas expandidas (NFE) e altura da parte aérea (ALT) (Tabela 3).

Tabela 3. Número de folhas expandidas (NFE) e altura da parte aérea (ALT) de plantas de *D. alata* var. *white* cultivadas *in vitro*, em função da fonte de luz e do meio nutritivo, Rio Branco, Acre

Fonte de luz	NFE			ALT		
	Meio			Meio		
	MS	WPM	$\bar{X}$	MS	WPM	$\bar{X}$
LED	4,3	5,3	<b>4,8ab</b>	4,0	3,65	<b>3,8a</b>
Módulo	4,5	4,0	<b>4,3b</b>	3,7	3,41	<b>3,65a</b>
FLUO	5,3	5,4	<b>5,3a</b>	4,15	3,35	<b>3,7a</b>
$\bar{X}$	<b>5,0a</b>	<b>4,5a</b>		<b>3,95a</b>	<b>3,44b</b>	
<b>CV (%)</b>		<b>29,41</b>			<b>22,27</b>	

Notas: <sup>1</sup> Médias seguidas pela mesma letra não diferem ( $P \geq 0,05$ ) pelo teste de Tukey; <sup>2</sup> LED (LED Tubular); Módulo (Módulo GreenPower); FLUO (Tubular Fluorescente); <sup>3</sup> A análise de variância pode ser verificada no APÊNDICE 3.

Diferenças significativas para a fonte de luz foram observadas para a variável NFE, tendo a lâmpada fluorescente apresentado média estatisticamente igual à LED. Observa-se que a formulação do meio MS promoveu o crescimento das plantas, uma vez que obteve maior altura da parte aérea, ainda, a fonte de luz não teve influência sobre esta variável.

Efeito isolado da fonte de luz foi observado para teor de clorofilas totais, *a* e *b*, em plantas *in vitro* da variedade “White” (Tabela 4). A lâmpada LED promoveu maiores teores para as três variáveis, ao passo que as fontes Módulo e Fluorescente não diferiram.

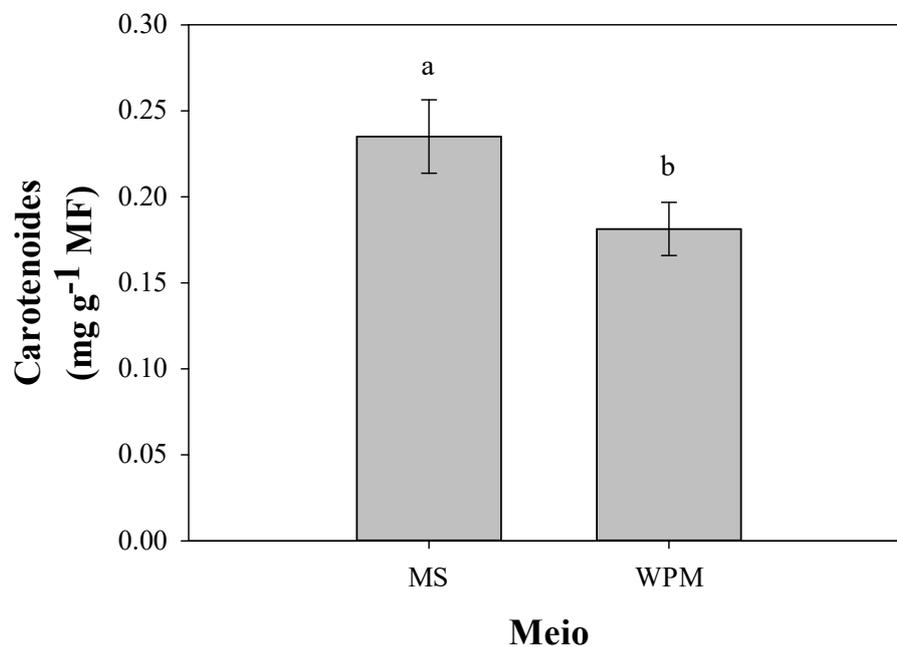
Tabela 4. Teor de pigmentos fotossintéticos (mg g<sup>-1</sup> MF) de plantas de *D. alata* var. *white* cultivadas *in vitro*, em função da fonte de luz, Rio Branco, Acre

Fonte de Luz	Variáveis		
	Chl <i>a</i>	Chl <i>b</i>	Chl total
LED	1,47 a	0,81 a	2,28 a
Módulo	0,74 b	0,40 b	1,19 b
FLUO	0,87 b	0,52 b	1,39 b
<b>CV (%)</b>	<b>28,43</b>	<b>27,31</b>	<b>26,91</b>

Notas: <sup>1</sup> Médias seguidas pela mesma letra não diferem ( $P \geq 0,05$ ) pelo teste de Tukey; <sup>2</sup> LED (LED Tubular); Módulo (Módulo GreenPower); FLUO (Tubular Fluorescente); <sup>3</sup> A análise de variância pode ser verificada no APÊNDICE 4.

O teor de carotenoides foi influenciado isoladamente pela formulação nutritiva do meio, com o MS apresentando maior nível (Fig. 3).

Figura 3. Teor de carotenoides de plantas de *D. alata* var. *white* cultivadas *in vitro*, em função do meio, Rio Branco, Acre

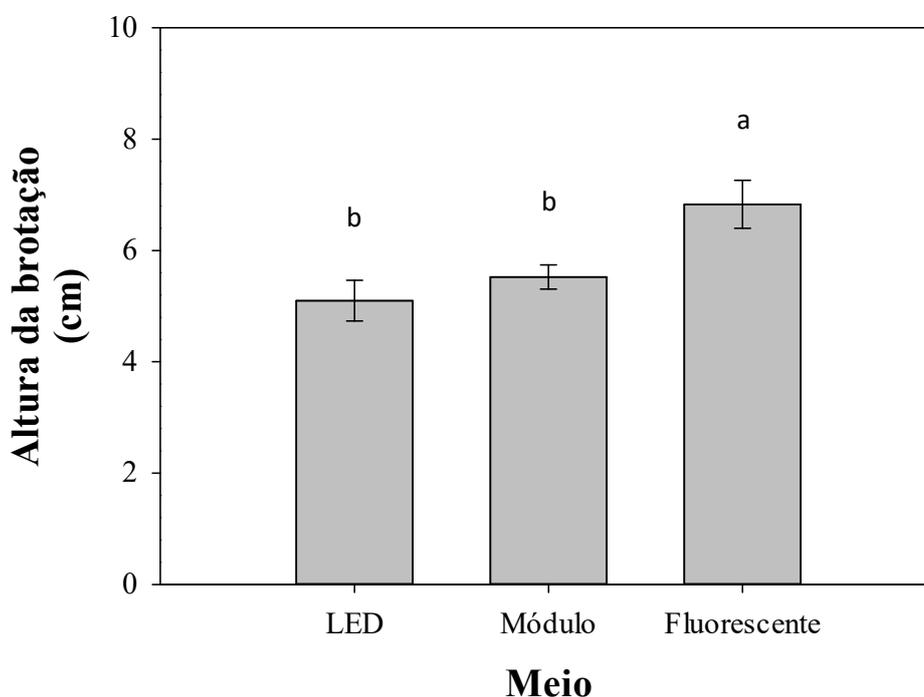


Nota: A análise de variância pode ser verificada no APÊNDICE 4.

### 3.2 PRÉ-ACLIAMATIZAÇÃO

Não foram observadas diferenças significativas para as variáveis NFE, NG e pigmentos fotossintetizantes para a *Dioscorea alata* var. *purpureae*. Apenas a variável altura da parte aérea (ALT) apresentou efeito isolado para a fonte luz (Fig. 4). A lâmpada fluorescente proporcionou maior crescimento de plantas, com um incremento de 33,92 e 23,73% em relação à LED e módulo, respectivamente.

Figura 4. Altura da parte aérea de plantas de *D. alata* var. *purpurae* pré-aclimatizadas, em função da fonte de luz, Rio Branco, Acre



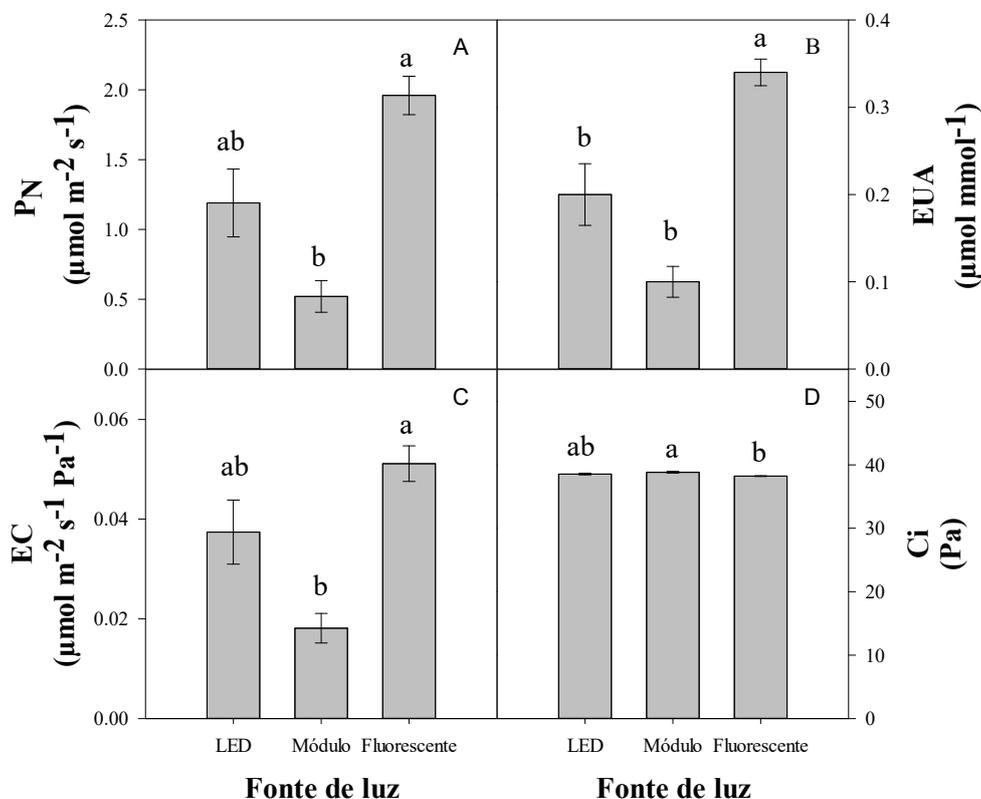
Nota: A análise de variância pode ser verificada no APÊNDICE 5.

Não houve combinação entre os fatores para as variáveis de trocas gasosas. Efeito isolado da fonte de luz foi observado para fotossíntese líquida (Fig. 5A), eficiência no uso da água (Fig. 5B), eficiência de carboxilação (Fig. 5C) e pressão parcial de CO<sub>2</sub> (Fig. 5D).

Plantas de inhame da variedade “Purpurae” pré-aclimatizadas na lâmpada fluorescente apresentaram maior taxa de assimilação de CO<sub>2</sub>, eficiência no uso da água e foi superior e estatisticamente igual à LED na eficiência de carboxilação. Resultados similarmente apresentados para a altura da parte aérea. Evidenciando a eficácia dessa fonte de luz durante esta fase. Ainda, plantas cultivadas neste tipo de lâmpada foram as que tiveram a menor pressão parcial de CO<sub>2</sub> na câmara subestomática, mostrando o bom funcionamento do aparato fotossintético nesta condição.

Foi verificada interação entre os fatores para as variáveis número de gemas (NG) e altura da parte aérea (ALT) de plantas *Dioscorea alata* var. *white*. Efeito isolado para a fonte de luz foi obtido para o número de folhas expandidas (NFE) (Tabela 5). Não houve efeito significativo para o teor de pigmentos fotossintéticos. Valores negativos da fotossíntese líquida foram observados nas medições de trocas gasosas, implicando que a taxa de assimilação de gás carbônico foi inferior à taxa respiratória (dados não mostrados).

Figura 5. Fotossíntese líquida ( $P_N$ ), eficiência no uso da água (EUA), eficiência de carboxilação (EC) e pressão parcial de  $CO_2$  ( $C_i$ ) de plantas de *D. alata* var. *purpurae* pré-aclimatizadas, em função da fonte de luz, Rio Branco, Acre



Nota: A análise de variância pode ser verificada no APÊNDICE 7.

Tabela 5. Número de folhas expandidas (NFE), número de gemas (NG) e altura da parte aérea (ALT) de plantas de *D. alata* var. *white* pré-aclimatizadas, em função da fonte de luz e do meio nutritivo, Rio Branco, Acre

Fonte de luz	NFE			NG			ALT (cm)		
	MS	WPM	$\bar{X}$	MS	WPM	$\bar{X}$	MS	WPM	$\bar{X}$
LED	7,7	6,1	<b>6,9ab</b>	3,1aB	3,8aA	<b>3,45</b>	4,76aA	4,86aA	<b>4,81</b>
Módulo	6,8	6,7	<b>6,75b</b>	3,4aB	2,9aA	<b>3,15</b>	4,72aA	5,1aA	<b>4,91</b>
FLUO	8,7	7,9	<b>8,3a</b>	5,3aA	3,0bA	<b>4,15</b>	5,69aA	4,17bA	<b>4,93</b>
$\bar{X}$	<b>7,7a</b>	<b>6,9a</b>		<b>3,93</b>	<b>3,23</b>		<b>5,05</b>	<b>4,71</b>	
<b>CV(%)</b>		<b>26,93</b>			<b>33,52</b>			<b>22,57</b>	

Notas: <sup>1</sup> Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na linha e maiúscula na coluna, não diferem ( $P \geq 0,05$ ) pelo teste de Tukey; <sup>2</sup> LED (LED Tubular); Módulo (Módulo GreenPower); FLUO (Tubular Fluorescente); <sup>3</sup> A análise de variância pode ser verificada no APÊNDICE 8.

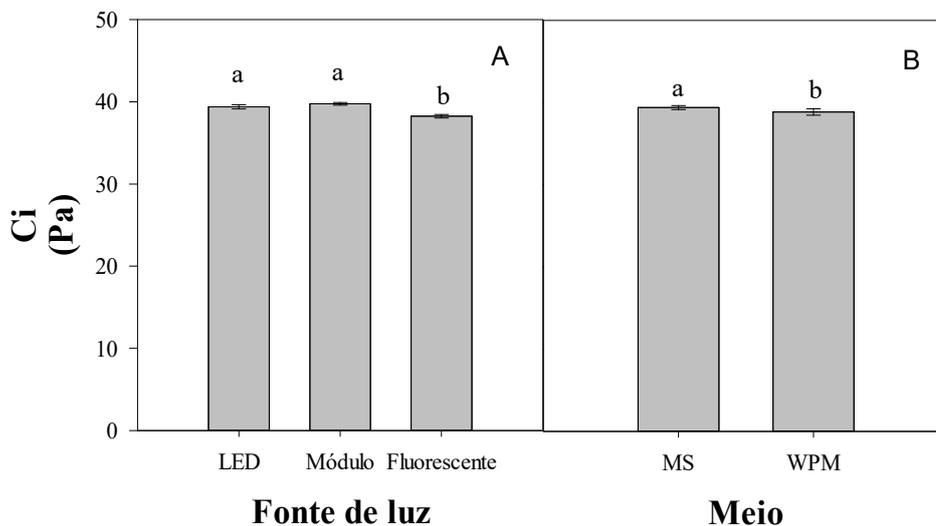
A lâmpada fluorescente favoreceu o maior número de folhas expandidas, sendo estatisticamente igual à LED, independente da formulação nutritiva utilizada.

Para o número de gemas e altura da parte aérea, independente do meio de cultivo, as lâmpadas LED e Módulo tiveram o mesmo comportamento. A tubular fluorescente foi a fonte

que, no meio MS, obteve o maior número de gemas, sendo estatisticamente igual às demais quando comparada na formulação do meio WPM. Ainda, para a variável altura da parte aérea, também com o meio MS, foi mais eficaz em promover o crescimento de plantas, tendo comportamento estatisticamente igual as outras lâmpadas.

Efeito isolado para as variáveis pressão parcial de CO<sub>2</sub> (Fig. 6) e condutância estomática foi observado (Fig. 7). Mesmo apresentando pressão parcial de CO<sub>2</sub> em níveis próximos, plantas cultivadas nas lâmpadas LED e módulo tiveram médias estatisticamente iguais e superiores àquelas oriundas da lâmpada fluorescente. Esta variável ainda apresentou diferença entre os meios utilizados e as plantas cultivadas em meio MS tiveram médias maiores.

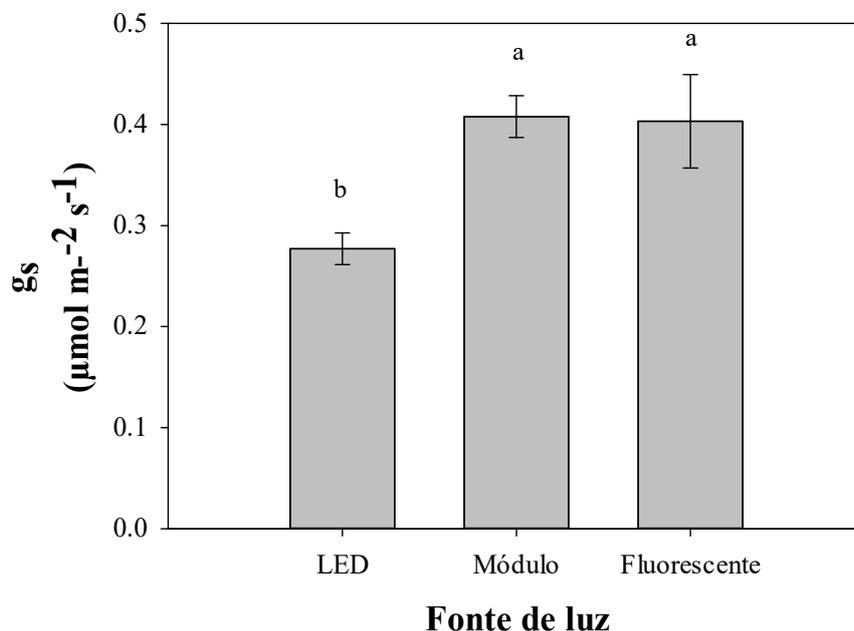
Figura 6. Pressão parcial de CO<sub>2</sub> de plantas de *D. alata* var. *white* pré-aclimatizadas, em função da fonte de luz (A) e do meio nutritivo (B), Rio Branco, Acre



Nota: A análise de variância pode ser verificada no APÊNDICE 10.

A pressão parcial de CO<sub>2</sub> em plantas pré-aclimatizadas na luz fluorescente, mesmo sendo menor, refletiu em maior eficiência na assimilação do gás carbônico, uma vez que estas plantas obtiveram maiores médias para as variáveis de crescimento. Podendo ainda induzir algum tipo de limitação bioquímica durante a fase de assimilação do CO<sub>2</sub> nas plantas cultivadas em lâmpadas LED azul/vermelha (módulo), uma vez que a sua condutância estomática foi estatisticamente igual às cultivadas em lâmpada fluorescente (Fig. 7).

Figura 7. Condutância estomática de plantas de *D. alata* var. *white* pré-aclimatizadas, em função da fonte de luz, Rio Branco, Acre



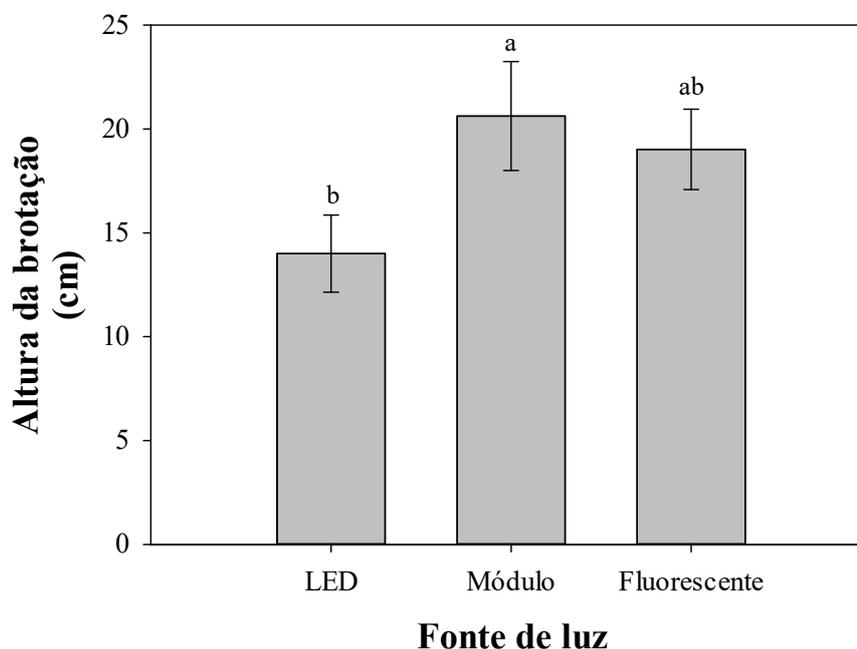
Nota: A análise de variância pode ser verificada no APÊNDICE 10.

