



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Lígia Helena Vezo Neves

MICROPROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE BATATA-
DOCE [*IPOMOEA BATATAS* (L.) LAM.]

Dissertação no âmbito do Mestrado em Biodiversidade e Biotecnologia Vegetal,
orientada pelo Professor Doutor Jorge Manuel Pataca Leal Canhoto e
apresentada ao Departamento de Ciências da Vida da Faculdade de Ciências e
Tecnologia da Universidade de Coimbra.

Outubro de 2020

Trabalho realizado no âmbito da Unidade de I&D Centre for Functional Ecology- Science for People & Planet (CFE), com referência UIBD/04004/2020, com o apoio financeiro da FCT/MCTES através de fundos nacionais (PIDDAC) e o projeto “Renature- Valorization of the Natural Endogenous Resources of the Centro Region” (Centro-01-0145-FEDER-000007). Funded by the Comissão de Coordenação da Região Centro (CCDR-C) and subsidized by th European Regional Development Found (FEDER).



Cofinanciado por:



AGRADECIMENTOS

A elaboração do presente trabalho e a conclusão de mais uma etapa académica, foram, sem dúvida, uma das maiores conquistas que alcancei no meu percurso profissional até à presente data. No entanto tais concretizações apenas foram possíveis com auxílio de pessoas maravilhosas que aqui quero referir com todo o apreço.

Primeiramente, gostaria de agradecer ao Professor Doutor Jorge Canhoto pela orientação, disponibilidade e paciência que teve comigo.

De seguida, a “Fundación Mujeres por África”, e a Universidade de Coimbra pela oportunidade que me deram permitindo-me assim alcançar mais uma realização pessoal.

A Dra. Madalena Pirata pela amizade e contínua presença, foi uma grande aliada na construção deste trabalho e sobretudo uma “parceira de todas as horas “.

À equipa do laboratório composta pela Dra. Sandra, a Mariana, a Elsa, a Ana, o André, o Miguel, a Daniela, o João e o Bruno quero deixar o meu sincero obrigado pelos esclarecimentos prestados.

À Dona Isabel e à Dona Célia por todo o zelo e ajuda que prestaram, para que fossem reunidas as melhores condições a fim de realizar as atividades laboratoriais, cruciais para a elaboração da presente tese.

Aos meus colegas de mestrado e de residência que tive privilégio em conhecer e partilhar boas vivências.

E por fim, aos meus queridos pais, irmãos e demais familiares que sempre apoiaram as minhas escolhas e me deram suporte para que pudesse concluir os meus estudos com brio e perseverança.

ÍNDICE

ÍNDICE.....	4
ABSTRACT	9
1.INTRODUÇÃO.....	11
1.1.Contextualização	12
1.2.Classificação e descrição	13
1.3.Ecologia e ciclo de cultivo.....	14
1.4.Origem e distribuição	15
1.5.Importância da cultura de batata-doce.....	16
1.6.Formas de propagação	17
1.7.Micropropagação <i>in vitro</i>	18
1.8.Objetivos.....	19
2.MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
2.1.Caraterização do material vegetal.....	22
2.2.Desinfecção do material vegetal.....	23
2.3.Estabelecimento <i>in vitro</i> dos genótipos	23
2.3.1.Proliferação de meristemas axilares	23
2.4.Enraizamento/aclimação.....	24
2.5.Análise dos dados	26
3.RESULTADOS	27
3.1.Estabelecimento <i>in vitro</i> dos genótipos	28
3.1.1.Proliferação de Meristemas axilares	29
3.2.Enraizamento/aclimação de rebentos caulinares provenientes da proliferação de meristemas sem BAP.....	34
3.3.Enraizamento/ aclimação de rebentos caulinares provenientes da proliferação de meristemas com BAP	37
4.DISSCUSSÃO	45
4.1.Estabelecimento <i>in vitro</i> dos genótipos	46
4.1.1.Proliferação de meristemas axilares	47
4.2.Enraizamento/aclimação de rebentos caulinares provenientes de meristemas sem BAP.....	49
4.3.Enraizamento/aclimação de rebentos caulinares provenientes de meristemas com BAP	50
5.CONCLUSÃO.....	52
6.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1:** Batatas-doces usadas para obtenção do material vegetal dos ensaios: A-casca roxa e polpa amarela (BRA2); B- casca vermelho-acastanhado e polpa Amarela (BVL); C- casca roxa e polpa amarela (BRA1) e C-casca branca e polpa Amarela (BBA)..... 22
- Figura 2:** Representação esquemática do estabelecimento *in vitro* da batata-doce: A) segmento nodal após assepsia; B) estabelecimento *in vitro* em meio MS; C) Multiplicação de segmentos nodais em diferentes concentrações de BAP. 24
- Figura 3:** Representação esquemática do processo de obtenção de plântulas para o enraizamento: A) explante inicial; B) segmento nodal usado na multiplicação isento de regulador de crescimento e ulteriormente enraizado e aclimatado em diferentes substratos; C) rebentos caulinares em diferentes concentrações de IBA provenientes da fase de multiplicação com BAP e ulteriormente enraizados e aclimatados em substratos. 26
- Figura 4:** Batatas-doces após quatro semanas de subcultivo a partir de um único segmento nodal com 1,0 cm de comprimento: A-BRA2; B-BBA; C-BVL e D- BRA1.28
- Figura 5:** Proliferação de meristemas axilares a partir de segmentos nodais com 0,5 cm de comprimentos (A) e regeneração de uma planta adulta ao fim de quatro semanas *in vitro* (B). 29
- Figura 6:** Plântulas após quatro semanas de aclimação em diferentes substratos: T+P-Turfa com Perlite e T+V-Turfa com Vermiculite. 35
- Figura 7:** Plantas adultas após cinco semanas de aclimação de plântulas enraizadas *in vitro* com concentrações diferentes de IBA..... 38