### 3.3 ACLIMATIZAÇÃO

Não foi verificada combinação entre os fatores nas variáveis de crescimento e fisiológicas, porém cada um comportou-se de forma isolada para *D. alata* var. *purpurae*. A altura da parte aérea foi influenciada pelas fontes de luz, sendo o Módulo e a Fluorescente estatisticamente iguais (Fig. 8).

Plantas aclimatizadas de *D. alata* var. *purpurae* não apresentaram diferença significativa para o teor de clorofila *b*. Os demais pigmentos analisados apresentaram comportamento semelhante, evidenciando que a utilização das fontes Módulo e Fluorescente favoreceram teores maiores (Tabela 6). Comportamento este também observado para a variável altura da parte aérea, descrito acima. Efeito isolado da formulação nutritiva também foi verificado para as variáveis clorofila total, *a* e carotenoide, tendo o meio WPM apresentado maior conteúdo.

Figura 8. Altura da parte aérea de *D. alata* var. *purpurae* aclimatizadas, em função da fonte de luz, Rio Branco, Acre



Nota: A análise de variância pode ser verificada no APÊNDICE 11.

Tabela 6. Teor de pigmentos (mg g<sup>-1</sup>MF) de plantas de *D. alata* var. *purpurae* aclimatizadas, em função da fonte de luz e do meio nutritivo, Rio Branco, Acre

Fonte de luz	Chl a			Carotenoides			Chl total		
	MS	WPM	$\bar{X}$	MS	WPM	$\bar{X}$	MS	WPM	$\bar{X}$
LED	1,38	1,76	<b>1,57b</b>	0,30	0,38	<b>0,34b</b>	1,85	2,27	<b>2,05b</b>
Módulo	1,72	2,12	<b>1,92a</b>	0,40	0,42	<b>0,41a</b>	2,29	2,75	<b>2,52a</b>
FLUO	1,74	2,09	<b>1,92a</b>	0,37	0,44	<b>0,41a</b>	2,43	2,73	<b>2,58a</b>
$\bar{X}$	<b>1,61b</b>	<b>1,99a</b>		<b>0,36b</b>	<b>0,41a</b>		<b>2,19b</b>	<b>2,58a</b>	
<b>CV(%)</b>	<b>15,58</b>			<b>12,44</b>			<b>16,15</b>		

Notas: <sup>1</sup> Médias seguidas pela mesma letra não diferem ( $P \geq 0,05$ ) pelo teste de Tukey; <sup>2</sup> LED (LED Tubular); Módulo (Módulo GreenPower); FLUO (Tubular Fluorescente); <sup>3</sup> A análise de variância pode ser verificada no APÊNDICE 12.

As massas fresca e seca, da parte aérea e raiz, tiveram efeito isolado para a formulação nutritiva e meio WPM favoreceu maior acúmulo destas (Tabela 7). Observa-se que o meio WPM favoreceu incrementos de 30,24 e 30,06 % na massa fresca da parte aérea e raiz, e de 33,33 e 40% na massa seca da parte aérea e raiz, respectivamente.

Houve efeito isolado das fontes de luz para os parâmetros das trocas gasosas (Fig. 9). Não houve efeito significativo para a eficiência de carbolixação. A taxa de assimilação e a pressão parcial de CO<sub>2</sub> (Fig. 9A e 9C), tiveram comportamento semelhante, evidenciando melhores resultados quando utilizadas as lâmpadas LED e fluorescente. A condutância estomática foi maior

nas plantas oriundas da fonte de luz fluorescente e menor naquelas cultivadas no módulo (Fig. 9B). Efeito inverso a este, foi observado na eficiência do uso da água (Fig. 9D). Plantas que tiveram menor condutância estomática foram aquelas que apresentaram maior eficiência do uso da água e o contrário também foi observado.

Tabela 7. Massa fresca e seca da parte aérea e raiz (g) de plantas de *D. alata* var. *purpureae* aclimatizadas, em função do meio nutritivo, Rio Branco, Acre

Tipo de meio	Variáveis			
	MFPA	MFR	MSPA	MSR
MS	4,43b	2,96b	0,45b	0,20b
WPM	5,77a	3,85a	0,60a	0,28a
<b>CV (%)</b>	<b>23,65</b>	<b>27,95</b>	<b>25,85</b>	<b>35,27</b>

Notas: <sup>1</sup> Médias seguidas pela mesma letra não diferem ( $P \geq 0,05$ ) pelo teste de Tukey; <sup>2</sup> A análise de variância pode ser verificada no APÊNDICE 13.

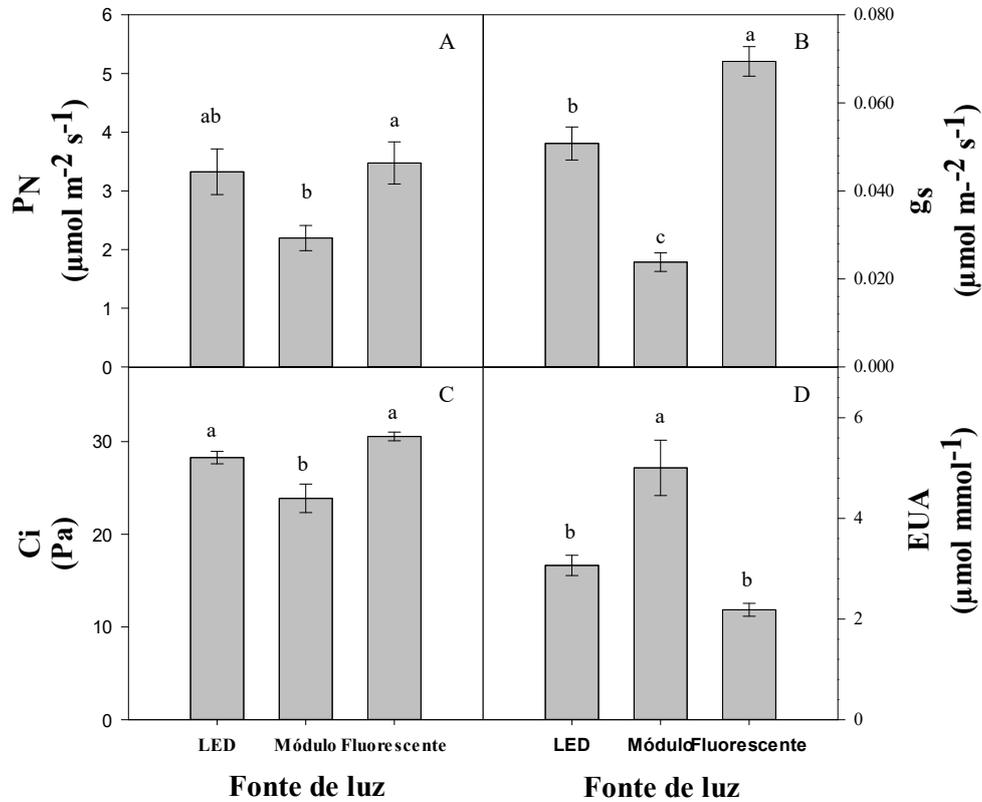
Plantas cultivadas *in vitro* no meio WPM tiveram maior acúmulo de massa fresca e seca possivelmente devido aos maiores conteúdos de pigmentos fotossintéticos, independente da fonte de luz utilizada.

Não houve combinação entre os fatores para as variáveis de crescimento e fisiológicas de plantas aclimatizadas de *Dioscorea alata* var. *white*, no entanto, efeito isolado foi evidenciado para o teor de clorofila *b* (Fig. 10); MFPA, MFR e MSPA (Tabela 8); e  $P_N$ , EC e Ci (Fig. 11). Plantas oriundas do meio MS apresentaram incremento de 27,27% no teor de clorofila *b* em relação ao meio WPM, independente da fonte de luz utilizada.

Diferenças significativas foram observadas para a massa fresca e seca da parte aérea em relação ao meio de cultivo (Tabela 8) em plantas aclimatizadas de *Dioscorea alata* var. *white*. Plantas oriundas do meio WPM obtiveram maiores médias para estas variáveis. A massa fresca da raiz teve efeito significativo para a fonte de luz, evidenciando que o uso das lâmpadas módulo e fluorescente, durante as fases anteriores de crescimento e desenvolvimento da planta, favoreceu maior acúmulo de massa do sistema radicular.

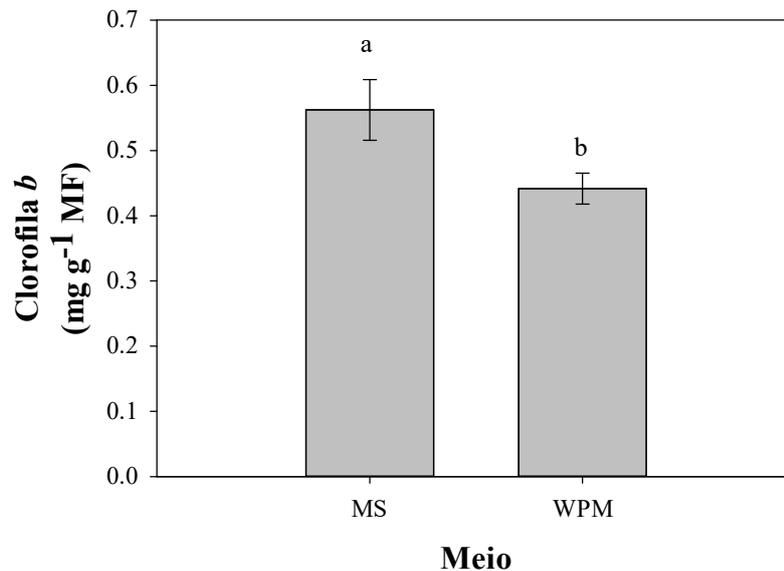
Foi observado efeito isolado para as fontes de luz em plantas aclimatizadas de *D. alata* var. *white* para as variáveis  $P_N$ , EC e Ci (Fig. 11). Não houve efeito significativo para EUA e  $g_s$ . Plantas oriundas do ambiente *in vitro* cultivadas sob luz Fluorescente e Módulo apresentaram maior taxa fotossintética (Fig. 11A) e eficiência de carboxilação (Fig. 11B). As lâmpadas LED e Módulo foram mais eficazes no aumento da pressão parcial de CO<sub>2</sub> (Fig. 11 C).

Figura 9. Fotossíntese líquida ( $P_N$ ), condutância estomática ( $g_s$ ), pressão parcial de  $CO_2$  ( $C_i$ ) e eficiência no uso da água (EUA) de plantas de *D. alata* var. *purpurae* aclimatizadas, em função da fonte de luz, Rio Branco, Acre



Nota: A análise de variância pode ser verificada no APÊNDICE 14.

Figura 10. Teor de clorofila *b* de plantas de *D. alata* var. *white* aclimatizadas, em função do meio nutritivo, Rio Branco, Acre



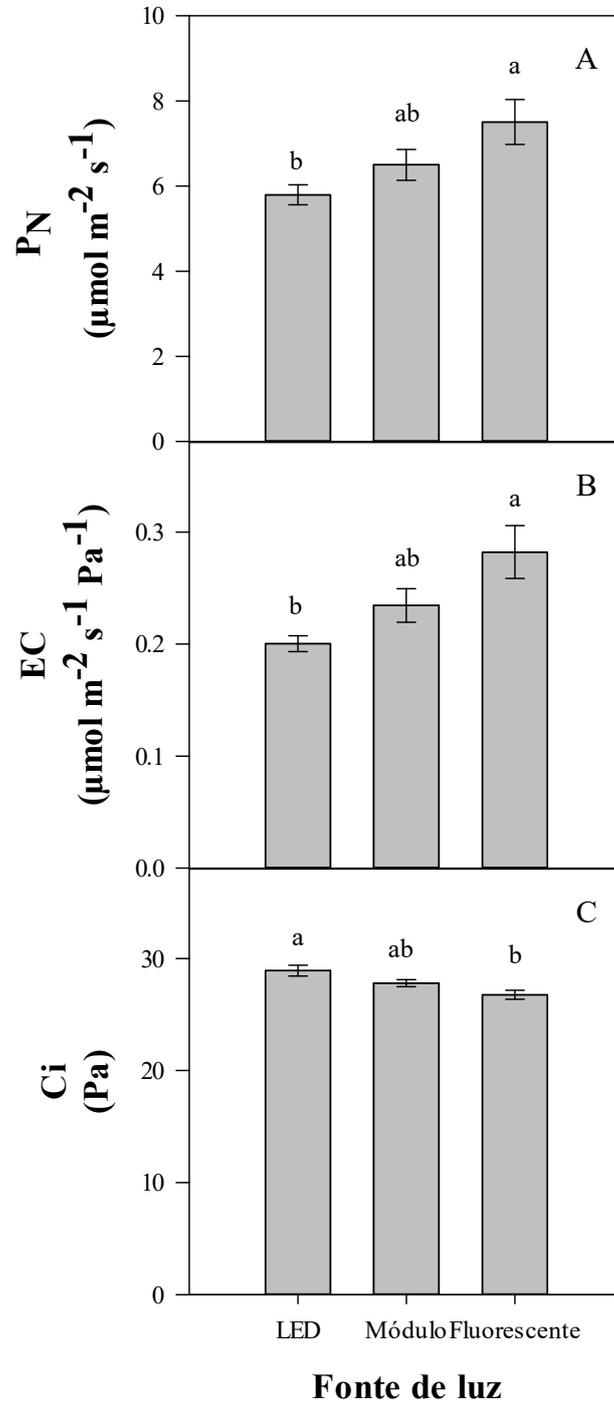
Nota: A análise de variância pode ser verificada no APÊNDICE 16.

Tabela 8. Massa fresca e seca da parte aérea, e massa fresca (g) da raiz de plantas de *D. alata* var. *white* aclimatizadas, em função do meio nutritivo e da fonte de luz, Rio Branco, Acre

Fonte de luz	MFPA			MFR			MSPA		
	Meio			Meio			Meio		
	MS	WPM	$\bar{X}$	MS	WPM	$\bar{X}$	MS	WPM	$\bar{X}$
LED	2,10	2,70	<b>2,40a</b>	1,61	1,85	<b>1,74b</b>	0,25	0,36	<b>0,29a</b>
Módulo	3,10	4,14	<b>3,63a</b>	2,96	3,87	<b>3,41a</b>	0,37	0,50	<b>0,44a</b>
FLUO	2,41	4,60	<b>3,00a</b>	2,40	2,48	<b>2,45ab</b>	0,28	0,47	<b>0,38a</b>
$\bar{X}$	<b>2,54b</b>	<b>3,48a</b>		<b>2,33a</b>	<b>2,74a</b>		<b>0,30b</b>	<b>0,44a</b>	
<b>CV(%)</b>	<b>37,17</b>			<b>48,40</b>			<b>37,17</b>		

Notas: <sup>1</sup> Médias seguidas pela mesma letra não diferem ( $P \geq 0,05$ ) pelo teste de Tukey; <sup>2</sup> LED (LED Tubular); Módulo (Módulo GreenPower); FLUO (Tubular Fluorescente); <sup>3</sup> A análise de variância pode ser verificada no APÊNDICE 17.

Figura 11. Fotossíntese líquida ( $P_N$ ), eficiência de carboxilação ( $EC$ ) e pressão parcial de  $CO_2$  ( $C_i$ ) de plantas de *D. alata* var. *white* aclimatizadas, em função da fonte de luz, Rio Branco, Acre



Nota: A análise de variância pode ser verificada no APÊNDICE 18.

### 3.4 QUALIDADE DA LUZ E MEIO NUTRITIVO NOS PARÂMETROS ANATÔMICOS

Alterações na anatomia foliar de plantas de inhame (*D. alata* var. *purpurae*) foram observadas no cultivo *in vitro* e na aclimatização. Houve interação entre os fatores para a espessura da epiderme abaxial (Tabela 10). As demais variáveis tiveram efeito isolado para a fonte de luz (Tabela 9).

Plantas de inhame propagadas *in vitro* em lâmpada Fluorescente apresentaram maiores espessuras do parênquima paliçádico e lacunoso, assim como da epiderme adaxial e do limbo foliar. Maior número de células do parênquima paliçádico foi evidenciado em plantas cultivadas na fonte de luz Módulo.

Tabela 9. Anatomia foliar de plantas de *D. alata* var. *purpurae* propagadas *in vitro* em função da fonte de luz, Rio Branco, Acre

Fonte de luz	EPP (mm)	EPL(mm)	EEAD (mm)	ELF (mm)	NPP (n°)
LED	0,11 b	0,19 b	0,062 b	0,47 b	13,4 b
Módulo	0,11 b	0,20 b	0,071 ab	0,49 b	17,3 a
FLUO	0,18 a	0,24 a	0,094 a	0,64 a	13,1 b
<b>CV (%)</b>	<b>25,44</b>	<b>14,51</b>	<b>24,27</b>	<b>15,41</b>	<b>12,47</b>

Notas: <sup>1</sup> Médias seguidas pela mesma letra não diferem ( $P \geq 0,05$ ) pelo teste de Tukey; <sup>2</sup> LED (LED Tubular); Módulo (Módulo GreenPower); FLUO (Tubular Fluorescente); <sup>3</sup>EPP: espessura do parênquima paliçádico; EPL: espessura do parênquima lacunoso; EEAD: espessura da epiderme adaxial; ELF: espessura do limbo foliar; NPP: número de células do parênquima paliçádico; <sup>3</sup> Apêndice 19.

Maior espessura da epiderme abaxial foi proporcionada utilizando a lâmpada fluorescente como fonte de luz e o meio WPM como fonte nutritiva (Tabela 10).

Tabela 10. Espessura da epiderme abaxial (EEAB) de plantas de *D. alata* var. *purpurae* propagadas *in vitro* em função da fonte de luz e do meio nutritivo, Rio Branco, Acre

Fontes de luz	Meio	
	MS	WPM
LED	0,10 abA	0,11 bA
Módulo	0,09 bB	0,14 bA
Fluorescente	0,13 aB	0,18 aA
<b>CV (%)</b>	<b>14,54</b>	

Notas: <sup>1</sup> Médias seguidas pela letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem ( $P \geq 0,05$ ) pelo teste de Tukey; <sup>2</sup> LED (LED Tubular); Módulo (Módulo GreenPower); FLUO (Tubular Fluorescente); <sup>3</sup> Apêndice 19.

Houve efeito significativo da interação dos fatores para a espessura da epiderme adaxial (EEAD) e efeito isolado da fonte luz para o número de células do parênquima paliçádico em plantas de inhame da variedade “White” cultivadas *in vitro* (Tabela 11). Quando cultivadas em meio MS, plantas apresentaram maior EEAD quando expostas à lâmpada LED, já quando cultivadas em meio WPM, a espessura foi maior em plantas expostas às fontes Módulo e Fluorescente. Maior número de

células do parênquima paliçádico ficou evidenciado quando as plantas de inhame foram submetidas à luz que combina LED's vermelhos e azuis (Módulo).

Tabela 11. Espessura da epiderme adaxial (EEAD) e número de células do parênquima paliçádico (NPP) de plantas de *D. alata* var. *white* propagadas *in vitro* em função da fonte de luz e do meio nutritivo, Rio Branco, Acre

Fontes de luz	EEAD (mm)			NPP (n°)		
	Meio			Meio		
	MS	WPM	Média	MS	WPM	Média
LED	0,10 aA	0,07 aB	<b>0,085</b>	13,0	14,0	<b>13,5 b</b>
Módulo	0,07 bB	0,09 aA	<b>0,08</b>	18,5	16,75	<b>17,6 a</b>
FLUO	0,09 abA	0,09 aA	<b>0,09</b>	12,75	14,0	<b>13,4 b</b>
<b>Média</b>	<b>0,086</b>	<b>0,083</b>		<b>14,75 A</b>	<b>14,92 A</b>	
<b>CV (%)</b>	<b>16,8</b>			<b>10,11</b>		

Notas: <sup>1</sup> Médias seguidas pela letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem ( $P \geq 0,05$ ) pelo teste de Tukey; <sup>2</sup> LED (LED Tubular); Módulo (Módulo GreenPower); FLUO (Tubular Fluorescente); <sup>3</sup> Apêndice 20.

Efeito significativo para a interação das fontes de variação foi observado para a espessura do parênquima paliçádico (EPP) e efeito isolado da formulação nutritiva para o número de células do parênquima paliçádico (NPP) em plantas aclimatizadas de inhame da variedade “Purpureae” (Tabela 12). Efeito não significativo para EPP de plantas cultivadas em meio WPM foi evidenciado, independente da fonte de luz utilizada. Já em plantas propagadas em MS, as lâmpadas Módulo e Fluorescente tiveram médias superiores e estatisticamente iguais. O NPP das plantas dessa variedade foi superior quando oriundas do meio MS.

Tabela 12. Espessura do Parênquima paliçádico (EPP) e Número de células do parênquima paliçádico (NPP) de plantas de *D. alata* var. *purpureae* aclimatizadas em função da fonte de luz e do meio nutritivo, Rio Branco, Acre

Fontes de luz	EPP (mm)			NPP (n°)		
	Meio			Meio		
	MS	WPM	Média	MS	WPM	Média
LED	0,15 bB	0,18 aA	<b>0,17</b>	13,25	12,25	<b>12,75 a</b>
Módulo	0,22 aA	0,20 aA	<b>0,21</b>	15,0	12,5	<b>13,75 a</b>
FLUO	0,19 aA	0,18 aA	<b>0,19</b>	15,5	13,5	<b>14,5 a</b>
<b>Média</b>	<b>0,19</b>	<b>0,19</b>		<b>14,58 A</b>	<b>12,75 B</b>	
<b>CV (%)</b>	<b>10,78</b>			<b>10,13</b>		

Notas: <sup>1</sup> Médias seguidas pela letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem ( $P \geq 0,05$ ) pelo teste de Tukey; <sup>2</sup> LED (LED Tubular); Módulo (Módulo GreenPower); FLUO (Tubular Fluorescente); <sup>3</sup> Apêndice 21.

Interação significativa pode ser observada para as variáveis EPP, EPL, ELF e NPP de plantas de inhame aclimatizadas da variedade “White” (Tabela 13). Plantas aclimatizadas oriundas de lâmpadas LED apresentaram diferença significativa apenas para o número de células do parênquima

paliçádico, apresentando médias superiores no meio WPM. Na fonte de luz módulo, o meio WPM apresentou maiores espessuras do parênquima lacunoso e do limbo foliar. A lâmpada fluorescente favoreceu maiores espessuras do parênquima paliçádico e do limbo foliar em plantas cultivadas em meio MS.

Tabela 13. Anatomia foliar de plantas de *D. alata* var. *white* aclimatizadas em função da fonte de luz e do meio nutritivo, Rio Branco, Acre

Fontes de luz	EPP (mm)		EPL (mm)		ELF (mm)		NPP (n°)	
	Meio		Meio		Meio		Meio	
	MS	WPM	MS	WPM	MS	WPM	MS	WPM
LED	0,15bA	0,18bA	0,24aA	0,24bA	0,63bA	0,68bA	12,8bB	15,5aA
Módulo	0,28aA	0,25aA	0,27aB	0,34aA	0,78aB	0,88aA	14,8aA	14,0bA
FLUO	0,24aA	0,18bB	0,30aA	0,24bA	0,79aA	0,66bB	14,0abA	13,8bA
<b>CV(%)</b>	<b>14,7</b>		<b>14,6</b>		<b>8,7</b>		<b>6,5</b>	

Notas: <sup>1</sup> Médias seguidas pela letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem ( $P \geq 0,05$ ) pelo teste de Tukey; <sup>2</sup> LED (LED Tubular); Módulo (Módulo GreenPower); FLUO (Tubular Fluorescente); <sup>3</sup> EPP: espessura do parênquima paliçádico; EPL: espessura do parênquima lacunoso; ELF: espessura do limbo foliar; NPP: número de células do parênquima paliçádico; <sup>4</sup> Apêndice 22.

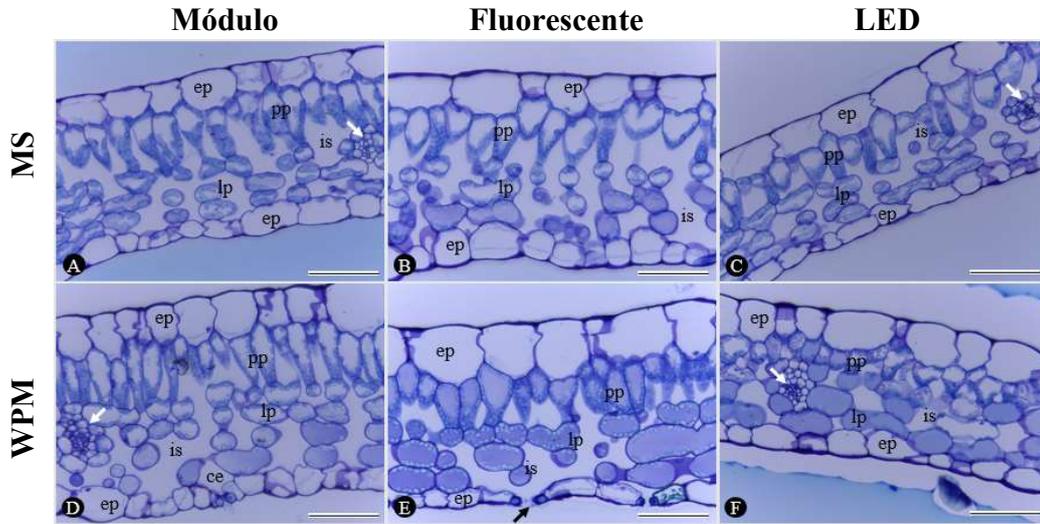
#### *Características anatômicas das folhas*

Plantas de *D. alata* cultivadas sob diferentes condições luminosas e meios nutritivos apresentaram estrutura dorsiventral e hipoestomática da lâmina foliar (Fig. 12, 13, 14 e 15).

Plantas da variedade “Purpureae” cultivadas *in vitro*, de forma geral, apresentaram células da epiderme volumosas, parênquimas paliçádico e lacunoso bem definidos, e espaços intercelulares mais evidentes no tratamento com lâmpada Fluorescente (Fig. 12 b, e). Maior incidência de células com alongamento periclinal pode ser observada no tratamento com lâmpadas LED (Fig. 12 c, f).

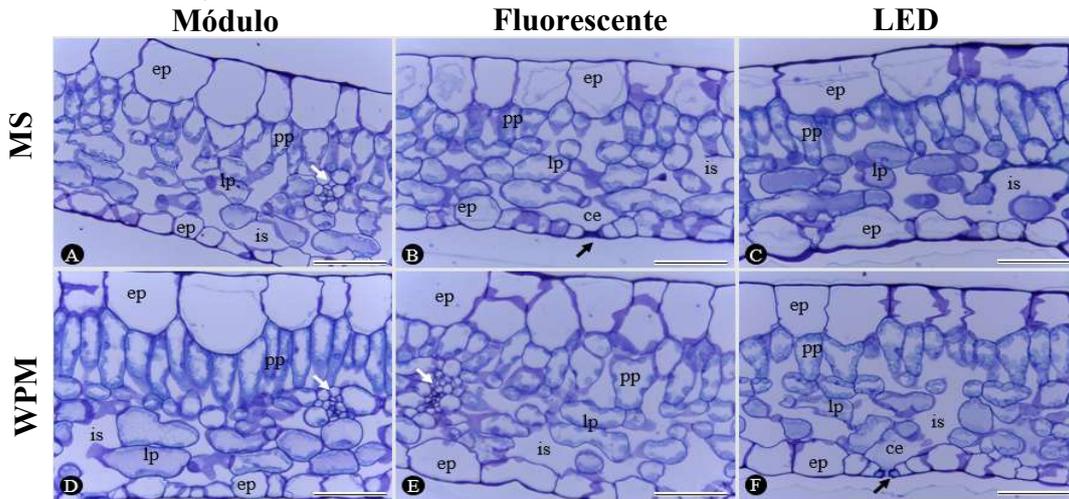
O cultivo *in vitro* de plantas da variedade “White” sob as três fontes de luz, proporcionou diferentes respostas na anatomia foliar (Fig. 13), que, de forma geral, apresentaram células da epiderme volumosas e justapostas, células do parênquima paliçádico com formatos variados, com destaque para o tratamento com lâmpada Fluorescente e meio MS, que não apresenta distinção entre as células do mesofilo (Fig. 13b). Células do parênquima paliçádico mais alongadas e justapostas podem ser observadas em plantas cultivadas sob combinação de luz azul e vermelha (Fig. 13d), tendo estas ainda apresentado menor espaço intercelular entre as células do mesofilo.

Figura 12. Secções transversais do limbo foliar de plantas de *D. alata* var. *purpurae* propagadas *in vitro* em função da fonte de luz e do meio nutritivo, Rio Branco, Acre



Notas: pp: parênquima paliçádico; ep: epiderme; is: espaço intercelular; lp: parênquima lacunoso. Barras: a, b, c, d, e, f: 0,2 mm; seta branca - feixe vascular; seta preta - estômatos.

Figura 13. Secções transversais do limbo foliar de plantas de *D. alata* var. *white* propagadas *in vitro* em função da fonte de luz e do meio nutritivo, Rio Branco, Acre



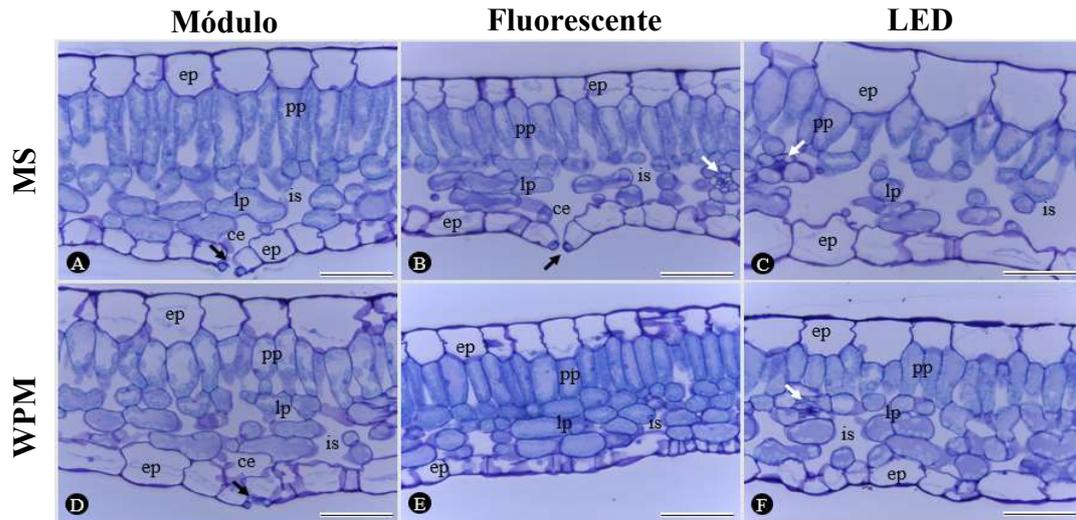
Notas: pp: parênquima paliçádico; ep: epiderme; is: espaço intercelular; lp: parênquima lacunoso. Barras: a, b, c, d, e, f: 0,2 mm; seta branca - feixe vascular; seta preta - estômatos.

Após o período de aclimatização, observa-se maior organização do mesofilo em plantas da variedade “Purpurae” oriundas das fontes Módulo e Fluorescente (Fig. 14 a, b, d, e). Em todos os tratamentos, o parênquima lacunar é composto por três camadas de células, com incidência de alongamento periclinal. Destaca-se as plantas oriundas da Lâmpada Fluorescente e meio WPM que apresentaram mesofilo mais denso, com pouco espaço intercelular (Fig. 14 e).

Plantas da variedade “White” aclimatizadas, apresentaram células epidérmicas volumosas, mesofilo bem definido e parênquima lacunar composto por pelo menos três camadas de células (Fig.

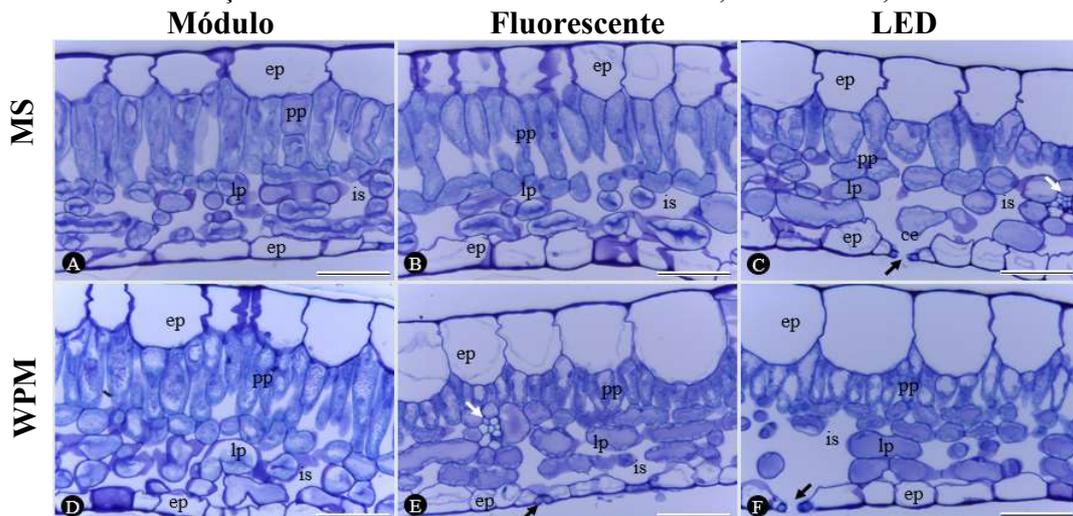
15). Mesofilo com espaços intercelulares menos evidentes foi observado nos tratamentos com fonte de luz Módulo (Fig. 15a, d). As células do parênquima paliçádico apresentaram pouca variação de formato, com destaque para as plantas oriundas do Módulo, meio MS e WPM, e da Fluorescente em meio MS, que evidenciaram camada de células mais alongadas (Fig. 15a, b, d).

Figura 14. Secções transversais do limbo foliar de plantas de *D. alata* var. *purpurae* aclimatizadas em função da fonte de luz e do meio nutritivo, Rio Branco, Acre



Notas: pp: parênquima paliçádico; ep: epiderme; is: espaço intercelular; lp: parênquima lacunoso. Barras: a, b, c, d, e, f: 0,2 mm; seta branca - feixe vascular; seta preta - estômatos.

Figura 15. Secções transversais do limbo foliar de plantas de *D. alata* var. *white* aclimatizadas em função da fonte de luz e do meio nutritivo, Rio Branco, Acre



Notas: pp: parênquima paliçádico; ep: epiderme; is: espaço intercelular; lp: parênquima lacunoso. Barras: a, b, c, d, e, f: 0,2 mm; seta branca - feixe vascular; seta preta - estômatos.

#### 4. DISCUSSÃO

Diversos trabalhos têm discutido o impacto da qualidade da luz (ALVARENGA et al., 2015; ARENA et al., 2016; BATISTA et al., 2016) e da formulação nutritiva do meio de cultura (GOLLE et al., 2012) sobre o desenvolvimento *in vitro*. O presente trabalho mostrou que tanto as irradiâncias como as fontes nutritivas utilizadas evidenciaram diferentes respostas para as duas variedades de *Dioscorea alata* estudadas.

A formulação nutritiva do meio MS, apesar de ser amplamente utilizada para a cultura do inhame (DAS et al., 2013) apresentou neste trabalho resultados inferiores ao encontrado nas plantas cultivadas em meio WPM. A maior adaptação dos explantes ao meio WPM demonstrou a preferência da espécie pelo cultivo em meios nutritivos com concentração reduzida de sais em comparação ao meio MS. Uma razão provável para esse resultado é a redução de 55% da força iônica do meio WPM, além de ter fonte distinta de potássio e por apresentar maior concentração de cálcio (Quadro 1).

Reed et al. (2013) afirmam que um meio bem balanceado é importante para prevenir o crescimento atrofiado e distúrbios fisiológicos. Ramage e Williams (2002) retratam a importância do equilíbrio entre as formas de nitrogênio utilizadas na cultura de tecidos ( $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4^+$ ) tanto quanto a quantidade total de nitrogênio no meio de cultura. O nitrato é a principal forma de N para a maioria das culturas de tecidos vegetais, e em tabaco, esse íon controla a expressão de genes envolvidos no metabolismo do carbono (VINCENTZ et al., 1993). Wada et al. (2015) identificaram que espécies de *Pyrus* exigem diferentes proporções da forma aniônica e catiônica de nitrogênio no meio de cultura. A concentração ideal de N e a taxa de nitrato: amônio ( $\text{NO}_3^- : \text{NH}_4^+$ ) no meio de cultura dependem do tipo de tecido, genótipo e das condições de incubação (BARONE 2019).

Analisando o comportamento de plantas *in vitro*, pré-aclimatizadas e aclimatizadas de inhame sugere-se que a exposição durante a fase *in vitro* e pré-aclimatização à condição de luz com comprimentos de onda selecionados, não foi eficaz na promoção do crescimento e desenvolvimento. A atividade dos fotorreceptores é dependente da qualidade da radiação exposta. A morfogênese nas plantas é desencadeada através da ativação dos fitocromos quando expostos à luz vermelho e vermelho distante (JONES, 2014; DEMOTES-MAINARD et al., 2016). Neste trabalho, a exposição de plantas à luz com maior amplitude de absorção, lâmpada fluorescente, favoreceu o crescimento e desenvolvimento, porém a conversão em biomassa pode ser notada apenas para a variedade “White”.

Embora o conteúdo de clorofila não tenha apresentado efeito significativo para a formulação nutritiva durante o cultivo *in vitro*, através do teor de carotenoides fica a evidência da funcionalidade desses pigmentos durante a fotossíntese, e, no crescimento e desenvolvimento das plantas, que tiveram maior altura da parte aérea e maior conteúdo de carotenoides quando a formulação nutritiva era do MS. Durante a fase de pré-aclimatização o teor de pigmentos não apresentou diferença significativa, podendo indicar que o espectro de luz emitido pelas fontes utilizadas neste estudo pode ter promovido estímulo suficiente para a biossíntese e atividade dos pigmentos fotossintéticos, conforme relatado por Lin et al., (2013). Na fase de aclimatização, o comportamento do teor de clorofilas e carotenoides foi semelhante à altura da brotação para a variedade “Purpureae”, com evidência para as lâmpadas Módulo e Fluorescente que apresentaram maiores teores. Ainda, as plantas aclimatizadas oriundas do ambiente *in vitro* com luz Fluorescente apresentaram maior eficiência na absorção da luz, visto que obtiveram maior taxa fotossintética para ambas as variedades, mesmo a “White” não tendo apresentado diferença significativa no teor de clorofilas. A biossíntese de pigmentos fotossintéticos pode ser influenciada pelo espectro luminoso (WANG et al., 2009). A absorção de luz pelas folhas representa absorção de pigmentos fotossintéticos e não fotossintéticos, e, nem toda energia absorvida será entregue nos centros de reação dos fotossistemas, devido a desvios no espectro de absorção foliar, causando redução no rendimento da fotossíntese (OUZOUNIS et al., 2015).

A eficiência das clorofilas e carotenoides na captura e transferência de elétrons pode ter sido reduzida no tratamento Módulo, uma vez que a taxa fotossintética foi a mais baixa entre os demais, somente para a variedade “Purpureae”. A fotossíntese foi estimulada pelo amplo espectro de absorção das lâmpadas fluorescentes, em ambas as variedades. Podendo ser justificada pela maior abertura estomática, que permitiu a aquisição mais eficiente e melhor disponibilidade de CO<sub>2</sub> no mesófilo, e pela eficiência de carboxilação observada em plantas aclimatizadas oriundas desta fonte de luz.

A morfogênese das folhas de inhame foi responsiva à luz Fluorescente, onde evidenciou-se aumento de espessura no limbo foliar, nos parênquimas paliçádico e lacunoso, e nas epidermes abaxial e adaxial de plantas propagadas *in vitro*. Quando analisada a lâmina foliar de plantas aclimatizadas, observa-se que a morfogênese foi responsiva para as lâmpadas Fluorescente e Módulo apenas para a espessura do parênquima paliçádico, na variedade “Purpureae”. Nas plantas aclimatizadas da variedade “White” houve destaque para espessura do parênquima paliçádico, lacunoso e do limbo foliar, para as mesmas fontes de luz. Lâmpadas fluorescentes têm como característica a ampla variação dos comprimentos de onda (350-750

nm), apresentando irradiâncias ativas em faixas de espectros de menor importância para a fotossíntese e com energia insuficiente para o desenvolvimento das plantas (GUPTA; JATOTHU, 2013). Em contrapartida, lâmpadas com espectros mais específicos, como é o caso do Módulo, disponibilizam comprimentos de onda fotossinteticamente importantes para as plantas (GUPTA; JATOTHU, 2013; ALVARENGA et al., 2015). Diante dessas características, é mais evidente que plantas expostas ao Módulo apresentem melhor diferenciação dos tecidos e taxas de desenvolvimento maiores. Porém, os resultados apresentados pelas variedades em estudo sugerem que as respostas das espécies vegetais são distintas à qualidade da luz.

Pode existir correlação entre as diferentes respostas vegetais e a demanda específica das espécies pela quantidade de cada comprimento de onda (SILVA et al, 2016). Modificações importantes na anatomia foliar foram observadas a partir de pequenas alterações na proporção de lâmpadas azuis e vermelhas (KIM et al., 2004; LI et al., 2013), como por exemplo a presença de parênquima paliádico mais delgado em plantas cultivadas em altos níveis de luz vermelha e baixos níveis de luz azul (SAEBO et al., 1995), assim como em lâmpadas com baixo espectro (BARREIRO et al., 1992).

## 5 CONCLUSÕES

A exposição de plantas de inhame durante as fases *in vitro* e de pré-aclimatização à luz Fluorescente favorece a morfogênese e a fotossíntese líquida em inhame;

O meio de cultura WPM é mais eficaz que o MS na promoção do acúmulo de biomassa e de teores de pigmentos fotossintéticos de plantas aclimatizadas de inhame;

Plantas de inhame aclimatizadas apresentam parênquima clorofiliano mais organizado, com menores espaços intercelulares, feixes vasculares de menor calibre e estômatos aparentemente mais funcionais.