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Efeito do BAP na cultura <i>in vitro</i> de segmentos nodais de batata-doce. NSN - número de segmentos nodais, CC - comprimento do caule, NF - número de folhas, NR - número de raízes e CMR comprimento da maior raiz CMR.	30
Tabela 2: Comparação do efeito do BAP na cultura <i>in vitro</i> de segmentos nodais dos genótipos BRA1 e BRA2: NSN - número de segmentos nodais, CC - comprimento do caule, NF - número de folhas, NR - número de raízes e CMR comprimento da maior raiz CMR.	32
Tabela 3: Comparação do efeito do BAP na cultura <i>in vitro</i> de segmentos nodais de batata-doce. NSN - número de segmentos nodais, CC - comprimento do caule, NF - número de folhas, NR - número de raízes e CMR comprimento da maior raiz.	33
Tabela 4: Efeito dos diferentes substratos no enraizamento dos genótipos BRA2, BRA1, BVL e BBA: comprimento do caule (CC), número de nós (NN), número de raízes (NR) e comprimento da maior raiz (CMR).	36
Tabela 5: Taxas de sobrevivência das plântulas após a aclimação das plântulas em substratos.	37
Tabela 6: Aclimação de plântulas do genótipo BRA1: CC-cumprimento do caule, NR-número de Raízes, CMR-comprimento da maior raiz, MSR-massa seca da raiz e MSPA-massa seca da parte aérea.	39
Tabela 7: Aclimação de plântulas do genótipo BRA2: CC-cumprimento do caule, NR-número de Raízes, CMR-comprimento da maior raiz, MSR-massa seca da raiz e MSPA-massa seca da parte aérea.	41
Tabela 8: Aclimação de plântulas do genótipo BRVL: CC-cumprimento do caule, NR-número de Raízes, CMR-comprimento da maior raiz, MSR-massa seca da raiz e MSPA-massa seca da parte aérea.	42
Tabela 9: Aclimação de plântulas do genótipo BBA: CC-cumprimento do caule, NR-número de Raízes, CMR-comprimento da maior raiz, MSR-massa seca da raiz e MSPA-massa seca da parte aérea.	43

RESUMO

A batata-doce é uma planta dicotiledónea que pertence à família Convolvulaceae. É um alimento bastante versátil cuja distribuição é amplamente difundida pelo mundo com vasta aplicação tanto no uso doméstico como no ramo da indústria. É uma espécie que se adapta muito bem a uma gama de condições ambientais e a sua produção é relativamente fácil e pouco dispendiosa. Contudo a cultura da batata-doce é feita maioritariamente através do sistema convencional pelos produtores, um sistema não muito eficaz para a sua produção o que muitas vezes trava o seu sucesso.

A micropropagação através da proliferação de meristemas constitui uma importante ferramenta capaz de solucionar os variados problemas da propagação da batata-doce relacionados com a baixa taxa de produção. Esta técnica permite obter em pouco tempo uma quantidade enorme de clones saudáveis provenientes de um tamanho reduzido de um material vegetal. Neste caso, essa técnica pode ser usada para explorar determinada espécie/cultivar de interesse através da otimização de um meio de cultura mais adequado às necessidades fisiológicas da planta em si.

Este trabalho teve como objetivo determinar as melhores condições de cultura *in vitro* para a propagação desta espécie e, ao mesmo tempo fazer um sistema de produção simples para potencializar a multiplicação rápida da batata-doce para agricultores.

As técnicas empregues, em 4 genótipos diferentes, BRA1, BRA2, BVL e BBA, para a concretização dos objetivos propostos, foram as seguintes: a) proliferação de meristemas axilares; b) enraizamento *ex vitro* de segmentos caulinares provenientes diretamente da proliferação de meristemas sem BAP em substrato na proporção 2:1 de turfa com perlite e vermiculite respetivamente c) enraizamento dos rebentos caulinares provenientes da proliferação de meristemas tratados com diferentes concentrações de IBA (ácido 3-indolbutírico) seguido da aclimação visando apurar quais as condições de cultura favorecem maior o poder vegetativo, constituindo-se de grande importância aos portugueses servindo-se de auxílio nas produções de batata-doce.

A proliferação de meristemas suplementada com BAP (benzilaminopurina) possibilitou ver o quão variado eram os genótipos BRA1 e BRA2. Observou-se que uma boa propagação de plântulas do genótipo BRA2 só deve ser conseguida em meio MS isento de BAP. Os genótipos BVL e BBA também podem ser conseguidos em meio isento de

BAP, contudo concentrações entre 0 a 0,5 e 0 a 0,2 mg L⁻¹ respectivamente podem potencializar melhores resultados. O genótipo BRA1 ao contrário dos restantes obteve-se melhores resultados apenas em meios com BAP.

A transferência das plântulas dos genótipos para os diferentes substratos mostrou ser muito eficaz, sendo a taxa de sobrevivência de 100% em ambos genótipos, porém não verificaram diferenças significativas nos parâmetros avaliados.

Nos ensaios com plântulas enraizadas em IBA, os resultados foram insatisfatórios, uma vez que ficaram um pouco inviabilizados devido a perdas de material vegetal em alguns tratamentos. Contudo foram observadas algumas diferenças significativas nos parâmetros estudados face a indução de enraizamento/aclimação dos rebentos após submersão em IBA.

Palavra-chave: Batata-doce, micropropagação, proliferação de meristemas, reguladores de crescimento, enraizamento

ABSTRACT

The sweet potato is a dicot plant belonging to the Convolvulaceae family. As a very versatile food, its distributions is amply distributed worldwide, with a myriad of applications both domestic and industrial. As a species, it is quite adaptable to several environmental conditions and its production is both easy and has a relatively low associated cost. However, its culture is mainly sustained through conventional methods by producers. These methods are usually poorly effective, which means, in turn, low yields in production.

Micropropagation through meristem proliferation constitutes a valuable tool capable of tackling the various low-yield propagation problems associated to low rates of production. This method allows for the generation of a high number of healthy clones, from a small amount of plant tissue. Regarding this, micropropagation can be used to the study of a species/crop of interest through optimization of a culture medium adequate to the physiological needs of the plant.

The main goal of this work was to determine the optimal *in vitro* culture conditions for the propagation of this species and, at the same time, to elaborate a simple production method to potentiate the rapid proliferation of the sweet potato to farmers.

Towards this goal the techniques, employed in 4 different genotypes, BRA1, BRA1, BVL e BBA, were as follows: a) *in vitro* axillary meristem proliferation, b) *ex vitro* rooting of shoots obtained directly from *in vitro* cultures on substrate in the proportion 2:1 of peat with perlite and vermiculite respectively, and c) rooting of shoots obtained from meristem proliferation treated with different IBA (Indole-3-butyric acid) concentrations, as to investigate which are the most favorable conditions for vegetative strength, highly important for Portuguese farmers and, as a consequence, their productions.

The proliferation of meristems supplemented with BAP (benzylaminopurine) made it possible to see how the BRA1 and BRA2 genotypes are varied. It was observed that a good propagation of plantlets of the BRA2 genotype should only be achieved in BAP-free MS medium. The BVL and BBA genotypes can also be obtained in a BAP-free medium, however concentrations between 0 to 0.5 and 0 to 0.2 mg L⁻¹ respectively can enhance greater results. The BRA1 genotype, unlike the others, obtained better results only in media with BAP.

The transfer of the plantlets to the different substrates was successful, with a survival rate of 100% in both genotypes although there are no significant differences.

In tests with plantlets rooted in IBA, satisfactory results were not obtained, since they were a little unviable due to the loss of plant material in some treatments. However, some significant differences were observed in the parameters studied regarding the induction of rooting/acclimatization of the shoots after submersion in IBA.

Key words: Sweet potatoes, micropropagation, meristem proliferation, growth regulators, rooting

1. INTRODUÇÃO



1.1. Contextualização

O ser humano sempre dependeu dos bens e os serviços oferecidos pela natureza (Lagoa & Rodrigues, 2016). À medida que as sociedades foram evoluindo, novas necessidades foram aparecendo para garantir a sua sobrevivência. Com a revolução industrial, no séc. XVIII, e, mais tarde, no séc. XX, a demanda de recursos naturais e a má gestão ambiental aumentaram consideravelmente face ao crescimento económico e social (Pereira, 2009). Neste sentido, a humanidade começou a dar os primeiros passos na tentativa de salvaguardar os recursos naturais através da construção de um modelo sustentável (Lagoa & Rodrigues, 2016).

O aumento global da produção trouxe consequências negativas, nomeadamente a erosão dos solos, diminuição das áreas florestais e a libertação de uma série de compostos agressivos para o meio ambiente, resultantes de uma agricultura intensiva sem qualquer tipo de preocupações ambientais (Canhoto, 2010). O estabelecimento de uma agricultura sustentável, visando a salvaguarda do meio ambiente e da segurança alimentar futura, é um fator primordial para o desenvolvimento da humanidade ante as mudanças climáticas e o declínio das reservas energéticas não renováveis (Whitford *et al.*, 2010). A população mundial deverá atingir 9 mil milhões de habitantes até 2050, sendo este problema particularmente importante na Ásia e em África (Canhoto, 2010).