## REFERÊNCIAS

- ALVARENGA, I. C. A.; PACHECO, F. V.; SILVA, S. T.; BERTOLUCCI, S. K. V.; PINTO, J. E. B. P. In vitro culture of *Achillea millefolium* L.: quality and intensity of light on growth and production of volatiles. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 122, n. 2, p. 299-308, 2015.
- ARENA, C.; TSONEV, T.; DONEVA, D. V.; DE MICCO, M.; MICHELOZZI, C.; BRUNETTI, M.; CENTRITTO, S.; FINESCHI, V.; VELIKOVA, F. The effect of light quality on growth, photosynthesis, leaf anatomy and volatile isoprenoids of a monoterpene-emitting herbaceous species (*Solanum lycopersicum* L.) and an isoprene-emitting tree (*Platanus orientalis* L.) **Environ Exp Bot**, v. 16, p. 84-72, 2016.
- BARONE, J. O. Use of multiple regression analysis and artificial neural networks to model the effect of nitrogen in the organogenesis of *Pinus taeda* L. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 137, n. 3, p. 455-464, 2019.
- BARREIRO, J. J. J.; GTIAMET, J. B.; MONTAIDI, E. R. Regulation of the photosynthetic capacity of primary bean leaves by the red: far-red ratio and photosynthetic photon flux density of incident light. **Physiol Plantarum**, v. 85, p. 97-101, 1992.
- BARTLETT, M. S. Properties os sufficiency and statistical tests. **Proceedings of the Royal Society of London**, London, v. 160, p. 268-282, 1937.
- BATISTA, D. S.; CASTRO, K. M.; SILVA, A. R.; TEIXEIRA, M. L.; SALES, T. A.; SOARES, L. I.; CARDOSO, M. G.; SANTOS, M. O.; VICCINI, L. F.; OTONI, W. C. Light quality affects *in vitro* growth and essential oil profile in *Lippia alba* (Verbenaceae). **In vitro Cell Dev Biol Plant**, v. 52, p. 276-282, 2016.
- BELLO-BELLO, J. J.; MARTÍNEZ-ESTRADA, E.; CAAMAL-VELÁZQUEZ, J. H.; MORALES-RAMOS, V. Effect of LED light quality on *in vitro* shoot proliferation and growth of vanilla (*Vanilla planifolia* Andrews). **Afr J Biotechnol**, v. 15, p. 272-277, 2017.
- BORGES, M.; CEIRO, W.; MENESES, S.; AGUILERA, N.; VÁZQUEZ, J.; INFANTE, Z.; FONSECA, M. Regeneration and multiplication of *Dioscorea alata* germplasm maintained *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 76, n. 1, p. 87-90, 2004.
- BRIGGS, W. R.; OLNEY, M. A. Photoreceptors in plant photomorphogenesis to date: five phytochromes, two cryptochromes, one phototropin, and one superchrome. **Plant Physiol**, v. 125, p. 85-88, 2001.
- CHRISTIE, J. M. Phototropin blue-light receptors. **Annual Review Plant Biology**, v. 58, p. 21-45, 2007.
- DAS, S., CHOUDHURY, M. D.; MAZUMDER, P. B. *In vitro* propagation of genus *Dioscorea*—a critical review. **Asian J Pharm Clin Res**, v. 6, n. 3, p. 26-30, 2013.

DEMOTES-MAINARD, S.; PÉRON, T.; COROT, A.; BERTHELOOT, J.; LE GOURRIEREC, J.; PELLESCI-TRAVIE, S.; CRESPEL, L.; MOREL, P.; HUCHÉ-THÉLIER, L.; BOUMAZA, R.; VIAN, A.; GUÉRIN, V.; LEDUC, N.; SAKR, S.; Plant responses to red and far-red lights, applications in horticulture. **Env. Exp. Bot**, v. 121, p. 4-21, 2016.

GOLLE, D. P.; REINIGER, L. R. S.; CURTI, A. R.; BENÍTEZ LEÓN, E. A. Estabelecimento e desenvolvimento *in vitro* de *Eugenia involucrata* DC.: influência do tipo de explante e do meio nutritivo. **Ciência Florestal**, v. 22, n. 1, p. 207-214, 2012.

GRUBBS, F. E. Procedures for detecting outlying observations in samples. **Technometrics**, v. 11, n. 1, p 1-21, 1969.

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

HENNIG, L.; POPPE, C.; SWEERE, U.; MARTIN, A.; SCHÄFER, E. Negative interference of endogenous phytochrome B with phytochrome A function in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v. 125, n. 2, p. 1036-1044, 2001.

JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. New York: Mc Graw Hill Book, 1940. 523 p.

JONES, H. G. **Plants and microclimate, a quantitative approach to environmental plant physiology**. Third Edition, Cambridge University Press, UK, 2014.

KAMI, C.; LORRAIN, S.; HORNITSCHKEK, P.; FANKHAUSER, C. Chapter two -Light-regulated plant growth and development. **Current Topics in Developmental Biology**, v. 91, p. 29-66, 2010.

KIM, S. J.; HAHN, E. J.; HEO, J. W.; PAEK, K. Y. Effects of LEDs on net photosynthetic rate, growth and leaf stomata of *Chrysanthemum* plantlets *in vitro*. **Sci Hort** 101:143–151, 2004.

KOPSELL, D. A.; SAMS, C. E. Increases in Shoot Tissue Pigments, Glucosinolates, and Mineral Elements in Sprouting Broccoli after Exposure to Short-duration Blue Light from Light Emitting Diodes. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 138, n. 1, p. 31–37, 2013.

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

LICHTENTHALER, H. K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. **Methods in Enzymology**, v. 148, p. 350-382, 1987.

LIN, K.H.; HUANG, M.Y.; HUANG, W.D.; HSU, M.H.; YANG, Z.W.; YANG, C.M. The effects of red, blue, and white light-emitting diodes on the growth, development, and edible quality of hydroponically grown lettuce (*Lactuca sativa* L. var. capitata). **Scientia Horticulturae**, v. 150, p. 86-91, 2013.

LLOYD, G. B.; MCCOWN, B. H. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel (*Kalmia latifolia*) by use shoottip culture. **Proceedings of the International Plant Propagator's Society**, v. 30, p. 421-437, 1980.

LU, X. D.; ZHOU, C. M.; XU, P. B.; LUO, Q.; LIAN, H. L.; YANG, H. Q. Red-light-dependent interaction of phyB with SPA1 promotes COP1-SPA1 dissociation and photomorphogenic development in *Arabidopsis*. **Molecular Plant**, v. 8, n. 3, p. 467-478, 2015.

MOSHE, R.; DALIA, E. On the effect of light on shoot regeneration in petunia. **Plant Cell, Tissue Organ Cult**, v. 89, p. 49-54, 2007.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Plant Physiology**, v. 15, n. 3, p. 473-97, 1962.

NHUT, D. T.; NAM, N. B. Light-emitting diodes (LEDs): An artificial lighting source for biological studies. **Proceedings of the 3rd International Conference on the Development of BME**, p. 133- 138, 2010.

OUZOUNIS, T.; ROSENQVIST, E.; OTTOSEN, C. Spectral effects of artificial light on plant physiology and secondary metabolism: a review. **HortScience**, v. 50, n. 8, p. 1128-1135, 2015.

PEDMALE, U. V.; HUANG, S. S. C.; ZANDER, M.; COLE, B. J.; HETZEL, J.; LJUNG, K.; REIS, P. A. B.; SRIDEVE, P.; NITO, K.; NERY, J. R.; ECKER, J. R.; CHORY, J. Cryptochromes interact directly with PIFs to control plant growth in limiting blue light. **Cell**, v. 164, n. 1, p. 233-245, 2016.

RAMAGE, C. M.; WILLIAMS, R. R. Inorganic nitrogen requirements during shoot organogenesis in tobacco leaf discs. **Journal of experimental botany**, v. 53, n. 373, p. 1437-1443, 2002.

REED, B. M.; WADA, S.; DENOMA, J.; NIEDZ, R. P. Mineral nutrition influences physiological responses of pear *in vitro*. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 49, n. 6, p. 699-709, 2013.

SAEBO, A.; KREKLING, T.; APPELGREN, M. Light quality affects photosynthesis and leaf anatomy of birch plantlets *in vitro*. **Plant Cell Tissue Organ Cult**, v. 41, p. 177-185, 1995.

SÁEZ, P. L.; BRAVO, L. A.; LATSAGUE, M. I.; TONEATTI, M. J.; SÁNCHEZ-OLATE, M.; RÍOS, D. G. Light energy management in micropropagated plants of *Castanea sativa*, effects of photoinhibition. **Plant Sci**, v. 20, p. 12-24, 2013.

SHAPIRO, S. S.; WILK, M. B. An analysis of variance test for normality (complete samples). **Biometrika**, v. 52, n. 3/4, p. 591-611, 1965.

SILVA, M. M. A.; OLIVEIRA, A. L. B.; OLIVEIRA-FILHO, R. A.; CAMARA, T.; WILLADINO, L.; GOUVEIA-NETO, A. The effect of spectral light quality on *in vitro* culture of sugarcane. **Acta Scient**, v. 38, p. 157-161, 2016.

SKIN, H. S.; MURTHY, H. N.; HEO, J. W.; HAHN, E. J.; PAEK, K.Y. The effect of light quality on the growth and development of *in vitro* cultured *Doritaenopsis* plant. **Acta Physiologia & Plantarum**, v. 30, p. 339-343, 2008.

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

SZOPA, A.; EKIERT, H. The importance of applied light quality on the production of lignans and phenolic acids in *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. cultures *in vitro*. **Plant Cell Tiss Organ Cult**, v. 127, p. 115-121, 2016.

TUKEY, J. W. Comparing individual means in the analysis of variance. **International Biometric Society**, v. 5, n. 2, p. 99-114, 1949.

US-CAMAS, R.; RIVERA-SOLÍS, G.; DUARTE-AKÉ, F.; DE-LA-PEÑA, C. *In vitro* culture: an epigenetic challenge for plants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 118, n. 2, p. 187-201, 2014.

VINCENTZ, M.; MOUREAUX, T.; LEYDECKER, M. T.; VAUCHERET, H.; CABOCHE, M. Regulation of nitrate and nitrite reductase expression in *Nicotiana plumbaginifolia* leaves by nitrogen and carbon metabolites. **The Plant Journal**, v. 3, n. 2, p. 315-324, 1993.

WADA, S.; NIEDZ, R. P.; REED, B. M. Determining nitrate and ammonium requirements for optimal *in vitro* response of diverse pear species. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 51, n. 1, p. 19-27, 2015.

WANG, H.; GU, M.; CUI, J.; SHI, K.; ZHOU, Y.; YU, J. Effects of light quality on CO<sub>2</sub> assimilation, chlorophyll-fluorescence quenching, expression of Calvin cycle genes and carbohydrate accumulation in *Cucumis sativus*. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 96, n. 1, p. 30-37, 2009.

YANG, D.; SEATON, D. D.; KRAHMER, J.; HALLIDAY, K. J. Photoreceptor effects on plant biomass, resource allocation, and metabolic state. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 27, p. 7667-7672, 2016.

## **Capítulo 2**

**Sacarose, Manitol e Sorbitol na conservação *in vitro* de *Dioscorea alata* L.**

## RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo analisar a influência de tipos e concentrações de agentes osmóticos, no crescimento e desenvolvimento, durante a conservação *in vitro*, recrescimento e aclimatização de inhame. Para tanto, utilizou-se como material vegetal, explantes oriundos de plantas de inhame (*Dioscorea alata* var. *purpureae* e *Dioscorea alata* var. *white*) cultivadas *in vitro*, com aproximadamente um centímetro de comprimento, contendo uma gema axilar. O meio de cultura utilizado foi o MS, acrescido de 2,2 g.L<sup>-1</sup> de Phytigel<sup>TM</sup> e 2,0 g.L<sup>-1</sup> de carvão ativado, com pH ajustado para 5,8 ± 0,1. O trabalho foi disposto em delineamento inteiramente casualizado, com arranjo fatorial 3 x 4 + 1, com três tipos de carboidratos (sacarose, sorbitol e manitol) em quatro concentrações (50; 100; 150 e 200 mM) e um tratamento testemunha (sem adição de carboidrato), totalizando 13 tratamentos. As plantas foram mantidas em sala de cultivo *in vitro* à temperatura de 25 ± 2 °C e 16 horas de fotoperíodo fornecido por lâmpadas LED Tubular 6000/6500k: 55 µmol m<sup>2</sup> s<sup>-1</sup>. Aos 180, 270 e 360 dias de conservação, avaliou-se a porcentagem de sobrevivência, altura da brotação (ALT), número de folhas expandidas (NFE), número de folhas senescentes (NFS), e número de gemas (NG). Aos 360 dias avaliou-se os teores de carboidratos solúveis, amido, aminoácidos solúveis totais e prolina. Ainda aos 360 dias, segmentos caulinares contendo 1 cm de comprimento e uma gema axilar foram inseridos em meio basal de recrescimento e mantidos em sala de cultivo *in vitro* nas mesmas condições mencionadas acima, por 60 dias. Ao final desse período, as plantas foram pré-aclimatizadas em sala de crescimento *in vitro* e aclimatizadas em casa de vegetação. Tanto ao final do período de recrescimento, como de aclimatização, foram avaliadas a ALT, NFE e NG. A sacarose e o sorbitol favoreceram maiores porcentagens de sobrevivência de plantas da variedade “White” ao longo da conservação *in vitro*. Para a variedade “Purpureae”, 100% de sobrevivência ao final do período de crescimento lento foi evidenciada no tratamento contendo 50 mM de sorbitol. A análise das duas primeiras variáveis canônicas permitiu agrupar os tratamentos em cinco e quatro grupos, para as variedades “White” e “Purpureae”, representando 92,27 e 90,84% da variação total das características avaliadas, respectivamente. As características que mais contribuíram para a diversidade entre os tratamentos da variedade “White” foram altura da brotação aos 360 (24,71%) e 180 (16,29%) dias, e número de folhas expandidas aos 360 dias (13,75%). Para a variedade “Purpureae” as características que tiveram maior contribuição relativa foram altura da brotação aos 270 (42,37%) e 360 (19,07%) dias, e número de gemas aos 360 dias (15,19%). Nas variáveis bioquímicas, a variedade “White” formou três grupos de tratamentos, as duas principais variáveis canônicas explicaram 98,29% da variação total e as características que mais contribuíram para a diversidade dos tratamentos foram o teor de amido e de açúcares solúveis totais, com 79,08 e 14,23%, respectivamente. A variedade “Purpureae” formou quatro grupos de tratamentos, as duas primeiras variáveis canônicas representaram 92,15% da variação total e os caracteres que tiveram maior contribuição relativa foram teor de açúcares solúveis totais (52,70%), amido (22,63%) e aminoácidos solúveis totais (21,41%). No recrescimento de plantas da variedade “White”, o tratamento com 150 mM de sorbitol apresentaram maiores médias de altura e número de folhas expandidas, diferindo apenas dos tratamentos que continham sacarose 100 e 150 mM. Nesta fase, para a variedade “Purpureae”, maior altura da brotação foi evidenciada com 50 mM de sacarose e menor com 50 mM de manitol; maior número de folhas expandidas com o tratamento sem a adição de carboidrato e menor com 50 mM de sorbitol; e o número de gemas foi superior no tratamento com 200 mM de sorbitol e menores médias foram observadas nos tratamentos com 50 mM de sorbitol e manitol. Plantas aclimatizadas da variedade “White” não

apresentaram diferença estatística para as variáveis analisadas. Já as plantas aclimatizadas da variedade “Purpureae” apresentaram efeito significativo para altura da brotação, e o tratamento contendo 50 mM de sorbitol foi o que apresentou a maior média. Indica-se, portanto, os carboidratos sacarose e sorbitol 50 mM para a conservação *in vitro* de *Dioscorea alata*.

Palavras-chave: inhame; osmoreguladores; crescimento lento.

## 1 INTRODUÇÃO

A redução do metabolismo celular de plantas, em condições de laboratório, com base nas técnicas de cultura de tecidos vegetais, favorece a conservação das mesmas em bancos de germoplasma *in vitro* (CARVALHO et al., 2011). Os sistemas de crescimento lento caracterizam-se pelo retardamento do desenvolvimento da planta, tornando os intervalos entre os subcultivos mais longos, sem a perda da viabilidade (WHITERS; WILLIAMS, 1998).

A adição de carboidratos ao meio de cultura afeta significativamente o crescimento e desenvolvimento das plantas *in vitro*, uma vez que atuam como fonte de carbono e energia além de regular a disponibilidade de água do meio de cultura (FLORES et al., 2013). Quando adicionados à formulação nutritiva, osmorreguladores como sacarose, sorbitol e manitol, regulam o conteúdo de água intracelular, por gradiente osmótico, fazendo com que o crescimento dos explantes ocorra de maneira mais lenta (DUMET et al., 1993; SHIBLI et al., 2006; MARINO et al., 2010; SILVA; SCHERWINSKY-PEREIRA, 2011).

A sacarose é um açúcar não redutor utilizado no cultivo de plantas *in vitro* como fonte de energia, esqueleto de carbono e osmorregulador. Modificações nas concentrações desse composto nos meios de cultura podem promover alterações no metabolismo das plantas, e esse fato tem sido abordado nos estudos de crescimento lento *in vitro* (ANKITA; ANIMESH, 2013).

Os açúcares alcoólicos, manitol e o sorbitol, geralmente não são metabolizados por tecidos vegetais, uma vez que, grande parte das espécies não possuem via natural para a biossíntese desses tipos de carboidratos, por esse fato são utilizados como reguladores do potencial hídrico no meio de cultura, durante a conservação *in vitro* (GEORGE, 1993; ARRIGONIBLANK et al., 2014). A adição de agentes osmóticos ao meio nutritivo ainda, protege as membranas celulares a baixas temperaturas e reduz a hiperhidricidade da planta (KADOTA et al., 2001; FARIA et al., 2006; VASCONCELOS et al., 2012). Borges et al., (2004) utilizaram manitol na conservação *in vitro* de *Dioscorea alata* e verificaram altas taxas de regeneração dos explantes quando utilizado o meio de cultura D- 571, com adição de 1,5% de manitol.

Processos bioquímicos e fisiológicos, como o ajustamento osmótico e o sistema de defesa antioxidante e peroxidação lipídica, são desencadeados pelo estresse hídrico sofrido pelas células vegetais, e em resposta a esse estresse, muitas plantas sintetizam e acumulam solutos orgânicos, como proteínas, carboidratos e aminoácidos (BRAY, 1997), visando a manutenção do funcionamento do corpo vegetal.

Alguns aspectos devem ser levados em consideração no processo de conservação *in vitro*, como a capacidade de regeneração do material submetido ao processo de crescimento lento, ou seja, a viabilidade da planta após o período de conservação. Pois, muitas vezes, o método utilizado na redução do metabolismo *in vitro* pode causar danos irreversíveis à planta, dificultando ou até impedindo a recuperação das mesmas ao ambiente *ex vitro* (HASSAN; BEKEET, 2008; GOPAL; CHAUHAN, 2010; OREGO et al., 2012). Diante disso, a manutenção da viabilidade das plantas no ambiente *ex vitro* é o principal objetivo em trabalhos de crescimento mínimo *in vitro*, visando a manutenção de bancos de germoplasma.

O objetivo do presente trabalho foi realizar a conservação *in vitro* de duas variedades de inhame através da técnica de crescimento lento e identificar, durante o período de conservação, de recrescimento e aclimatização, através de análises de crescimento e bioquímicas, a melhor condição para manutenção dessas variedades *in vitro*.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Biotecnologia e Anatomia Vegetal e na Unidade Experimental da Universidade Federal do Acre, Rio Branco, Acre. Foram utilizadas duas variedades da espécie *Dioscorea alata* (*D. alata* var. *branca* e *D. alata* var. *purpureae*).

### 2.1 CONDIÇÕES DO CRESCIMENTO LENTO *IN VITRO*

Segmentos caulinares de 1 cm de comprimento, contendo uma gema axilar, foram utilizados como explante. Estes foram retirados de plantas de inhame pré-estabelecidas *in vitro* com 60 dias de idade, oriundas do quarto subcultivo.

Neste experimento foram avaliados o tipo e a concentração de agentes osmóticos durante a conservação de inhame, perfazendo um esquema fatorial 3 x 4 +1, em delineamento inteiramente casualizado. Para tanto utilizou-se sacarose, manitol e sorbitol nas concentrações de 50, 100, 150 e 200 mM, com uma testemunha adicional sem adição de nenhum tipo de agente osmótico. Ao meio de cultura MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) foi adicionado 2 g L<sup>-1</sup> de carvão ativado, pH ajustado para 5,8 ± 0,2 e solidificado com 2,2 g L<sup>-1</sup> de Phytigel<sup>TM</sup>. A esterilização foi feita em autoclave de calor úmido a 121 °C e 1,3 atm por 20 minutos. As culturas foram mantidas em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio, em sala de crescimento *in vitro*, com fotoperíodo de 16 horas de luz fornecido por lâmpadas LED com 55 μmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> de PFFD à temperatura de 25 ± 2 °C.