O avanço das tecnologias voltadas para a agricultura e as indústrias tem dado um contributo inestimável para com as necessidades humanas através do fornecimento de plantas em qualidade e em quantidade (Hussain *et al.*, 2012).

A valorização de produtos naturais e ricos energeticamente, como a batata-doce, com aposta no seu investimento pode vir a resolver muitas questões ligadas à nutrição e segurança alimentar global (Kwak, 2019). É uma das culturas alimentares mais importantes e versáteis do mundo (Bovell-Benjamin, 2007), tendo um uso diversificado tanto do ponto de vista doméstico como industrial (Addae-Frimpomaah *et al.*, 2014). Esta cultura pode-se adaptar a uma ampla gama de condições ambientais e encaixa-se no sistema de agricultura que exige pouco investimentos (Addae-Frimpomaah *et al.*, 2014; Wondimu *et al.*, 2012).

1.2. Classificação e descrição

Ipomoea batatas, nome científico da batata-doce, foi primeiramente descrita e atribuída a nomenclatura binominal *Convolvulus batatas* por Lineu, em 1753. Em 1791, o naturalista Lamarck terá mudado o género para *Ipomoea* com base na morfologia do estigma e da superfície dos grãos de pólen (Hauman, 1999).

Esta espécie faz parte da família *Convolvulaceae* também conhecida como glória-de-amanhã e engloba mais de 1.800 espécies distribuídos por 50 géneros (Glimn-Lacy & Kaufman, 2006), dentro das quais se destaca o género *Ipomoea* cujas espécies maioritariamente são herbáceas anuais e perenes e encontram-se distribuídos pelas regiões tropicais (Lebot, 2010). *Ipomoea batatas* para além de ser uma planta característica das zonas tropicais é frequentemente cultivada anualmente em regiões de clima temperado em virtude do seu valor nutricional fornecido principalmente pelas suas raízes tuberosas (Glimn-Lacy & Kaufman, 2006; Silva *et al.*, 2008). Trata-se de uma dicotiledónea com caule herbáceo cujo hábito de crescimento é predominantemente prostrado, que cresce rápido e expandindo os ramos horizontalmente sob o solo (CARDI, 2010; Cusumano & Zamudio, 2013; Hauman, 1999) os quais, quando em condições favoráveis, enraízam (Jones, 1980; Lebot, 2009). O caule é cilíndrico e fino, com um diâmetro de 4-6 mm e um comprimento que pode chegar até 5 m de comprimento (Marti *et al.*, 2014; Ruiz *et al.*, 2017) possuindo vários entrenós que chegam a medir 20 cm de comprimentos (Lebot, 2010).

As suas folhas são simples, alternadas e pecioladas. O limbo varia consoante o cultivar, podendo ser arredondado, reniforme, cordado, triangular, achatado, lobulado ou quase dividido (Ruiz *et al.*, 2017). O recorte varia de acordo com a presença de lóbulos, podendo ser superficial ou muito lobado. As epidermes das folhas e do caule podem ser glabras ou pubescentes e assumir coloração que varia de verde a vermelho arroxeado consoante a quantidade de antocianinas presentes. Laticíferos estão presentes em toda a planta (Hauman, 1999; Lebot, 2010).

A batata-doce possui uma inflorescência do tipo bípara, e cada flor é constituída por 5 sépalas, 5 pétalas, 5 estames e um pistilo. As flores são hermafroditas com fecundação cruzada, geralmente feita por insetos. As pétalas fundem-se na base formando um infundíbulo, cuja coloração varia de branca a púrpura pálido nas margens e escura na base

(Ruiz *et al.*, 2017). Na base da corola encontram-se nectários que atraem insetos. (Hauman, 1999; Jones, 1980)

O fruto é uma cápsula mais ou menos esférica, que pode ser glabra ou pubescente, e que mede aproximadamente 10 mm de diâmetro. Cerca de 1-4 sementes, com 2-3 cm de comprimento, de formato irregular com coloração marrom ou preta, podem ser encontradas por fruto (Lebot, 2009).

O sistema radicular é formado por dois tipos de raízes: as raízes de reserva ou tuberosas, que têm função de reserva e as raízes absorventes, cuja função é absorver água e sais minerais do solo para a nutrição da planta (Silva *et al.*, 2008). As raízes tuberosas desenvolvem-se a partir dos nós e, com o passar do tempo, tornam-se volumosas devido à acumulação de células ricas em amido e outras reservas nos seus tecidos (Loebenstein & Thottappilly, 2009; Wilson & Lowe, 1973). Uma raiz tuberosa adulta possui uma extremidade proximal que une o caule à raiz, uma parte central e uma parte distal oposta (Cusumano & Zamudio, 2013; Marti *et al.*, 2014) e os formatos podem ser diversos, desde fusiformes, globulares ou redondos, e lisa ou rugosa à superfície. Os cultivares diferenciam-se pela cor da periderme e dos tecidos internos, bem como pela composição química e o formato, variando o tamanho numa mesma planta (Lebot, 2009). A periderme pode ser creme, amarela, laranja, marrom, vermelho ou de um roxo muito escuro e a polpa pode ser branca, creme, amarela ou laranja (Loebenstein & Thottappilly, 2009).