Esta etapa foi realizada em delineamento inteiramente casualizado e foram utilizadas 25 unidades experimentais, correspondentes a um tubo de ensaio com um explante.

Aos 180 e 270 dias de conservação, avaliou-se altura da planta, número de folhas expandidas e senescentes e número de gemas. Aos 360 dias, além das variáveis citadas anteriormente, coletou-se material foliar para posteriores análises bioquímicas, bem como, plantas dos tratamentos que obtiveram sobrevivência igual ou superior a 50%, tiveram explantes de 1 cm contendo uma gema axilar retirados da região mediana e foram reintroduzidos em meio de cultura para regeneração.

O material vegetal coletado para análises bioquímicas foi congelado em nitrogênio líquido (-196°C), liofilizado e armazenado até o momento do uso.

### 2.2 CONDIÇÕES DE RECRESAMENTO

A capacidade de regeneração dos explantes foi avaliada ao final do período de conservação (360 dias). Para isso, foram utilizados segmentos caulinares de plantas submetidas à condição de crescimento lento que obtiveram sobrevivência igual ou superior a 50%. Explantes com 1 cm de comprimento e uma gema axilar, foram retirados da região mediana dessas plantas e introduzidos em meio MS, acrescido de 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, 2,0 g.L<sup>-1</sup> de carvão ativado, pH ajustado para 5,8 ± 0,2 e solidificado com 2,2 g.L<sup>-1</sup> de Phytigel™. A esterilização foi feita em autoclave de calor úmido a 121 °C e 1,3 atm por 20 minutos. As culturas foram mantidas em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio, em sala de crescimento *in vitro*, com fotoperíodo de 16 horas de luz à temperatura de 25 ± 2 °C. Aos 60 dias sob estas condições, avaliou-se a sobrevivência, altura da planta, número de folhas expandidas e número de gemas.

Esta etapa foi conduzida em delineamento inteiramente casualizado, com dez repetições por tratamento.

### 2.3 RUSTIFICAÇÃO E ACLIMATIZAÇÃO *EX VITRO*

Após o período de regeneração, plantas foram aclimatizadas *ex vitro* e avaliadas quanto ao crescimento e sobrevivência. Inicialmente, as plantas passaram por uma etapa de rustificação em sistema de câmara úmida visando reduzir perdas. Para tanto, foram retiradas dos frascos de cultivo, submetidas à lavagem das raízes e inseridas individualmente em copo descartável de 200 mL, preenchido com substrato comercial SUBRAS® previamente umidificado com 50 mL de água. Após o plantio, simulando condições de câmara úmida, os copos de 200 mL foram cobertos com copos descartáveis de 300 mL e as plantas mantidas em sala de crescimento no laboratório, por 20 dias.

Ao término dessa etapa, retirou-se o sistema de câmara úmida e as plantas foram mantidas por 90 dias em estufa tipo túnel com sombreamento de 70%, para aclimatização. Aos 110 dias de cultivo *ex vitro*, as plantas foram avaliadas quanto o crescimento e sobrevivência. Foi avaliado o número de folhas expandidas e senescentes, e altura da parte aérea.

Esta etapa foi conduzida em delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições por tratamento.

### 2.4 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

A extração aquosa foi realizada a partir do material liofilizado. Para tanto, 10 mg do material foi pesado e transferido para tubos de ensaio rosqueáveis onde foram adicionados 5

mL de água desionizada. Os tubos foram colocados em banho-maria a 100 °C, por 1 hora. Após descanso da solução, retirou-se o sobrenadante para a determinação de carboidratos solúveis totais, aminoácidos solúveis totais e prolina livre, e o *pellet* foi utilizado para extração e determinação de amido. Foram realizadas 5 repetições para cada análise.

#### **2.4.1 Determinação de prolina livre**

A determinação de prolina livre foi realizada conforme metodologia de Bates (1973). Em tubos de ensaio com tampas rosqueáveis, foi adicionado 1 mL do extrato aquoso, 1 mL de ninhidrina ácida e 1 mL de ácido acético glacial. Em seguida os tubos foram colocados em banho-maria, a 100 °C por 1 hora. Imediatamente após esse tempo, a reação foi interrompida através do resfriamento dos tubos em banho de gelo. Quando em temperatura ambiente, adicionou-se 2 mL de tolueno e os tubos foram agitados vigorosamente. Duas fases foram formadas, e coletou-se o sobrenadante para análise em espectrofotômetro à 520 nm. A concentração de prolina livre, tendo como referência a equação obtida na curva-padrão de prolina (1 mM), foi expressa em mmol prolina kg<sup>-1</sup> MS.

#### **2.4.2 Determinação de aminoácidos solúveis**

A determinação de aminoácidos solúveis totais foi realizada pelo método descrito por Yemm e Cocking (1955). Em tubos de ensaio rosqueáveis foi adicionado 0,25 mL de tampão citrato 200 mM e 0,5 mL do extrato aquoso. Em seguida, acrescentou-se 0,6 mL do reagente revelador (ninhidrina 5% + KCN 0,2 mM). Os tubos foram postos em banho-maria à 100 °C por 15 minutos, e tiveram a reação interrompida com o resfriamento dos tubos em banho de gelo, por cerca de 5 minutos. Quando os tubos atingiram temperatura ambiente, adicionou-se 0,65 mL de etanol 60%. A leitura da reação foi feita em espectrofotômetro à 570 nm. A concentração de aminoácidos solúveis totais, tendo como referência a equação obtida na curva-padrão de glicina (10 mM), foi expressa em mmol de aminoácidos kg<sup>-1</sup> MS.

#### **2.4.3 Determinação de carboidratos**

Os carboidratos solúveis foram determinados pelo método fenol-sulfúrico (DUBOIS et al., 1956). Para a quantificação dos açúcares solúveis foi utilizado o padrão de glicose (0,8 mM). A extração do amido das folhas foi realizada a partir da hidrólise em ácido perclórico

30% por 30 minutos. O procedimento foi repetido por duas vezes, o sobrenadante foi coletado e combinado para a determinação usando o método do fenol-sulfúrico.

## 2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para as variáveis fisiológicas e de crescimento, da etapa de crescimento lento *in vitro*, utilizou-se análise de variância multivariada (MANOVA). Para análise de variabilidade foi realizado uma análise de variáveis canônicas utilizando como medida de similaridade a distância generalizada de Mahalanobis (D2). Com base nessa mesma distância foi realizado a contribuição relativa dos caracteres pelo método de Singh (1981). Para estas determinações, foi utilizado o software Genes (CRUZ, 2013).

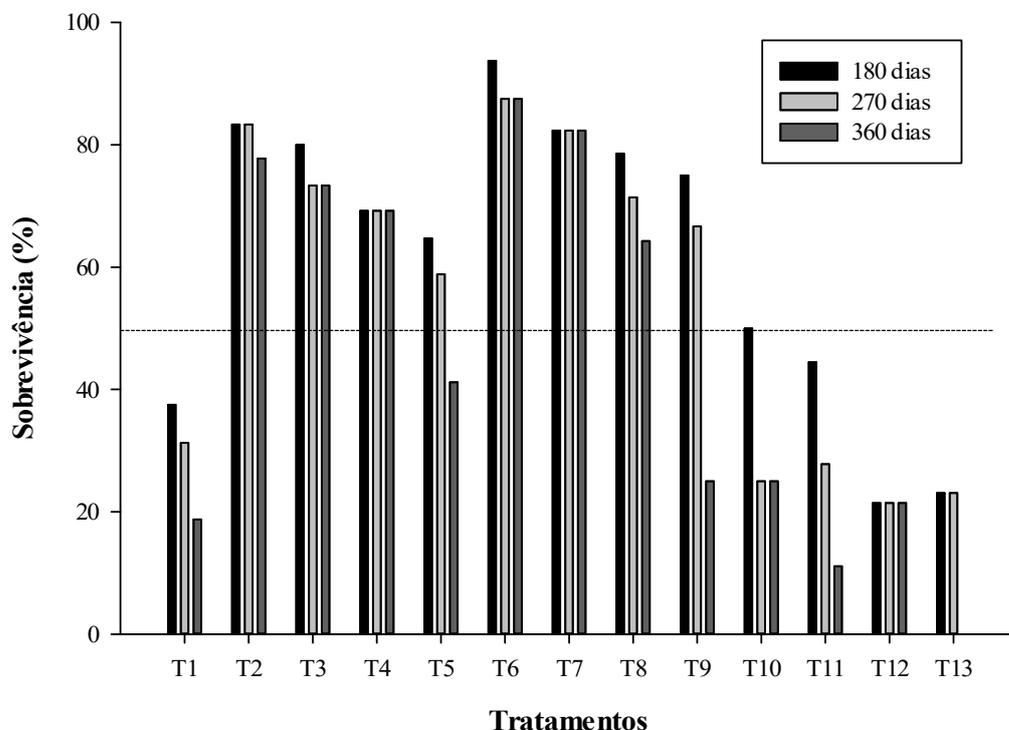
Os resultados das etapas de recrescimento e aclimatização foram submetidos ao teste de Grubbs (1969) para a verificação de dados discrepantes, pelo teste de Shapiro-Wilk (1965) para normalidade dos erros, e pelo teste de Bartlett (1937) para homogeneidade de variâncias. Na análise de variância, pelo teste F, quando verificada significância, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey (1949) ( $P \leq 0,05$ ).

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 CRESCIMENTO LENTO DE *Dioscorea alata*

A sobrevivência das plantas de inhame da variedade “White” ao longo do período de crescimento lento é demonstrada na Figura 1. Durante os primeiros 270 dias, plantas submetidas à condição de crescimento lento em meio contendo sacarose e sorbitol tiveram sobrevivência mínima de 58,8%, porém, na avaliação dos 360 dias, a concentração de 200 mM de ambos os agentes osmóticos, apresentou valores inferiores a 50% de sobrevivência. Plantas cultivadas em meio contendo manitol ou em meio sem a adição de carboidrato tiveram, ao longo do período de conservação, sobrevivência igual ou inferior à 50%. Observa-se também que à medida que a concentração de sacarose e sorbitol aumentou, a sobrevivência das plantas diminuiu ao longo da conservação.

Figura 1. Sobrevivência de plantas de *D. alata* var. *white* durante o crescimento lento *in vitro*, Rio Branco, Acre



Nota: T1 - Sem carboidrato; T2 - Sacarose 50 mM; T3 - Sacarose 100 mM; T4 - Sacarose 150 mM; T5 - Sacarose 200 mM; T6 - Sorbitol 50 mM; T7 - Sorbitol 100 mM; T8 - Sorbitol 150 mM; T9 - Sorbitol 200 mM; T10 - Manitol 50 mM; T11 - Manitol 100 mM; T12 - Manitol 150 mM; T13 - Manitol 200 mM.

Na tabela 1 temos a demonstração dos autovalores e da variância obtidas pelas variáveis canônicas, tendo as duas principais correspondido a 92,27% da variação total, (72,20 e 20,07%, respectivamente), o que permitiu realizar o agrupamento entre os tratamentos.

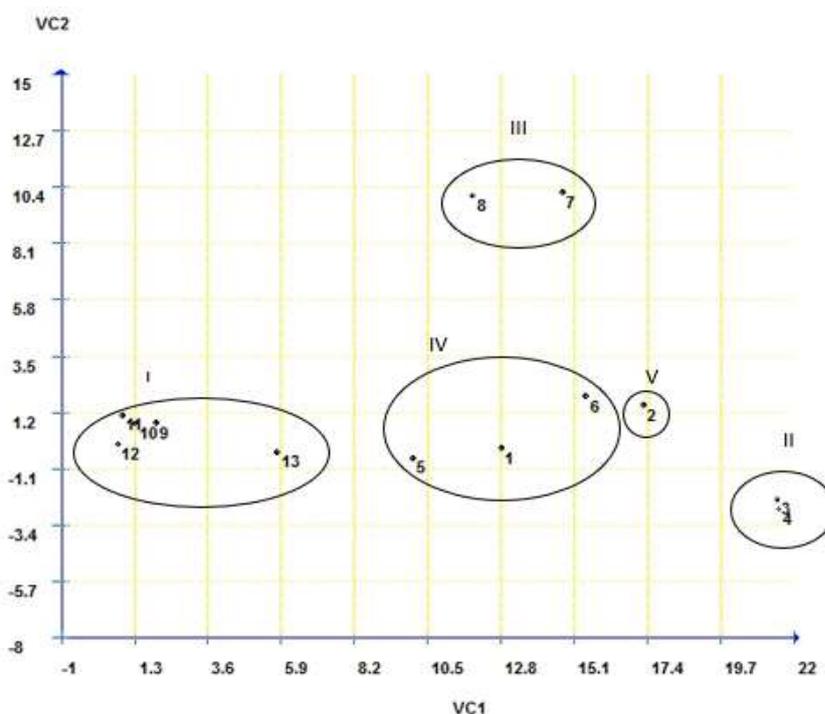
Tabela 1. Autovalores, variância e variância acumulada das variáveis canônicas obtidas das variáveis originais, nas análises de crescimento durante o período de conservação *in vitro* de *D. alata* var. *white*, Rio Branco, Acre

Variáveis canônicas	Autovalores	Variância (%)	Variância acumulada (%)
1	58,7690	72,2040	72,2040
2	16,3382	20,0733	92,2773
3	2,7370	3,3627	95,6400
4	1,0276	1,2625	96,9026
5	0,7940	0,9756	97,8782
6	0,7296	0,8965	98,7747
7	0,4744	0,5829	99,3576
8	0,2854	0,3503	99,7083
9	0,2115	0,2598	99,9682
10	0,0203	0,0250	99,9932
11	0,0052	0,0063	99,9996
12	0,0002	0,0004	100,00

A análise multivariada permitiu agrupar os treze tratamentos, aplicados no crescimento lento de *Dioscorea alata* var. *white*, em cinco grupos. O primeiro, formado por cinco tratamentos, o segundo e terceiro grupo com dois tratamentos cada, o quarto grupo com três tratamentos e o quinto com apenas um tratamento (Fig. 2). Os quais foram unidos com base nas semelhanças existentes entre as características avaliadas.

As características altura da brotação e número de folhas expandidas aos 360 dias de conservação foram as variáveis originais que apresentaram maior magnitude dos autovalores para esta variedade e a altura da brotação aos 180 dias a que teve menor parcela de contribuição para a diversidade dos tratamentos, segundo os critérios de análise das variáveis canônicas.

Figura 2. Gráfico de dispersão bidimensional dos escores dos tratamentos aplicados durante o crescimento lento *in vitro* de *D. alata* var. *white* nas duas primeiras variáveis canônicas, Rio Branco, Acre



Nota: 1 – Sacarose 50 mM; 2 – Sacarose 100 mM; 3 – Sacarose 150 mM; 4 – Sacarose 200 mM; 5 – Sorbitol 50 mM; 6 – Sorbitol 100 mM; 7 – Sorbitol 150 mM; 8 – Sorbitol 200 mM; 9 – Manitol 50 mM; 10 – Manitol 100 mM; 11 – Manitol 150 mM; 12 – Manitol 200 mM; 13 – Testemunha.

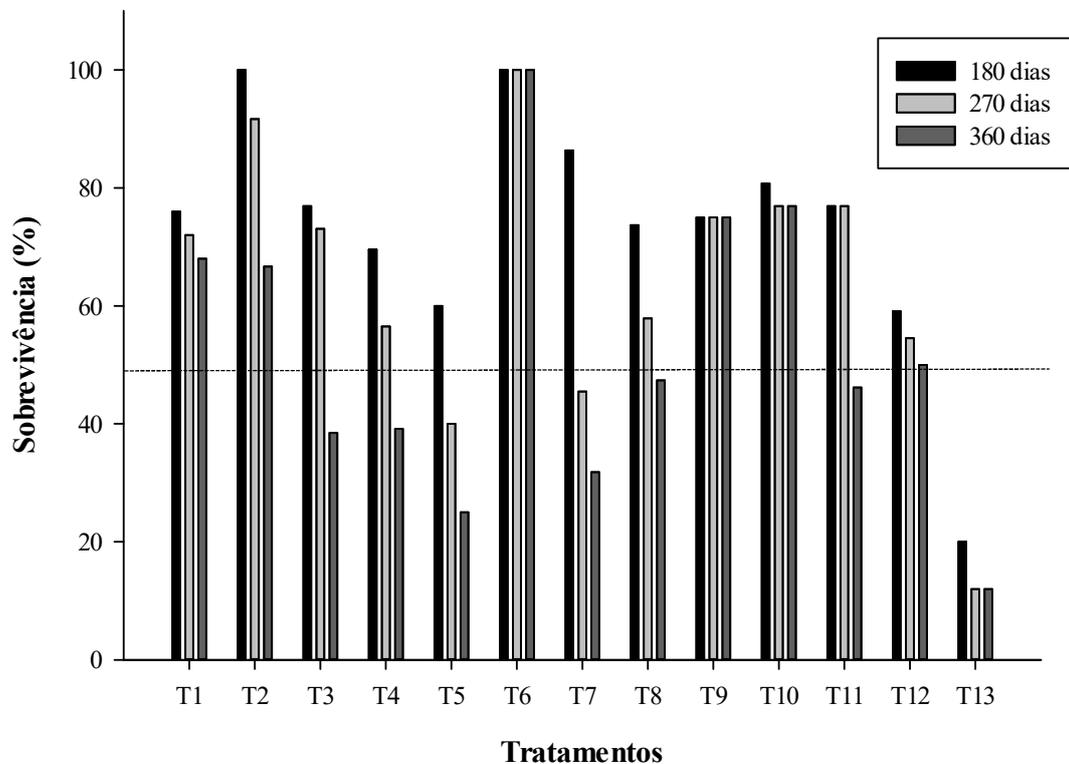
A variância entre os caracteres, estimada pelo método de Singh (1981), variou de 0.46 a 24.71, sugerindo alta variabilidade relacionada ao efeito dos agentes osmóticos e às concentrações. A característica que mais contribuiu para a diversidade entre os tratamentos foi altura da parte aérea aos 360 dias de crescimento lento (24,71%) seguida pela altura da parte aérea aos 180 dias (16,29%), número de folhas expandidas aos 360 (13,75%) e 270 (10,65%) dias (Tabela 2). Essas variáveis são fundamentais no estabelecimento de protocolos de conservação *in vitro*, uma vez que, a menor taxa de crescimento é um atributo desejável, desde que essa não seja provocada por eventos de toxicidade, por exemplo.

A sobrevivência de plantas de inhame da variedade “Purpureae” durante o período de conservação *in vitro* é apresentada na Figura 3. Plantas cultivadas em manitol 200 mM (T13) apresentaram sobrevivência máxima de 20%, durante os três períodos de avaliação. Sobrevivência de 100% ao final da conservação foi observada para o tratamento com sorbitol 50 mM. Sobrevivência aos 360 dias igual ou superior a 50% foi evidenciada nos tratamentos sem carboidrato, sacarose 50 mM, sorbitol 50 e 200 mM, e manitol 50 e 150 mM.

Tabela 2. Contribuição relativa dos caracteres para a diversidade entre os tratamentos durante o crescimento lento de *D. alata* var. *white*, Singh (1981)

VARIÁVEIS	VALOR (%)
Alt 180	16.29
NF180	0.61
NFS 180	8.08
NG180	0.60
Alt 270	9.17
NF 270	10.65
NFS 270	2.30
NG 270	0.46
Alt 360	24.71
NF 360	13.75
NFS 360	8.92
NG 360	4.46

Figura 3. Sobrevivência de plantas de *D. alata* var. *purpurae* durante o crescimento lento *in vitro*, Rio Branco, Acre



Nota: T1 - Sem carboidrato; T2 - Sacarose 50 mM; T3 - Sacarose 100 mM; T4 - Sacarose 150 mM; T5 - Sacarose 200 mM; T6 - Sorbitol 50 mM; T7 - Sorbitol 100 mM; T8 - Sorbitol 150 mM; T9 - Sorbitol 200 mM; T10 - Manitol 50 mM; T11 - Manitol 100 mM; T12 - Manitol 150 mM; T13 - Manitol 200 mM.

As duas primeiras variáveis canônicas representam 90,84% da variação total das características avaliadas (70,47 e 20,37%, respectivamente) (Tabela 3), permitindo, dessa forma, o agrupamento entre os tratamentos. Pelo uso das variáveis canônicas a característica que pode ser descartada em trabalhos futuros é o número de folhas senescentes aos 180 dias de conservação. E as características que mais contribuíram para a variabilidade entre os tratamentos foi altura da brotação aos 270 dias e número de gemas aos 360 dias de crescimento lento.

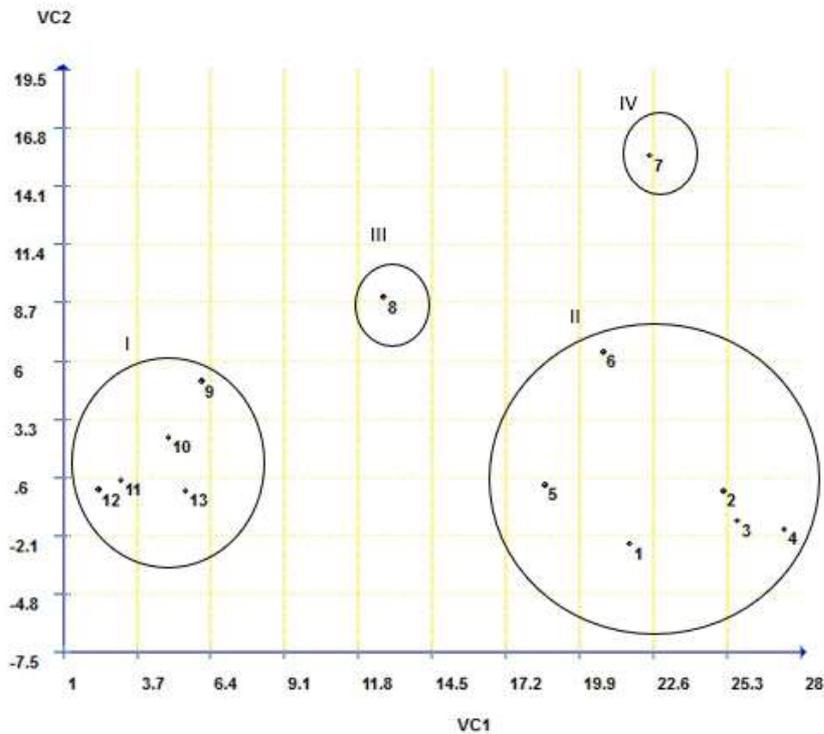
Tabela 3. Autovalores, variância e variância acumulada das variáveis canônicas obtidas das variáveis originais, nas análises de crescimento durante o período de conservação *in vitro* de *D. alata* var. *purpureae*, Rio Branco, Acre

Variáveis canônicas	Autovalores	Variância (%)	Variância acumulada (%)
1	91,7680	70,4750	70,4750
2	26,5253	20,3706	90,8457
3	6,5339	5,0178	95,8635
4	2,6575	2,0409	97,9044
5	1,5793	1,2128	99,1175
6	0,4930	0,3786	99,4959
7	0,4312	0,3311	99,8271
8	0,1504	0,1155	99,9427
9	0,0444	0,0341	99,9768
10	0,0270	0,0207	99,9975
11	0,0030	0,0023	99,9998
12	0,0001	0,0002	100,00

Para a variedade “Purpureae”, a aplicação da análise multivariada permitiu a formação de quatro grupos de tratamento durante a etapa de crescimento lento. O primeiro grupo, composto por cinco tratamentos, o segundo, por seis, e o terceiro e quarto com apenas um tratamento (Figura 4).

A contribuição relativa dos caracteres ligados ao crescimento lento de *D. alata* var. *purpureae* está representada na tabela 4. As variáveis altura da brotação aos 270 e 360 dias e o número de gemas aos 360 dias de conservação, contribuíram 42,37; 19,07 e 15,19%, respectivamente, para a variação total, enquanto os demais caracteres tiveram reduzida participação, podendo ser descartada, em futuros trabalhos com esta variedade, a variável número de folhas senescentes aos 180 dias de conservação (NFS 180).

Figura 4. Gráfico de dispersão bidimensional dos escores dos tratamentos aplicados durante o crescimento lento *in vitro* de *D. alata* var. *purpurae* nas duas primeiras variáveis canônicas, Rio Branco, Acre



Nota: 1 – Sacarose 50 mM; 2 – Sacarose 100 mM; 3 – Sacarose 150 mM; 4 – Sacarose 200 mM; 5 – Sorbitol 50 mM; 6 – Sorbitol 100 mM; 7 – Sorbitol 150 mM; 8 – Sorbitol 200 mM; 9 – Manitol 50 mM; 10 – Manitol 100 mM; 11 – Manitol 150 mM; 12 – Manitol 200 mM; 13 – Testemunha.

Tabela 4. Contribuição relativa dos caracteres para a diversidade entre os tratamentos durante o crescimento lento de *D. alata* var. *purpurae*, Singh (1981).

VARIÁVEIS	VALOR (%)
Alt 180	3.07
NF180	1.16
NFS 180	0.09
NG180	5.70
Alt 270	42.37
NF 270	1.96
NFS 270	0.70
NG 270	2.26
Alt 360	19.07
NF 360	5.33
NFS 360	3.10
NG 360	15.19

As duas principais variáveis canônicas explicaram mais de 98% da variância total acumulada contida no conjunto de características bioquímicas analisadas em plantas de inhame da variedade “White” (84,52 e 13,77%, respectivamente) (Tabela 5). Por isso, foi possível explicar os dados dos tratamentos analisados em um gráfico bidimensional (CRUZ et al., 2012). Pelo uso das variáveis canônicas, a ordem crescente de magnitude dos autovalores é teor de prolina, aminoácidos solúveis totais, açúcares solúveis totais e amido. Sendo o teor de prolina, segundo este critério, a variável passível de descarte em futuros trabalhos com esta variedade de inhame.

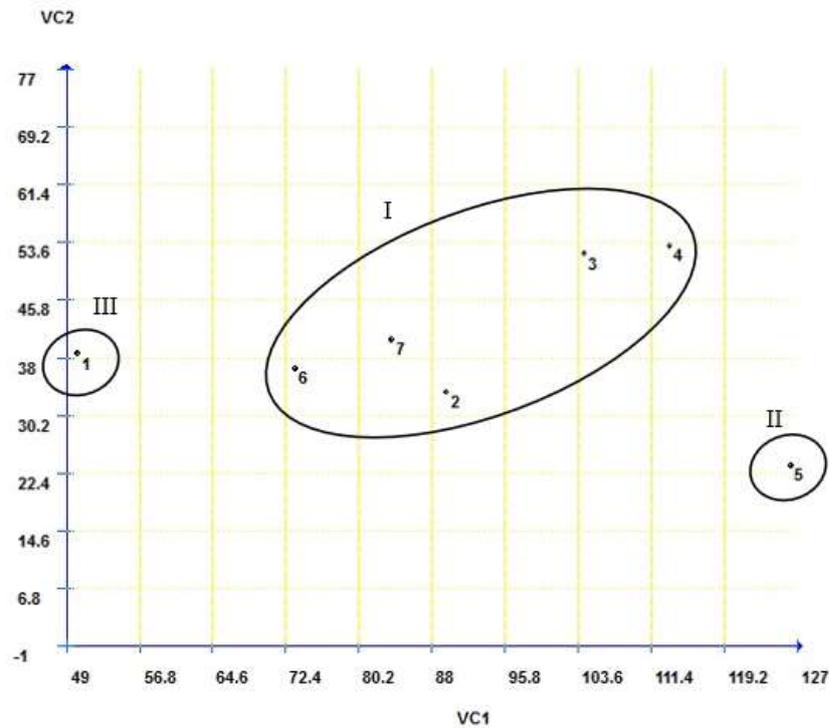
Tabela 5. Autovalores, variância e variância acumulada das variáveis canônicas obtidas das variáveis originais, nas análises bioquímicas aos 360 dias do crescimento lento *in vitro* de *D. alata* var. *white*, Rio Branco, Acre

Variáveis canônicas	Autovalores	Variância (%)	Variância acumulada (%)
1	659,74	84,52	84,52
2	107,52	13,77	98,29
3	8,38	1,08	99,37
4	4,93	0,63	100,00

A análise multivariada das variáveis bioquímicas ao fim do período de conservação de inhame da variedade “White” permitiu a formação de três grupos de tratamentos (Figura 5). O primeiro, formado por cinco tratamentos, entre eles os que continham sacarose nas concentrações 50, 100 e 150 mM, e sorbitol nas concentrações 100 e 150 mM. O segundo grupo formado pelo tratamento com sorbitol 50 mM e o terceiro grupo formado pelo controle absoluto.

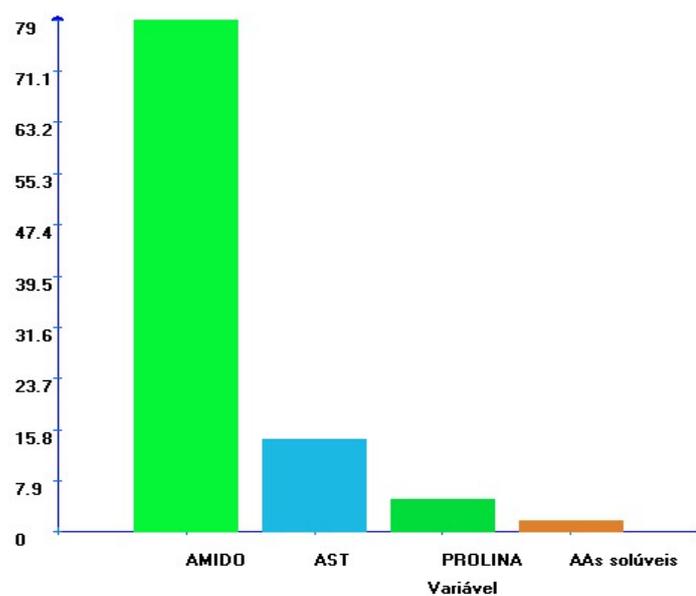
As características com maiores contribuições relativas para a avaliação da diversidade dos tratamentos no presente trabalho foram, segundo o método de Singh (1981): amido e açúcares solúveis totais (AST), com 79,08 e 14,23%, respectivamente (Figura 6). A baixa contribuição relativa do teor de aminoácidos solúveis totais (1,72%) sugere que, por este método, nos próximos trabalhos utilizando esta variedade de inhame, esta característica pode não ser utilizada.

Figura 5. Gráfico de dispersão bidimensional dos tratamentos nas análises bioquímicas aos 360 dias do crescimento lento *in vitro* de *D. alata* var. *white* nas duas primeiras variáveis canônicas, Rio Branco, Acre



Nota: 1 – controle absoluto; 2 - Sacarose 50 mM; 3 - Sacarose 100 mM; 4 - Sacarose 150 mM; 5 Sorbitol 50 mM; 6 - Sorbitol 100 mM; 7 - Sorbitol 150 mM

Figura 6. Contribuição relativa das variáveis bioquímicas para a diversidade entre os tratamentos aos 360 dias de crescimento lento de *D. alata* var. *white*, Singh (1981)



Nota: AST - açúcares solúveis totais; AAs - aminoácidos solúveis totais.

A variância acumulada das duas principais variáveis canônicas nas análises bioquímicas de plantas de inhame da variedade “Purpureae” conservadas *in vitro* foi superior a 92% (Tabela 6). A primeira explicou 66,53% e a segunda 25,62% da variação total das características analisadas. De acordo com esse método, em ordem crescente de magnitude dos autovalores, têm-se os teores de prolina, amido, aminoácidos solúveis totais e açúcares solúveis totais. Sendo, portanto, indicado o teor de prolina como possível variável a ser descartada em trabalhos posteriores.

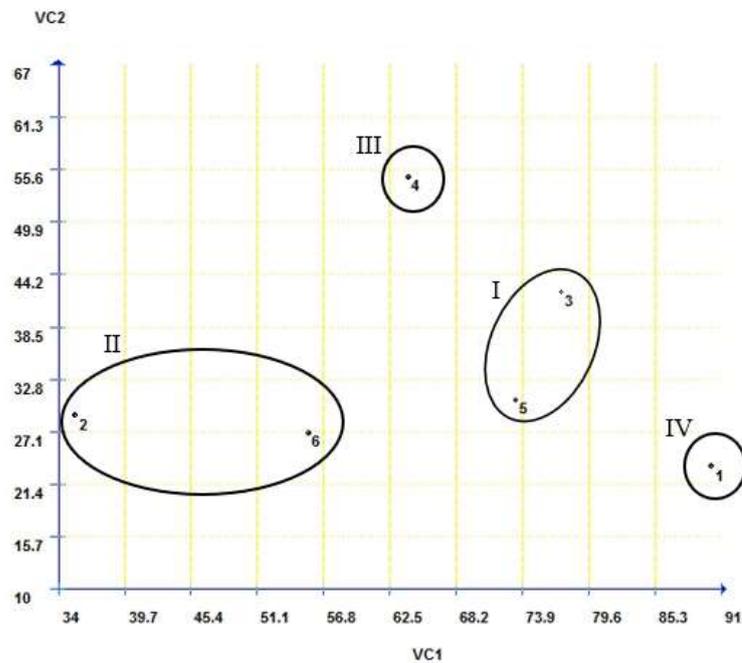
Tabela 6. Autovalores, variância e variância acumulada das variáveis canônicas obtidas das variáveis originais, nas análises bioquímicas aos 360 dias do crescimento lento *in vitro* de *D. alata* var. *purpureae*, Rio Branco, Acre

Variáveis canônicas	Autovalores	Variância (%)	Variância acumulada (%)
1	362,72	66,53	66,53
2	139,65	25,62	92,15
3	41,43	7,60	99,75
4	1,38	0,25	100,00

Para a variedade “Purpureae”, a análise multivariada baseada na distância generalizada de Mahalanobis, dividiu os tratamentos em quatro grupos (Figura 7). O primeiro grupo, formado pelos tratamentos contendo sacarose 50 mM e sorbitol 200 mM, o segundo grupo formado pelos tratamentos sem adição de carboidrato e manitol 50 mM, o terceiro formado pelo tratamento oriundo da conservação *in vitro* com sorbitol 50 mM, e o quarto grupo é composto pelo tratamento controle absoluto.

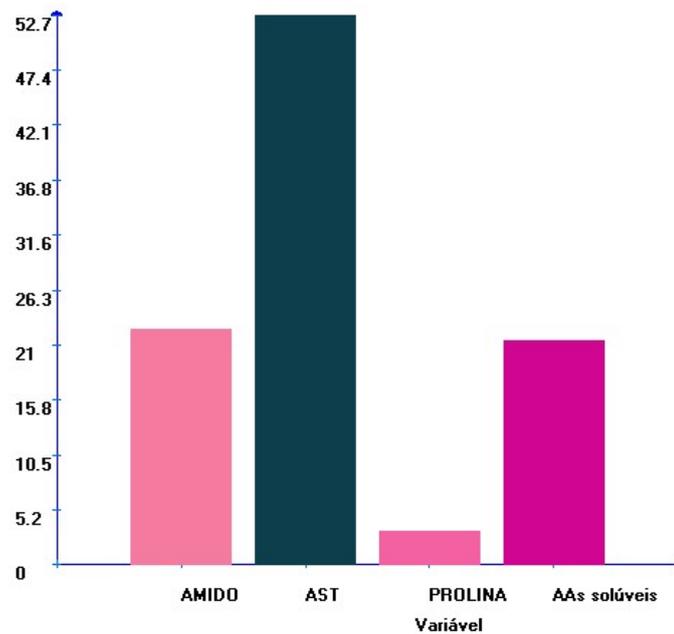
Observou-se maior contribuição relativa das análises bioquímicas, realizadas ao final do período de conservação *in vitro* de inhame da variedade “Purpureae”, para os teores de açúcares solúveis totais (AST) (52,70%), amido (22,63%) e aminoácidos totais solúveis (AAs solúveis) (21,41%), totalizando 96,74%, sendo estas as principais características determinantes na quantificação da diversidade entre os tratamentos. A baixa importância relativa do teor de prolina (3,26%) sugere que a análise dessa característica pode ser dispensável em trabalhos futuros (Figura 8).

Figura 7. Gráfico de dispersão bidimensional dos tratamentos nas análises bioquímicas aos 360 dias do crescimento lento *in vitro* de *D. alata* var. *purpurae* nas duas primeiras variáveis canônicas, Rio Branco, Acre



Nota: 1 – Controle absoluto; 2 - Sem carboidrato; 3 - Sacarose 50 mM; 4 - Sorbitol 50 mM; 5 - Sorbitol 200 mM; 6 - Manitol 50 mM.

Figura 8. Contribuição relativa das variáveis bioquímicas para a diversidade entre os tratamentos aos 360 dias de crescimento lento de *D. alata* var. *purpurae*, Singh (1981)



Nota: AST - açúcares solúveis totais; AAs - aminoácidos solúveis totais.

### 3.2 RECRESCIMENTO

Houve efeito significativo ( $P \leq 0,05$ ) para altura da brotação e para o número de folhas expandidas durante a fase de recrescimento de inhame da variedade “White” (Tabela 7). Plantas que haviam sido conservadas *in vitro* no tratamento com sorbitol 150 mM apresentaram maiores médias de altura e de número de folhas expandidas, as quais foram estatisticamente iguais aos tratamentos com Sacarose 50 mM, Sorbitol 50 e 100 mM, para ambas as variáveis.

Tabela 7. Altura da brotação e número de folhas expandidas de plantas de *D. alata* var. *white* aos 60 dias de recrescimento, Rio Branco, Acre

Fonte de variação	Variáveis	
	Altura da brotação (cm)	Nº de folhas expandidas
Sacarose 50 mM	2,76 ab	4,0 ab
Sacarose 100 mM	1,83 b	2,0 b
Sacarose 150 mM	1,57 b	2,0 b
Sorbitol 50 mM	2,92 ab	4,17 ab
Sorbitol 100 mM	2,98 ab	3,0 ab
Sorbitol 150 mM	4,05 a	4,83 a
<b>CV (%)</b>	<b>30,04</b>	<b>39,37</b>

Nota: Médias seguidas pela mesma letra não diferem ( $P \geq 0,05$ ) pelo teste de Tukey; Apêndice 23.

Plantas de inhame da variedade “Purpurae”, durante a fase de recrescimento, apresentaram efeito significativo ( $P \leq 0,05$ ) para as variáveis altura da brotação, número de folhas expandidas e de gemas (Tabela 8).

Tabela 8. Altura da brotação, número de folhas expandidas e de gemas de plantas de *D. alata* var. *purpurae* aos 60 dias de recrescimento, Rio Branco, Acre

Fonte de variação	Variáveis		
	Altura da brotação (cm)	Nº de folhas expandidas	Número de gemas
Sem carboidrato	2,37 ab	4,14 a	3,71 ab
Sacarose 50 mM	2,84 a	3,14 ab	3,57 ab
Sorbitol 50 mM	2,18 ab	2,14 b	3,43 b
Sorbitol 200 mM	2,05 ab	3,0 ab	5,43 a
Manitol 50 mM	1,5 b	3,29 ab	3,29 b
<b>CV (%)</b>	<b>28,74</b>	<b>27,25</b>	<b>31,17</b>

Nota: Médias seguidas pela mesma letra não diferem ( $P \geq 0,05$ ) pelo teste de Tukey; Apêndice 24.

Plantas do tratamento com sacarose 50 mM apresentaram maiores médias de altura da brotação, que diferiram estatisticamente apenas do tratamento com manitol 50 mM. A média do número de folhas expandidas foi superior, em plantas conservadas *in vitro* em meio sem a presença de carboidrato, e estatisticamente diferente de plantas oriundas no meio contendo 50 mM de sorbitol. Para o número de gemas, médias superiores podem ser observadas no tratamento com

sorbitol 200 mM, as quais diferiram dos tratamentos com sorbitol e manitol, ambos na concentração de 50 mM.

### 3.3 ACLIMATIZAÇÃO

Plantas aclimatizadas de inhame da variedade “White” não apresentaram efeito significativo ( $P \geq 0,05$ ) para as variáveis altura da brotação (ALT), número de folhas expandidas (NFE) e número de folhas senescentes (NFS) (Tabela 9). Plantas dos tratamentos com sacarose 100 e 150 mM não resistiram a esta fase.

Tabela 9. Altura da brotação (ALT), número de folhas expandidas (NFE) e de folhas senescentes (NFS) de plantas de *D. alata* var. *white* aos 120 dias de aclimatização, Rio Branco, Acre

Fonte de variação	Variáveis		
	ALT (cm)	NFE	NFS
Sacarose 50 mM	4,13 a	7,5 a	3,8 a
Sorbitol 50 mM	2,1 a	7,0 a	3,3 a
Sorbitol 100 mM	3,9 a	7,0 a	2,5 a
Sorbitol 150 mM	6,2 a	8,5 a	3,8 a
<b>CV (%)</b>	<b>56,0</b>	<b>57,35</b>	<b>31,72</b>

Nota: Médias seguidas pela mesma letra não diferem ( $P \geq 0,05$ ) pelo teste de Tukey; Apêndice 25.

Houve efeito significativo ( $P \leq 0,05$ ) para a altura da brotação (ALT) em plantas aclimatizadas de inhame da variedade “Purpureae” (Tabela 10). Plantas oriundas da conservação *in vitro* em meio contendo sorbitol 50 mM apresentou média de altura da brotação superior e estatisticamente diferente ( $P \leq 0,05$ ) dos demais tratamentos analisados. O tratamento com 200 mM de sorbitol teve 100% de mortalidade de plantas durante a aclimatização.