1.3. Ecologia e ciclo de cultivo

Todas as plantas requerem condições edafoclimáticas particulares para estimular o seu desenvolvimento e reprodução. Esta espécie desenvolve-se em altitudes que vão desde o nível do mar até cerca de 2.700 m de altitude, em sítios com temperaturas altas e forte exposição solar (Miranda *et al.*, 1989). Para melhores rendimentos requer temperaturas quentes diurnas entre 25 e 30 °C combinado com temperaturas baixas noturnas entre 15 e 20 °C (Ramirez, 1992). Nas zonas de clima quente, as raízes tuberosas possuem menor teor de amido e maior em açúcar e vice-versa nas regiões de clima fria. A cultura de batata-doce não suporta muito frio e geadas (Miranda *et al.*, 1989).

Tem maior preferência aos solos leves, soltos com boa drenagem e oxigenação com o valor do pH entre 5,6-6,7 (Marti *et al.*, 2014; Miranda *et al.*, 1989) em locais com pluviosidade média anual entre 750-1000mm, contudo sem excesso de umidade e de nutrientes no solo (Silva *et al.*, 1995).

Os rendimentos da cultura de batata-doce dependem do cultivar e das condições ambientais sendo a colheita realizada entre 90 a 240 dias. O desenvolvimento da planta pode dividir-se em 3 fases: 1) desde a plantação até ao crescimento radicular (60-120 dias), 2) fase onde ocorre a dominância apical, e 3) espessamento das raízes de reserva (Ramirez, 1992).

1.4. Origem e distribuição

Sabe-se que a batata-doce teve a sua origem na região tropical do continente Americano. Contudo, a localização geográfica e a origem botânica exata precisas são ainda motivo de debate. Os vestígios mais antigos até agora encontrados, com mais de 8.000 anos, foram localizados no vale de Chilca Canyon, no Peru e na região Maia, na América Central (Silva *et al.*, 2008; Ugent & Peterson, 1988). Outra hipótese para a sua origem baseia-se na ocorrência de uma hibridização natural entre as espécies selvagens *Ipomoea triloba* e *Ipomoea trifida*, na região compreendida entre a Península de Yucatam, no México, e a bacia do rio Orinoco na Venezuela (Austin, 1987). As espécies selvagens *Ipomoea triloba* e *Ipomoea trifida* possuem maior proximidade genética e partilham a mesma ancestralidade com a batata-doce (Austin, 1987).

Através de estudos mais recentes, com recurso a marcadores moleculares AFLPs (Amplified Fragment Length Polymorphisms) e RAPD (Random Amplified Polymorphism DNA), comprovou que a batata-doce tem a sua origem na América Central, e centros secundários de diversidade genética nas regiões entre o Peru e o Equador e as ilhas do Sudoeste do Pacífico (Gichuki *et al.*, 2003; Roullier *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2000).

Na América do Sul, *Ipomoea batatas* é comumente chamada de batata-doce, boniato, camote, apichu e kumara (Hauman, 1999; Marti *et al.*, 2014). A sua distribuição ampliou-se após sua introdução na Europa, em meados do século XV, pelo navegador Cristóvão

Colombo e, posteriormente, no século XVI, os países colonizadores, Portugal e Espanha, disseminaram o seu cultivo pelos restantes continentes (Castro & Noronha, 2018; Roullier *et al.*, 2013).

Na altura, o cultivo na Europa terá sido mais expressivo em regiões como os Açores, Madeira, Canárias, Andaluzia, Alentejo e Algarve, Apúlia e Véneto (Santos, 2018).

A produtividade desta espécie é muito variável, atingindo-se os valores mais elevados na Ásia com 18,5 ton/ha, seguindo-se Estados Unidos (16,3 ton/ha), América do Sul (12,2 ton/ha) e África (4,7 ton/ha) (Stathers *et al.*, 2018).

Na região sul de Portugal cultivava-se uma variedade bem característica chamada batata-doce de Aljezur ou Lira com Indicação Geográfica Protegida (AJAP, 2017; Glória, 2009).

1.5. Importância da cultura de batata-doce

A cultura da batata-doce ocupa o sétimo lugar a nível mundial em termos de importância, antecedido pelo trigo, arroz, milho, batata, cevada e a mandioca (Stathers *et al.*, 2018). É uma cultura de grande importância económico-social participando do suprimento de calorias e minerais na alimentação humana, principalmente das populações de baixo rendimento (Câmara *et al.*, 2017).