Tabela 10. Altura da brotação (ALT), número de folhas expandidas (NFE) e de folhas senescentes (NFS) de plantas de *D. alata* var. *purpureae* aos 120 dias de aclimatização, Rio Branco, Acre

Fonte de variação	Variáveis		
	ALT (cm)	NFE	NFS
Sem carboidrato	9,5 bc	5,5 a	2,8 a
Sacarose 50 mM	12,9 b	7,3 a	2,3 a
Sorbitol 50 mM	21,6 a	6,3 a	3,3 a
Manitol 50 mM	4,5 c	5,3 a	1,8 a
<b>CV (%)</b>	<b>32,4</b>	<b>21,95</b>	<b>38,3</b>

Nota: Médias seguidas pela mesma letra não diferem ( $P \geq 0,05$ ) pelo teste de Tukey; Apêndice 26.

#### 4. DISCUSSÃO

O efeito da concentração de agentes osmóticos durante a conservação de inhame foi investigado, incluindo a análise bioquímica de solutos orgânicos ao final deste período e a análise de variáveis de crescimento durante as fases de crescimento lento, recrescimento e aclimatização, tornando os resultados deste trabalho inovadores no campo do crescimento lento do gênero *Dioscorea*.

Tratamentos contendo sacarose e sorbitol reportaram maiores porcentagens de sobrevivência ao final do período de conservação, porém, plantas mais vigorosas puderam ser observadas nos tratamentos contendo as menores concentrações destes agentes. O manitol 50 mM, mesmo tendo apresentado sobrevivência acima de 50% no período de conservação, durante o recrescimento de plantas da variedade “Purpureae”, não foi eficaz em promover o crescimento. Relatado por Borges et al., (2004), o manitol em concentrações acima de 3,5% não permitiu a regeneração de explantes de *D. alata* conservada *in vitro* por nove meses.

Alguns trabalhos reportam o acúmulo de solutos orgânicos em culturas *in vitro* e *ex vitro* submetidas a estresses (SANTOS et al., 2016; RESENDE et al., 2019). O acúmulo de solutos compatíveis, como aminoácidos e açúcares, promove o equilíbrio osmótico entre o vacúolo e o citosol através do aumento da pressão osmótica celular, permitindo a manutenção da turgescência e protegendo as células contra a perda de água (SALEHI-LISAR; BAKHSHAYESHAN-AGDAM, 2016). A adaptação das plantas ao estresse hídrico está associada a ajustes metabólicos por meio do acúmulo desses osmólitos, além das desidrinas (CLOSE 1996). No presente trabalho os compostos orgânicos que mais contribuíram para a diferença entre os tratamentos, em ambas as variedades, foram amido e açúcares solúveis totais. Este acúmulo, certamente, foi consequência da desidratação, na busca de sanar os efeitos impostos por esse estresse às células, como parte do sistema de defesa vegetal.

A prolina é um aminoácido com característica de osmoproteção e possui fundamental importância no ajuste da tolerância das plantas a estresses abióticos (MOLINARI et al., 2007; SHARMA et al., 2011), uma vez que atua como tampão prevenindo a desintegração das membranas e mantendo a integridade de enzimas e proteínas (JALEEL et al., 2007).

O baixo acúmulo de prolina reportado neste trabalho pode estar relacionado ao órgão vegetal utilizado na análise, como pela idade dos tecidos celulares. Santos et al., (2016) afirmam que maior acúmulo de prolina foi detectado em segmentos caulinares, cerca de 2,45 vezes a mais, em comparação a segmentos foliares de mangabeira cultivadas *in vitro* sob condições de estresse osmótico. Os teores de prolina variam nos diferentes órgãos vegetais e quanto mais

jovens forem os tecidos, maior será a concentração deste aminoácido (KAUR; ASTHIR, 2015). Plantas de cana-de-açúcar micropropagadas sob regime de estresse hídrico, apresentaram maiores teores de prolina em tecidos foliares mais jovens em comparação às folhas mais velhas (CHA-UM; KIRDMANEE, 2008).

Durante o período de conservação, as plantas devem se manter viáveis e com capacidade de retomar o crescimento quando posteriormente forem expostas a condições de crescimento normal. Neste trabalho, os tratamentos com sacarose e sorbitol 50 mM tiveram maior capacidade de regeneração de plantas no ambiente *in vitro* e *ex vitro*, atingindo 80% de sobrevivência nas plantas aclimatizadas. Altas concentrações de sacarose (100 e 150 mM) não favoreceram a regeneração das plantas da variedade “White” no ambiente *ex vitro*.

Nossa pesquisa parece indicar que os carboidratos tiveram efeito nutricional e de ajustamento osmótico durante a conservação das duas variedades. No entanto, o efeito dos tratamentos durante as fases de recrescimento e de aclimatização foi menos evidente.

## 5 CONCLUSÕES

As concentrações de 50 mM de sacarose ou de sorbitol, e de 100 mM de sorbitol, para a variedade “White”, promovem maior sobrevivência durante o período de conservação.

A altura da brotação e o número de folhas expandidas aos 360 dias estão entre as variáveis que favorecem maior variabilidade entre os tratamentos durante o período de conservação *in vitro* da variedade “White”.

Sobrevivência de 100%, ao final do período de conservação *in vitro*, das plantas de inhame da variedade “Purpureae” é promovida pela adição de 50 mM de sorbitol ao meio de cultura.

As variáveis altura da brotação aos 270 dias e número de gemas aos 360 dias permitem maior diversidade entre os tratamentos durante o crescimento lento de inhame da variedade “Purpureae”.

As variáveis bioquímicas que têm maior contribuição na variabilidade entre os tratamentos, para ambas as variedades, são açúcares solúveis totais e amido.

A utilização de sacarose e sorbitol, na concentração de 50 mM, é eficaz na regeneração e aclimatização de plantas de inhame submetidas a 360 dias de crescimento lento.

O manitol não é eficaz na manutenção de inhame *in vitro*.

## REFERÊNCIAS

- ALVES, R. M.; GARCIA A. A. F.; CRUZ, E. D.; FIGUEIRA, A. Seleção de descritores botânico-agronômicos para caracterização de germoplasma de cupuaçuzeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.38, p.807-818, 2003.
- ANKITA, P.; ANIMESH, S. Effects of manitol and sucrose on growth inhibition and *in vitro* conservation of germoplasm of *Asparagus racemosusan* importante medicinal plant. **Medicinal Plants Internatioal Journal of Phytomedicines and Related Industries**, v. 5, p. 71-74, 2013.
- ARRIGONI-BLANK, M. F.; TAVARES, F. F.; BLANK, A. F.; SANTOS, M. C. dos; MENEZES, T. S. A.; SANTANA, A. D. D. *In vitro* conservation of sweet potato genotypes. **The Scientific World Journal**, v.1, n. 1, p.1-7, 2014.
- BATES, L.S. Rapid determination of free proline for water stress studies. **PlantSoil**, v.39, p.205-207, 1973.
- BARTLETT, M. S. Properties of sufficiency and statistical tests. **Proceedings of the Royal Society of London**, v. 160, n. 901, p. 268-282, 1937.
- BRAY, E. A. Plant responses to water deficit. **Trend in Plants Science**, v. 2, p.48-54, 1997.
- CARVALHO, A. C. P. P.; TORRES, A. C.; BRAGA, E. J. B.; LEMOS, E.P.DE ; SOUZA, F. V. D. ; PETERS, J. A.; WILLADINO, L.; CÂMARA, T.R. Glossário de Cultura de Tecidos de Plantas. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, v. 07, p. 30-60, 2011.
- CHA-UM, S.; KIRDMANEE, C. Effect of osmotic stress on proline accumulation, photosynthetic abilities and growth of sugarcane plantlets. **Pakistan Journal of Botany**, v. 40, n. 6, p. 2541-2552, 2008.
- CLOSE, T. J. Dehydrins emergence of a biochemical role of a family of plant dehydration proteins. **Physiol Plant**, v. 97, p. 795–803, 1996.
- CRUZ, C. D. Genes: a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 35, n. 3, p. 271-276, 2013.
- DINAKAR, C.; DJILIANOV, D.; BARTELS, D. Photosynthesis in desiccation tolerant plants: energy metabolism and antioxidative stress defense. **Plant Science**, vol. 182, p. 29-41, 2012.
- DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. T.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956.
- DUMET, D. Importance of source for de acquisition of tolerance to desiccation and cryopreservation of oil palm somatic embryos. **Cryo-letters**, v.14, p. 243- 250, 1993.
- FARIA, G. A.; COSTA, M. A. P. C.; JUNGHANS, T. G.; LEDO, C. A. S. Efeito da sacarose e do sorbitol na conservação *in vitro* de *Passiflora giberti* N. E. Brown. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.28, n.2, p.267-270, 2006.

FLORES, R.; ULIANA, S.C.; PIMENTEL, N.; GARLET, T.M.B. Sacarose e sorbitol na conservação *in vitro* de *Pfaffia tuberosa* (Spreng) Hicken (Amaranthaceae). **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v.4, n.3, p.192-199, 2013.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture**. Part. 1. The technology. 2.ed. Edington, Wilts, London: Exegetics, 1993. 1574p.

GOPAL, J.; CHAUHAN, N.S., Slow growth *in vitro* conservation of potato germplasm at low temperature. **Potato Research**, v. 53, n.3, p141–149, 2010.

GRUBBS, F. Procedures for detecting outlying observations in samples. **Technometrics**, Alexandria, v. 11, n. 1, p. 1-21, 1969.

HASSAN, N. A.; BEKHEET, S. A. Midterm storage and genetic stability of strawberry tissue cultures. **Research Journal of Agriculture and Biological Sciences**, v. 4, n. 5, p. 505–511, 2008.

JALEEL, C. A.; MANIVANNAN, P.; KISHOREKUMAR, A.; SANKAR, B.; GOPI, R.; SOMASUNDARAM, R.; PANNEERSELVAM, R. Alterations in osmoregulation, antioxidant enzymes and indole alkaloid levels in *Catharanthus roseus* exposed to water deficit. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 59, p. 150-157, 2007.

KADOTA, M.; IMIZU, K.; HIRANO, T. Doubléphase *in vitro* culture using sorbitol increase shoot proliferation and hyperhydricity in Japanese pear. **Scientia Horticulturae**, v. 89, p. 207-210, 2001.

KAUR, G.; ASTHIR, B. Proline: a key player in plant abiotic stress tolerance. **Biologia Plantarum**, v. 59, n. 4, p. 609–619, 2015.

MARINO, G.; NEGRI, P.; CELLINI, A.; MASIA, A. Effect of carbohydrates on *in vitro* low-temperature storage of shoot cultures of apricot. **Scientia Horticulturae**, v. 126, p. 434-440, 2010.

MOLINARI, H.B.C.; MARUR, C.J.; DAROS, E.; CAMPOS, M.K.F.; CARVALHO, J.R.F.P.; BESPALHOK-FILHO, J.C.; PEREIRA, L.F.P.; VIEIRA, L.G.E. Evaluation of the stress-inducible production of proline in transgenic sugarcane (*Saccharum* spp.): osmotic adjustment, chlorophyll fluorescence and oxidative stress. **Physiologia Plantarum**, v. 130, no. 2, p. 218-229, 2007.

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

OREGO, K. O.; GITONGA, N. M. MWANGI, M. OMBORI, O. NGUGI, M. Costeffective nutrient sources for tissue culture of cassava (*Manihote succulenta* Crantz). **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 66, p. 1296412973, 2012.

RAZAVIZADEH, R.; FARAHZADIANPOOR, F.; ADABAVAZEH, F.; KOMATSU, S. Physiological and morphological analyses of *Thymus vulgaris* L. *in vitro* cultures under polyethylene glycol (PEG)-induced osmotic stress. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 55, p. 342-357, 2019.

RESENDE, C. F.; PACHECO, V. S.; DORNELLAS, F. F.; OLIVEIRA, A. M. S.; FREITAS, J. C. E.; PEIXOTO, P. H. P. Responses of antioxidant enzymes, photosynthetic pigments and carbohydrates in micropropagated *Pitcairnia encholirioides* LB Sm. (Bromeliaceae) under *ex vitro* water deficit and after rehydration. **Brazilian Journal of Biology**, v. 79, p. 53-62, 2019.

SANDHYA, V.; ALI, S. K. Z.; GROVER, M.; REDDY, G.; VENKATESWARALU, B. Effect of plant growth promoting *Pseudomonas* spp. on compatible solutes antioxidant status and plant growth of maize under drought stress. **Plant Growth Regul**, v. 62, p. 21–30, 2010.

SANTOS, M. C.; CARDOSO, B. T.; GOMES-COPELAND, K. K. P.; da SILVA, A. V. C.; da SILVA JUNIOR, J. F.; LÉDO, A. S. Teor de prolina em brotações adventícias de mangabeira cultivadas *in vitro* sob condições de crescimento lento. **Scientia Plena**, v. 12, n. 12, 2016.

SALEHI-LISAR, S.Y.; BAKHSHAYESHAN-AGDAM, H. 2016. Drought stress in plants: causes, consequences, and tolerance. In: M.A. HOSSAIN, S.H. WANI, S. BHATTACHARJEE, D.J. BURRITT and L.S.P. TRAN, eds. Drought stress tolerance in plants. New York: Springer International Publishing, vol. 1 - Physiology and Biochemistry, pp. 1-16. [http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-28899-4\\_1](http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-28899-4_1).

SHAPIRO, S. S.; WILK, M. B. An analysis of variance test for normality (complete samples). **Biometrika**, v. 52, n. 3-4, p. 591-611, 1965.

SHARMA, S.; VILLAMOR, J.G.; VERSLUES, P.E. Essential role of tissue-specific proline synthesis and catabolism in growth and redox balance at low water potential. **Plant Physiology**, v. 157, p. 292-304, 2011.

SHIBLI, R. D.; SHATNAWI, M. A.; SUBAIH, W. S.; AJLOUNI, M. M. *In vitro* conservation and cryopreservation of plant genetic resources: a review. **World journal of agricultural sciences**, v. 2, p. 372-382, 2006.

SILVA, T. L.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. *In vitro* conservation of *Piper aduncum* and *Piper hispidinervum* under slow-growth conditions. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, p. 384-389, 2011.

SINGH, D. The relative importance of characters affecting genetic divergence. **Indian Journal of Genetic and Plant Breeding**, v. 41, p.237-245, 1981.

TUKEY, J. W. Comparing individual means in the analysis of variance. **Biometrics**, v. 5, n. 2, p. 99-114, jun. 1949.

VASCONCELOS, A. G. V.; TOMAS, L. F.; CAMARA, T. R.; WILLADINO, L. Hiperidricidade: uma desordem metabólica. **Ciência Rural**, v.42, n. 5, p. 837-844, 2012.

VELÁZQUEZ-MÁRQUEZ, S.; CONDE-MARTÍNEZ, V.; TREJO, C.; DELGADO-ALVARADO, A.; CARBALLO, A.; SUÁREZ, R.; MASCORRO, J.O.; TRUJILLO, A.R. Effects of water deficit on radicle apex elongation and solute accumulation in *Zea mays* L. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 96, p. 29-37, 2015.

WITHERS, L. A.; WILLIAMS, J. T. 1998. **Conservação in vitro de recursos genéticos de plantas**. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Orgs.). *Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas*. Brasília: Embrapa – SPI / Embrapa – CNPH. p.297-330.

YEMM, E. W.; COCKING, E. F. The determination of amino acids with ninhydrin. *Analyst*, v. 80, p. 209-213, 1955.

## APÊNDICES

APÊNDICE 1. Resumo da análise de variância para o número de folhas expandidas (NFE), número de gemas (NG) e altura da parte aérea (ALT) de plantas de *D. alata* var. *purpurae* cultivadas *in vitro*, em função da fonte de luz e do meio nutritivo, Rio Branco, Acre

Fonte de variação	GL	Quadrado Médio		
		NF	NG	Alt
Meio	1	0,54 <sup>ns</sup>	11,38*	12,17*
Luz	2	14,03*	15,21*	3,91*
Meio x Luz	2	4,41 <sup>ns</sup>	2,14 <sup>ns</sup>	0,70 <sup>ns</sup>
Erro	84	1,89	1,73	0,74
Total	89	-	-	-
CV (%)	-	26,63	27,25	23,49

Notas: <sup>ns</sup> não significativo e \* significativo ( $P \leq 0,05$ ).

APÊNDICE 2. Resumo da análise de variância para o teor de pigmentos (clorofila *a*, *b*, carotenoides e clorofila total) de plantas de *D. alata* var. *purpurae* cultivadas *in vitro*, em função da fonte de luz e do meio nutritivo, Rio Branco, Acre

Fonte de variação	GL	Quadrado Médio			
		Chl <i>a</i>	Chl <i>b</i>	Car	Chl total
Meio	1	0,03 <sup>ns</sup>	0,01 <sup>ns</sup>	0,00 <sup>ns</sup>	0,00 <sup>ns</sup>
Luz	2	0,10 <sup>ns</sup>	0,13*	0,05*	0,45*
Meio x Luz	2	0,06 <sup>ns</sup>	0,08*	0,01 <sup>ns</sup>	0,24 <sup>ns</sup>
Erro	24	0,04	0,02	0,00	0,09
Total	29	-	-	-	-
CV (%)	-	14,29	18,86	25,39	14,18

Notas: <sup>ns</sup> não significativo e \* significativo ( $P \leq 0,05$ ).

APÊNDICE 3. Resumo da análise de variância para o número de folhas expandidas (NFE), número de gemas (NG) e altura da parte aérea (ALT) de plantas de *D. alata* var. *white* cultivadas *in vitro*, em função da fonte de luz e do meio nutritivo, Rio Branco, Acre

Fonte de variação	GL	Quadrado Médio		
		NF	NG	Alt
Meio	1	6,40 <sup>ns</sup>	4,90 <sup>ns</sup>	5,83*
Luz	2	7,51*	4,54 <sup>ns</sup>	0,43 <sup>ns</sup>
Meio x Luz	2	2,13 <sup>ns</sup>	1,43 <sup>ns</sup>	0,50 <sup>ns</sup>
Erro	84	1,97	1,49	0,68
Total	89	-	-	-
CV (%)	-	29,41	29,11	22,27

Notas: <sup>ns</sup> não significativo e \* significativo ( $P \leq 0,05$ ).

APÊNDICE 4. Resumo da análise de variância para o teor de pigmentos (clorofila *a*, *b*, carotenoides e clorofila total) de plantas de *D. alata* var. *white* cultivadas *in vitro*, em função da fonte de luz e do meio nutritivo, Rio Branco, Acre

Fonte de variação	GL	Quadrado Médio			
		Chl <i>a</i>	Chl <i>b</i>	Car	Chl total
Meio	1	0,03 <sup>ns</sup>	0,01 <sup>ns</sup>	0,02*	0,07 <sup>ns</sup>
Luz	2	1,50*	0,45*	0,01 <sup>ns</sup>	3,57*
Meio x Luz	2	0,05 <sup>ns</sup>	0,00 <sup>ns</sup>	0,00 <sup>ns</sup>	0,09 <sup>ns</sup>
Erro	24	0,09	0,03	0,00	0,19
Total	29	-	-	-	-
CV (%)	-	28,43	27,31	33,82	26,91

Notas: <sup>ns</sup> não significativo e \* significativo ( $P \leq 0,05$ ).

APÊNDICE 5. Resumo da análise de variância para o número de folhas expandidas (NFE), número de gemas (NG) e altura da parte aérea (ALT) de plantas de *D. alata* var. *purpurae* pré-aclimatizadas, em função da fonte de luz e do meio nutritivo, Rio Branco, Acre

Fonte de variação	GL	Quadrado Médio		
		NF	NG	Alt
Meio	1	0,00 <sup>ns</sup>	4,27 <sup>ns</sup>	6,87 <sup>ns</sup>
Luz	2	1,51 <sup>ns</sup>	2,87 <sup>ns</sup>	16,25*
Meio x Luz	2	0,45 <sup>ns</sup>	2,07 <sup>ns</sup>	4,55 <sup>ns</sup>
Erro	54	3,18	3,19	2,28
Total	59	-	-	-
CV (%)	-	23,38	40,33	25,98

Notas: <sup>ns</sup> não significativo e \* significativo ( $P \leq 0,05$ ).

APÊNDICE 6. Resumo da análise de variância para o teor de pigmentos (clorofila *a*, *b*, carotenoides e clorofila total) de plantas de *D. alata* var. *purpurae* pré-aclimatizadas, em função da fonte de luz e do meio nutritivo, Rio Branco, Acre

Fonte de variação	GL	Quadrado Médio			
		Chl <i>a</i>	Chl <i>b</i>	Car	Chl total
Meio	1	0,03 <sup>ns</sup>	0,00 <sup>ns</sup>	0,00 <sup>ns</sup>	0,06 <sup>ns</sup>
Luz	2	0,01 <sup>ns</sup>	0,01 <sup>ns</sup>	0,00 <sup>ns</sup>	0,02 <sup>ns</sup>
Meio x Luz	2	0,07 <sup>ns</sup>	0,21 <sup>ns</sup>	0,00 <sup>ns</sup>	0,48 <sup>ns</sup>
Erro	24	0,03	0,09	0,00	0,21
Total	29	-	-	-	-
CV (%)	-	11,99	39,70	32,73	19,60

Notas: <sup>ns</sup> não significativo e \* significativo ( $P \leq 0,05$ ).