A batata-doce é uma importante cultura alimentar, cultivada e consumida mundialmente, e seu valor nutricional torna-a especialmente importante em países em desenvolvimento (Dewir *et al.*, 2020), sendo uma excelente fonte de energia na forma de carboidratos, que representam cerca de 30% de biomassa fresca, além de conter diversos minerais e vitaminas (Flores *et al.*, 2015). Potássio, fósforo, magnésio, cobre, e ferro, estão presentes em quantidades consideráveis, de modo que a sua inclusão na dieta alimentar é imprescindível para a promoção da saúde, uma vez que a sua utilização atua na prevenção de várias doenças tais como aparecimento de cancro, diabetes, úlceras, problemas cardíacos e ainda combate o envelhecimento precoce (Vidal *et al.*, 2018). Algumas variedades de polpa laranja possuem altos níveis de vitamina A (betacaroteno) e a sua incorporação nas dietas alimentares, principalmente das crianças vulneráveis, em África, ajuda a combater a *Xerophthalmia*, doença que ataca os olhos devido a carência da

vitamina A (Loebenstein & Thottappilly, 2009; Stathers *et al.*, 2018). A batata-doce para além do valor nutricional apresenta sabor e aspeto visual bastante agradáveis podendo ser usada diretamente na confeção de pratos à base de folhas, raízes assadas ou cozidas e doces. Outra forma de consumo é através do seu processamento em amido, doces, sorvetes, pães, bolos, massas, e fermentação para obtenção etanol (Castro & Noronha, 2018; Lebot, 2009). A maior parte da produção nos países Asiáticos destina-se a alimentação animal, principalmente suínos (Monteiro, 2007). Alguns cultivares são usados na ornamentação por apresentarem características visuais atrativas (Silva *et al.*, 1995).

1.6. Formas de propagação

Em condições naturais a batata-doce é uma espécie perene, sendo tratada como anual quando cultivada (Hauman, 1999). A propagação *in natura* dá-se por via sexuada, através de sementes, ou assexuada através da multiplicação vegetativa de rebentos das raízes tuberosas e das estacas retiradas de plantas adultas (Ramirez, 1992).

O abrolhamento das batatas ocorre frequentemente em sítios com temperaturas muito baixas embora não sendo muito sustentável, mas é uma técnica ideal para a produção de mudas e ramas para os viveiristas (AJAP, 2017; Miranda *et al.*, 1989; Silva *et al.*, 2008). Contudo, a utilização de ramas, é o método mais adequado e economicamente mais viável (Castro, 2011), e consiste no isolamento e plantio de estacas mais apicais provenientes de plantas-mãe ou de tubérculos com cerca de oito entrenós e 30 cm de comprimento, dado que possuem maior vigor vegetativo, enraízam facilmente e reúnem as melhores condições fitossanitárias (Miranda *et al.*, 1989; Silva *et al.*, 1995; Silva *et al.*, 2008). As sementes, em condições naturais, apresentam baixas taxas de germinação devido à rigidez da testa e por se tratar de uma espécie hexaplóide (Hauman, 1999), sendo utilizadas meramente em programas de melhoramento vegetal (Brune *et al.*, 2005).

A batata-doce é uma planta obtida por propagação vegetativa convencional. No entanto, as plantas produzidas por métodos vegetativos, devido à sua uniformidade genética, podem tornar-se mais vulneráveis a doenças e pragas e, principalmente, infeções por vírus (Addae-Frimpomaah *et al.*, 2014; Dewir *et al.*, 2020; Flores *et al.*, 2015; Wondimu *et al.*, 2012). As doenças virais são as que mais afetam a produção e a qualidade da batata-doce

(Wondimu *et al.*, 2012) e, de acordo com Masekesa *et al.*, 2016, as doenças virais da batata-doce causam perdas de produtividade de até 98%. A produção de material livre de patógenos é a primeira etapa do controle de doenças (El-Far, 2007).

Os métodos convencionais de propagação da batata-doce podem atualmente ser complementados com novas técnicas de clonagem que permitam uma melhor qualidade fitossanitária de forma a assegurar uma maior produtividade e uma menor utilização de produtos químicos de combate a pragas, doenças e ervas-daninhas (Silva *et al.*, 1991).

1.7. Micropropagação *in vitro*

A micropropagação surge como uma potente técnica para dar respostas aos sistemas de produção vegetal principalmente aqueles com fins comerciais.

As técnicas de micropropagação surgiram em meados do Séc. XX (Thorpe, 2007) e desde então têm sido largamente utilizadas em diversas áreas, como em estudos da biologia, agricultura, horticultura e silvicultura, e consistem em cultura de tecidos vegetais de um determinado material de tamanho reduzido em condições assépticas (Canhoto, 2010; Kumar, 2011). Isto porque as células vegetais em meio artificial têm a capacidade de regenerar e originar novas plantas por um processo conhecido por totipotência (Hussain *et al.*, 2012). Em geral, a micropropagação tem sido largamente utilizada para diversos fins, nomeadamente na reprodução de quantidades de plantas num período relativamente curto e isentas de doenças, no melhoramento vegetal, produção de metabolitos secundários e no estabelecimento de populações que se encontram ameaçadas ou em perigo de extinção (Hussain *et al.*, 2012).

A micropropagação engloba três técnicas, sendo elas a proliferação de meristemas existentes no explante inicial, a indução de organogénese e a embriogénese somática (Canhoto, 2010).

O princípio básico da micropropagação *in vitro* é estabelecer um meio de cultura com todos os componentes essenciais para o desenvolvimento de uma planta. A eficiência do protocolo de micropropagação *in vitro* é influenciada por vários fatores, especialmente a composição do meio base e o teor em reguladores de crescimento (Edwin *et al.*, 2008;

Flores et al., 2015). De acordo com as necessidades fisiológicas da planta são adicionados uma fonte carbono e nitrogênio, macronutrientes, micronutrientes, vitaminas e ou reguladores de crescimento, por vezes um agente gelificante bem como o pH ajustado para valores aceitáveis para determinado tipo de espécie (Carvalho & Medeiros, 2006; Hussain *et al.*, 2012).

Os reguladores de crescimento são substâncias sintéticas que produzem efeitos semelhantes aos produzidos pelas hormonas naturais (Carvalho & Medeiros, 2006). As auxinas e citocininas e interações entre auxina-citocinina são geralmente consideradas as mais importantes para a regulação do crescimento e desenvolvimento organizado na cultura de tecidos e órgãos vegetais (Gaspar *et al.*, 1996) e, de acordo com Hussain *et al.* (2012), estas duas hormonas em altas concentrações são capazes de produzir efeito na formação das raízes e na regeneração dos caules, respetivamente. Segundo El-Far (2007), a composição química do meio de cultura talvez seja o aspeto mais estudado da cultura de tecidos de batata-doce, pois desempenha um papel importante no sucesso da micropropagação.

A micropropagação dá-se em diferentes fases: seleção da planta mãe; iniciação da cultura (desinfecção dos explantes e transferência do explante para o meio nutritivo); multiplicação (aumento do número de propágulos), alongamento e enraizamento e aclimação (transferência para o meio *ex vitro*) (Canhoto, 2010).

1.8. Objetivos

A produção da batata-doce é bastante viável uma vez que se trata de uma espécie caracterizado pela sua rusticidade, amplamente adaptável aos ambientes, de facilidade de cultivo e tolerante ao stresse hídrico, apresentando um enorme potencial para a sua produção e obtenção de rendimentos, uma vez que não exige muitos investimentos (Miranda *et al.*, 1989). Porém, o seu cultivo via propagação vegetativa convencional nem sempre é o mais adequado embora seja a forma mais utilizada pelos produtores. A exploração de alternativas de produção de qualidade, bem como o aperfeiçoamento de técnicas de clonagem são necessários para minimizar perdas e garantir maior rendimento.

A finalidade deste trabalho foi determinar que condições de cultura *in vitro* são adequadas a propagação desta espécie e fazer um sistema de produção simples para potencializar a multiplicação rápida da batata-doce para os produtores. As técnicas empregadas foram a proliferação de meristemas axilares, enraizamento *ex vitro* de rebentos caulinares provenientes diretamente da multiplicação *in vitro*.

2. MATERIAIS E MÉTODOS



2.1. Caracterização do material vegetal

O material vegetal utilizado neste trabalho teve origem em quatro batatas-doces obtidas no supermercado. As experiências tiveram lugar no laboratório de Biotecnologia Vegetal, do Departamento das Ciências e da Vida (DCV) durante o período de Outubro de 2019 a Agosto de 2020. Os genótipos apresentavam as seguintes características: dois de casca roxa e polpa amarela (BRA1 & BRA2), um de casca vermelho-acastanhado com polpa laranja (BVL) e um de casca branca e de polpa amarela (BBA) (Fig. 1).

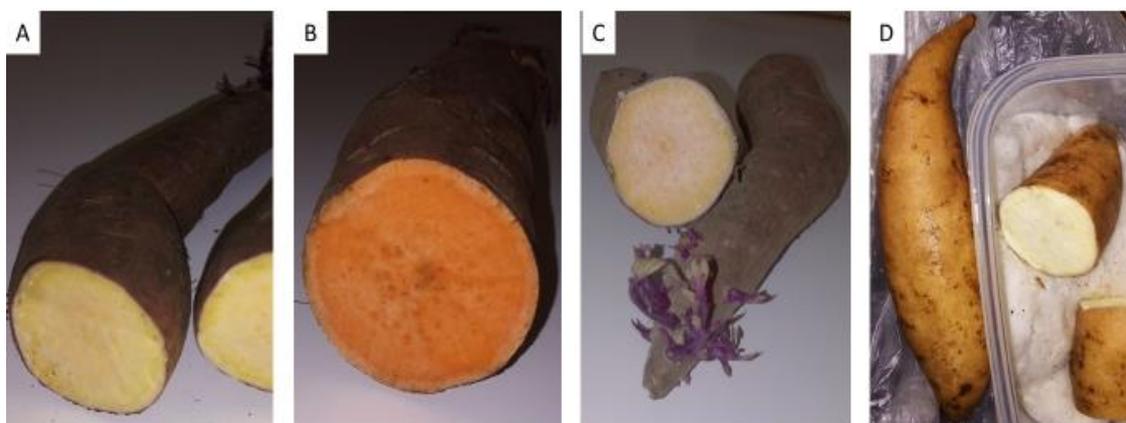


Figura 1: Batatas-doces usadas para obtenção do material vegetal dos ensaios: A-casca roxa e polpa amarela (BRA2); B- casca vermelho-acastanhado e polpa amarela (BVL); C- casca roxa e polpa amarela (BRA1) e C-casca branca e polpa amarela (BBA).