APÊNDICE 7. Resumo da análise de variância para a fotossíntese líquida (PN), condutância estomática ( $g_s$ ), eficiência no uso da água (EUA), eficiência de carboxilação (EC), e pressão parcial de  $CO_2$  (Ci) de plantas de *D. alata* var. *purpurae* pré-aclimatizadas, em função da fonte de luz e do meio nutritivo, Rio Branco, Acre

Fonte de variação	GL	Quadrado Médio				
		$P_N$	$g_s$	EUA	EC	Ci
Meio	1	1,70 <sup>ns</sup>	0,00 <sup>ns</sup>	0,03 <sup>ns</sup>	0,00 <sup>ns</sup>	0,24 <sup>ns</sup>
Luz	2	3,11*	0,00 <sup>ns</sup>	0,10*	0,00*	0,55*
Meio x Luz	2	0,67 <sup>ns</sup>	0,00 <sup>ns</sup>	0,02 <sup>ns</sup>	0,00 <sup>ns</sup>	0,12 <sup>ns</sup>
Erro	12	0,36	0,01	0,01	0,00	0,06
Total	17	-	-	-	-	-
CV (%)	-	49,38	20,42	43,43	49,00	0,63

Notas: <sup>ns</sup> não significativo e \* significativo ( $P \leq 0,05$ ).

APÊNDICE 8. Resumo da análise de variância para o número de folhas expandidas (NFE), número de gemas (NG) e altura da parte aérea (ALT) de plantas de *D. alata* var. *white* pré-aclimatizadas, em função da fonte de luz e do meio nutritivo, Rio Branco, Acre

Fonte de variação	GL	Quadrado Médio		
		NF	NG	Alt
Meio	1	10,42 <sup>ns</sup>	7,35*	1,80 <sup>ns</sup>
Luz	2	14,62*	5,27*	0,08 <sup>ns</sup>
Meio x Luz	2	2,82 <sup>ns</sup>	11,40*	5,26*
Erro	54	3,88	1,44	1,21
Total	59	-	-	-
CV (%)	-	26,93	33,52	22,57

Notas: <sup>ns</sup> não significativo e \* significativo ( $P \leq 0,05$ ).

APÊNDICE 9. Resumo da análise de variância para o teor de pigmentos (clorofila *a*, *b*, carotenoides e clorofila total) de plantas de *D. alata* var. *white* pré-aclimatizadas, em função da fonte de luz e do meio nutritivo, Rio Branco, Acre

Fonte de variação	GL	Quadrado Médio			
		Chl <i>a</i>	Chl <i>b</i>	Car	Chl total
Meio	1	0,13 <sup>ns</sup>	0,02 <sup>ns</sup>	0,00 <sup>ns</sup>	0,26 <sup>ns</sup>
Luz	2	0,17 <sup>ns</sup>	0,29 <sup>ns</sup>	0,02 <sup>ns</sup>	0,89 <sup>ns</sup>
Meio x Luz	2	0,08 <sup>ns</sup>	0,07 <sup>ns</sup>	0,01 <sup>ns</sup>	0,29 <sup>ns</sup>
Erro	24	0,17	0,09	0,01	0,46
Total	29	-	-	-	-
CV (%)	-	34,37	52,07	31,96	37,87

Notas: <sup>ns</sup> não significativo e \* significativo ( $P \leq 0,05$ ).

APÊNDICE 10. Resumo da análise de variância para a condutância estomática ( $g_s$ ) e pressão parcial de  $CO_2$  (Ci) de plantas de *D. alata* var. *white* pré-aclimatizadas, em função da fonte de luz e do meio nutritivo, Rio Branco, Acre

Fonte de variação	GL	Quadrado Médio	
		$g_s$	Ci
Meio	1	0,00 <sup>ns</sup>	1,26*
Luz	2	0,03*	3,70*
Meio x Luz	2	0,00 <sup>ns</sup>	0,22 <sup>ns</sup>
Erro	54	0,00	0,19
Total	59	-	-
CV (%)	-	21,35	1,12

Notas: <sup>ns</sup> não significativo e \* significativo ( $P \leq 0,05$ ).

APÊNDICE 11. Resumo da análise de variância para o número de folhas expandidas (NFE), número de gemas (NG) e altura da parte aérea (ALT) de plantas de *D. alata* var. *purpurae* aclimatizadas, em função da fonte de luz e do meio nutritivo, Rio Branco, Acre

Fonte de variação	GL	Quadrado Médio		
		NF	NG	Alt
Meio	1	50,42 <sup>ns</sup>	38,82 <sup>ns</sup>	58,41 <sup>ns</sup>
Luz	2	1,07 <sup>ns</sup>	4,02 <sup>ns</sup>	238,5*
Meio x Luz	2	22,87 <sup>ns</sup>	15,52 <sup>ns</sup>	13,80 <sup>ns</sup>
Erro	54	14,07	9,45	47,86
Total	59	-	-	-
CV (%)	-	28,60	27,41	38,68

Notas: <sup>ns</sup> não significativo e \* significativo ( $P \leq 0,05$ ).

APÊNDICE 12. Resumo da análise de variância para o teor de pigmentos (clorofila *a*, *b*, carotenoides e clorofila total) de plantas de *D. alata* var. *purpurae* aclimatizadas, em função da fonte de luz e do meio nutritivo, Rio Branco, Acre

Fonte de variação	GL	Quadrado Médio			
		Chl <i>a</i>	Chl <i>b</i>	Car	Chl total
Meio	1	1,06*	0,03 <sup>ns</sup>	0,02*	1,15*
Luz	2	0,41*	0,04 <sup>ns</sup>	0,01*	0,82*
Meio x Luz	2	0,00 <sup>ns</sup>	0,00 <sup>ns</sup>	0,00 <sup>ns</sup>	0,02 <sup>ns</sup>
Erro	24	0,08	0,01	0,01	0,15
Total	29	-	-	-	-
CV (%)	-	15,58	19,59	12,44	16,15

Notas: <sup>ns</sup> não significativo e \* significativo ( $P \leq 0,05$ ).

APÊNDICE 13. Resumo da análise de variância para a massa fresca da parte aérea (MFPA) e da raiz (MFR), e massa seca da parte aérea (MSPA) e raiz (MSR) de plantas de *D. alata* var. *purpurae* aclimatizadas, em função da fonte de luz e do meio nutritivo, Rio Branco, Acre

Fonte de variação	GL	Quadrado Médio			
		MFPA	MFR	MSPA	MSR
Meio	1	13,37*	5,92*	0,17*	0,04*
Luz	2	1,75 <sup>ns</sup>	1,19 <sup>ns</sup>	0,01 <sup>ns</sup>	0,00 <sup>ns</sup>
Meio x Luz	2	1,04 <sup>ns</sup>	2,64 <sup>ns</sup>	0,01 <sup>ns</sup>	0,02 <sup>ns</sup>
Erro	24	1,45	0,90	0,02	0,01
Total	29	-	-	-	-
CV (%)	-	23,65	19,59	27,95	35,27

Notas: <sup>ns</sup> não significativo e \* significativo ( $P \leq 0,05$ ).

APÊNDICE 14. Resumo da análise de variância para a fotossíntese líquida (PN), condutância estomática ( $g_s$ ), eficiência no uso da água (EUA), eficiência de carboxilação (EC), e pressão parcial de  $CO_2$  (Ci) de plantas de *D. alata* var. *purpurae* aclimatizadas, em função da fonte de luz e do meio nutritivo, Rio Branco, Acre

Fonte de variação	GL	Quadrado Médio				
		PN	$g_s$	EUA	EC	Ci
Meio	1	0,93 <sup>ns</sup>	0,00 <sup>ns</sup>	1,41 <sup>ns</sup>	0,00 <sup>ns</sup>	11,06 <sup>ns</sup>
Luz	2	2,93*	0,00 <sup>ns</sup>	12,50*	0,00*	69,11*
Meio x Luz	2	0,82 <sup>ns</sup>	0,00 <sup>ns</sup>	1,14 <sup>ns</sup>	0,00 <sup>ns</sup>	4,73 <sup>ns</sup>
Erro	12	0,60	0,00	0,59	0,00	5,88
Total	17	-	-	-	-	-
CV (%)	-	25,85	12,62	22,50	34,15	8,80

Notas: <sup>ns</sup> não significativo e \* significativo ( $P \leq 0,05$ ).

APÊNDICE 15. Resumo da análise de variância para o número de folhas expandidas (NFE), número de gemas (NG) e altura da parte aérea (ALT) de plantas de *D. alata* var. *white* aclimatizadas, em função da fonte de luz e do meio nutritivo, Rio Branco, Acre

Fonte de variação	GL	Quadrado Médio		
		NF	NG	Alt
Meio	1	19,27 <sup>ns</sup>	0,27 <sup>ns</sup>	5,16 <sup>ns</sup>
Luz	2	9,95 <sup>ns</sup>	9,60 <sup>ns</sup>	4,75 <sup>ns</sup>
Meio x Luz	2	1,62 <sup>ns</sup>	1,27 <sup>ns</sup>	33,88 <sup>ns</sup>
Erro	54	8,08	4,49	11,32
Total	59	-	-	-
CV (%)	-	30,56	27,53	30,91

Notas: <sup>ns</sup> não significativo e \* significativo ( $P \leq 0,05$ ).

APÊNDICE 16. Resumo da análise de variância para o teor de pigmentos (clorofila *a*, *b*, carotenoides e clorofila total) de plantas de *D. alata* var. *white* aclimatizadas, em função da fonte de luz e do meio nutritivo, Rio Branco, Acre

Fonte de variação	GL	Quadrado Médio			
		Chl <i>a</i>	Chl <i>b</i>	Car	Chl total
Meio	1	0,26 <sup>ns</sup>	0,11*	0,00 <sup>ns</sup>	0,71 <sup>ns</sup>
Luz	2	0,38 <sup>ns</sup>	0,02 <sup>ns</sup>	0,00 <sup>ns</sup>	0,32 <sup>ns</sup>
Meio x Luz	2	0,07 <sup>ns</sup>	0,03 <sup>ns</sup>	0,00 <sup>ns</sup>	0,18 <sup>ns</sup>
Erro	24	0,12	0,01	0,00	0,18
Total	29	-	-	-	-
CV (%)	-	18,46	21,20	12,03	18,02

Notas: <sup>ns</sup> não significativo e \* significativo ( $P \leq 0,05$ ).

APÊNDICE 17. Resumo da análise de variância para a massa fresca da parte aérea (MFPA) e da raiz (MFR), e massa seca da parte aérea (MSPA) e raiz (MSR) de plantas de *D. alata* var. *white* aclimatizadas, em função da fonte de luz e do meio nutritivo, Rio Branco, Acre

Fonte de variação	GL	Quadrado Médio			
		MFPA	MFR	MSPA	MSR
Meio	1	6,64*	1,26 <sup>ns</sup>	0,13*	0,00 <sup>ns</sup>
Luz	2	3,78 <sup>ns</sup>	7,10*	0,05 <sup>ns</sup>	0,05 <sup>ns</sup>
Meio x Luz	2	0,24 <sup>ns</sup>	0,49 <sup>ns</sup>	0,01 <sup>ns</sup>	0,01 <sup>ns</sup>
Erro	24	1,25	1,50	0,02	0,01
Total	29	-	-	-	-
CV (%)	-	37,17	48,40	37,17	60,29

Notas: <sup>ns</sup> não significativo e \* significativo ( $P \leq 0,05$ ).

APÊNDICE 18. Resumo da análise de variância para a fotossíntese líquida (PN), condutância estomática ( $g_s$ ), eficiência no uso da água (EUA), eficiência de carboxilação (EC), e pressão parcial de CO<sub>2</sub> (Ci) de plantas de *D. alata* var. *white* aclimatizadas, em função da fonte de luz e do meio nutritivo, Rio Branco, Acre

Fonte de variação	GL	Quadrado Médio				
		P <sub>N</sub>	$g_s$	EUA	EC	Ci
Meio	1	0,01 <sup>ns</sup>	0,00 <sup>ns</sup>	0,01 <sup>ns</sup>	0,00 <sup>ns</sup>	0,01 <sup>ns</sup>
Luz	2	4,43*	0,00 <sup>ns</sup>	0,11 <sup>ns</sup>	0,01*	6,95*
Meio x Luz	2	0,19 <sup>ns</sup>	0,00 <sup>ns</sup>	0,00 <sup>ns</sup>	0,00 <sup>ns</sup>	0,06 <sup>ns</sup>
Erro	12	1,12	0,00	0,09	0,00	1,22
Total	17	-	-	-	-	-
CV (%)	-	16,06	16,76	10,67	18,86	3,96

Notas: <sup>ns</sup> não significativo e \* significativo ( $P \leq 0,05$ ).

APÊNDICE 19. Resumo da análise de variância para a anatomia foliar de plantas de *D. alata* var. *purpurae* propagadas *in vitro* em função da fonte de luz, Rio Branco, Acre

Fonte de variação	GL	Quadrado Médio					
		EEAD	EEAB	EPP	EPL	ELF	NPP
Meio	1	0,00 <sup>ns</sup>	0,00*	0,00 <sup>ns</sup>	0,00 <sup>ns</sup>	0,01 <sup>ns</sup>	0,16 <sup>ns</sup>
Luz	2	0,00*	0,00*	0,01*	0,00*	0,06*	42,79*
Meio x Luz	2	0,00 <sup>ns</sup>	0,00*	0,00 <sup>ns</sup>	0,00 <sup>ns</sup>	0,00 <sup>ns</sup>	5,29 <sup>ns</sup>
Erro	18	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	3,30
Total	23	-	-	-	-	-	-
CV (%)	-	24,27	14,54	25,44	14,51	15,41	12,47

Notas: <sup>ns</sup> não significativo e \* significativo ( $P \leq 0,05$ ).

APÊNDICE 20. Resumo da análise de variância para a anatomia foliar de plantas de *D. alata* var. *white* propagadas *in vitro* em função da fonte de luz, Rio Branco, Acre

Fonte de variação	GL	Quadrado Médio					
		EEAD	EEAB	EPP	EPL	ELF	NPP
Meio	1	0,00 <sup>ns</sup>	0,00 <sup>ns</sup>	0,00 <sup>ns</sup>	0,00 <sup>ns</sup>	0,01 <sup>ns</sup>	0,16 <sup>ns</sup>
Luz	2	0,00 <sup>ns</sup>	0,00 <sup>ns</sup>	0,00 <sup>ns</sup>	0,00 <sup>ns</sup>	0,01 <sup>ns</sup>	46,79*
Meio x Luz	2	0,00*	0,00 <sup>ns</sup>	0,00 <sup>ns</sup>	0,00 <sup>ns</sup>	0,03 <sup>ns</sup>	5,54 <sup>ns</sup>
Erro	18	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	2,25
Total	23	-	-	-	-	-	-
CV (%)	-	16,80	22,68	22,03	13,68	15,20	10,11

Notas: <sup>ns</sup> não significativo e \* significativo ( $P \leq 0,05$ ).

APÊNDICE 21. Resumo da análise de variância para a anatomia foliar de plantas de *D. alata* var. *purpurae* aclimatizadas em função da fonte de luz e do meio nutritivo, Rio Branco, Acre

Fonte de variação	GL	Quadrado Médio					
		EEAD	EEAB	EPP	EPL	ELF	NPP
Meio	1	0,00 <sup>ns</sup>	20,16*				
Luz	2	0,00 <sup>ns</sup>	0,00 <sup>ns</sup>	0,00*	0,00 <sup>ns</sup>	0,00 <sup>ns</sup>	6,16 <sup>ns</sup>
Meio x Luz	2	0,00 <sup>ns</sup>	0,00 <sup>ns</sup>	0,00*	0,00 <sup>ns</sup>	0,00 <sup>ns</sup>	1,16 <sup>ns</sup>
Erro	18	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,91
Total	23	-	-	-	-	-	-
CV (%)	-	16,35	19,67	10,78	18,57	12,72	10,13

Notas: <sup>ns</sup> não significativo e \* significativo ( $P \leq 0,05$ ).

APÊNDICE 22. Resumo da análise de variância para a anatomia foliar de plantas de *D. alata* var. *white* aclimatizadas em função da fonte de luz e do meio nutritivo, Rio Branco, Acre

Fonte de variação	GL	Quadrado Médio					
		EEAD	EEAB	EPP	EPL	ELF	NPP
Meio	1	0,00 <sup>ns</sup>	2,04 <sup>ns</sup>				
Luz	2	0,00 <sup>ns</sup>	0,00 <sup>ns</sup>	0,01*	0,00*	0,06*	0,50 <sup>ns</sup>
Meio x Luz	2	0,00 <sup>ns</sup>	0,00 <sup>ns</sup>	0,00*	0,00*	0,02*	7,16*
Erro	18	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,84
Total	23	-	-	-	-	-	-
CV (%)	-	15,04	21,50	14,70	14,57	8,72	6,52

Notas: <sup>ns</sup> não significativo e \* significativo ( $P \leq 0,05$ ).

APÊNDICE 23. Resumo da análise de variância para o número de folhas expandidas (NFE), número de gemas (NG) e altura da parte aérea (ALT) de plantas de *D. alata* var. *white* aos 60 dias de recrescimento, Rio Branco, Acre

Fonte de variação	GL	Quadrado Médio		
		NF	NG	Alt
Tratamento	5	8,46*	2,24*	4,78*
Erro	30	1,72	1,45	0,65
Total	35	-	-	-
CV (%)	-	39,37	35,03	30,04

Notas: <sup>ns</sup> não significativo e \* significativo ( $P \leq 0,05$ ).

APÊNDICE 24. Resumo da análise de variância para o número de folhas expandidas (NFE), número de gemas (NG) e altura da parte aérea (ALT) de plantas de *D. alata* var. *purpurae* aos 60 dias de recrescimento, Rio Branco, Acre

Fonte de variação	GL	Quadrado Médio		
		NF	NG	Alt
Tratamento	4	3,57*	5,38*	1,66*
Erro	30	0,73	1,46	0,39
Total	34	-	-	-
CV (%)	-	27,25	31,17	28,74

Notas: <sup>ns</sup> não significativo e \* significativo ( $P \leq 0,05$ ).

APÊNDICE 25. Resumo da análise de variância para o número de folhas expandidas (NFE), número de folhas senescentes (NFS) e altura da parte aérea (ALT) de plantas de *D. alata* var. *white* aclimatizadas, Rio Branco, Acre

Fonte de variação	GL	Quadrado Médio		
		NF	NG	Alt
Tratamento	3	2,0 <sup>ns</sup>	1,39 <sup>ns</sup>	11,54 <sup>ns</sup>
Erro	12	18,50	1,10	5,22
Total	15	-	-	-
CV (%)	-	57,35	31,72	56,00

Notas: <sup>ns</sup> não significativo e \* significativo ( $P \leq 0,05$ ).

APÊNDICE 26. Resumo da análise de variância para o número de folhas expandidas (NFE), número de folhas senescentes (NFS) e altura da parte aérea (ALT) de plantas de *D. alata* var. *purpurae* aclimatizadas, Rio Branco, Acre

Fonte de variação	GL	Quadrado Médio		
		NF	NFS	Alt
Tratamento	3	3,22 <sup>ns</sup>	1,66 <sup>ns</sup>	208,01*
Erro	12	1,77	0,91	15,43
Total	15	-	-	-
CV (%)	-	21,95	38,30	32,40

Notas: <sup>ns</sup> não significativo e \* significativo ( $P \leq 0,05$ ).

QUADRO 1 - Composição inorgânica e orgânica do meio WPM (LLOYD; MCCOWN, 1980) e MS (MURASHIGE; SKOOG, 1946), Rio Branco, Acre

	Concentração dos Componentes (mg L <sup>-1</sup> )	
	WPM	MS
	<b>Macronutrientes</b>	
Nitrato de Amônio NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	400,00	1.650,00
Nitrato de Cálcio tetrahidratado Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	556,00	-
Nitrato de Potássio KNO <sub>3</sub>	-	1.900,00
Cloreto de Cálcio dihidratado CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	96,00	440,00
Sulfato de Magnésio heptahidratado MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	370,00	370,00
Fosfato de Potássio monobásico KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170,00	170,00
Sulfato de Potássio anidro K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	990,00	-
	<b>Micronutrientes</b>	
Ácido Bórico H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,20	6,20
Sulfato de Manganês monohidratado MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	22,3	22,3
Sulfato de Zinco heptahidratado ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8,60	8,60
Iodeto de Potássio KI	-	0,83
Molibidato de sódio dihidratado Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,25	0,25
Sulfato de Cobre pentahidratado CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,25	0,025
Cloreto de Cobalto hexahidratado CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	-	0,025
	<b>FeEDTA</b>	
EDTA dissódico dihidratado Na <sub>2</sub> EDTA.2H <sub>2</sub> O	37,30	37,30
Sulfato ferroso heptahidratado FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	27,80	27,80
	<b>Vitaminas e Aminoácidos</b>	
Ácido nicotínico (B3)	0,50	0,50
Piridoxinina-HCL (B6)	0,50	0,50
Tiaminina.HCl (B1)	1,00	0,10
Glicina	2,00	2,00
Mio-inositol	100,00	100,00