O trabalho consistiu em ensaios de proliferação de meristemas a partir de segmentos nodais, enraizamento *ex vitro* de segmentos caulinares provenientes diretamente do estabelecimento *in vitro*, e enraizamento dos rebentos caulinares provenientes da proliferação de meristemas.

Fizeram-se variar as concentrações de hormonas nas fases de cultura *in vitro*, bem como as proporções de substrato para o enraizamento visando apurar em que condições os diferentes genótipos se desenvolvem com maior vigor vegetativo.

Para a obtenção dos primeiros explantes, as batatas foram cortadas e colocadas em perlite humedecida para estimulação do crescimento vegetativo. Ao longo de cinco a seis semanas, estes foram mantidos numa câmara fitoclimática (*Fitoclima* 10000 HP, Aralab, Portugal) a 25 °C e com fotoperíodo de 16 horas de luz com intensidade de 250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e 8 horas de escuro.

2.2. Desinfecção do material vegetal

Após cerca de 5 semanas os caules obtidos dos diferentes genótipos (BRA1, BRA2, BVL e BBA) foram submetidos a tratamento assético. Para isso, foi usado um protocolo de esterilização na qual segmentos isolados com cerca de 2 cm foram lavados numa solução de água e Tween 20 (3 gotas/300 ml de H₂O), durante 10 a 15 min de modo a promover a eliminação de microrganismos e impurezas superficiais. Seguidamente o material vegetal foi submetido em fungicida Aliette Flash da Bayer 0,1% (p/v) durante 20 minutos e ulteriormente em etanol a 70% (v/v) durante 30 segundos de modo a quebrar a tensão superficial do material. Procedeu-se a uma lavagem com água bidestilada e de seguida o mesmo material foi transferido para uma solução de hipoclorito de cálcio (Sigma-Aldrich) a 5% (p/v) e 3 gotas Tween 20, sendo colocado em agitação. Este processo foi finalizado em condições asséticas, dentro da câmara de fluxo de ar laminar durante 15 minutos, após os quais se procedeu a 3 lavagens com água esterilizada e bidestilada de modo a retirar os excessos dos desinfetantes impregnados no material vegetal.

2.3. Estabelecimento *in vitro* dos genótipos

2.3.1. Proliferação de meristemas axilares

As plântulas foram multiplicadas através de segmentos nodais com 0,5 cm de comprimento em meio MS (Murashige & Skoog, 1962) suplementado com 3% sacarose 7g L⁻¹ de agar, com pH ajustado a 5,7. Foram distribuídos 12,5 ml de meio por cada tubo de ensaio e rolhados com algodão cardado envolvidos em gaze. De seguida foram ao autoclave a 120 °C e 1,1atm de pressão durante 20 minutos.

Os ensaios de proliferação de meristemas axilares consistiram em determinar quais das condições de cultivo favoreciam a melhor propagação das batatas-doces. Os rebentos provenientes da fase de estabelecimento *in vitro* dos genótipos “BRA1”, “BRA2”, “BRL” e “BBA” foram usadas neste primeiro ensaio.

Foram estabelecidos cinco tratamentos que diferiam entre si pela concentração de BAP (benzilaminopurina) que foi adicionada ao meio de cultura (MS) a saber, MS: a) 0 mg L⁻¹; b) 0,1 mg L⁻¹; c) 0,2 mg L⁻¹; d) 0,5 mg L⁻¹; e d) 1 mg L⁻¹.

Os explantes estabelecidos foram mantidos numa câmara fitoclimática a 25 °C com fotoperíodo de 16h luz/8h escuro sob uma intensidade luminosa de 15-20 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Para o estabelecimento foram utilizados os segmentos nodais e os ápices, e no final de duas subculturas, foram avaliadas as taxas de contaminação e oxidação dos explantes *in vitro* face aos quatro genótipos.

Relativamente aos ensaios de proliferação de meristemas com diferentes concentrações da hormona BAP, ao final de 4 semanas foram avaliados os seguintes parâmetros: a) o número de segmentos nodais por plântulas; b) o comprimento do caule (cm); c) o número de folhas; e d) o número de raízes. Foi calculada a taxa de propagação, que corresponde ao número de segmentos nodais produzidos por planta num intervalo de tempo (Flores *et al.*, 2015).

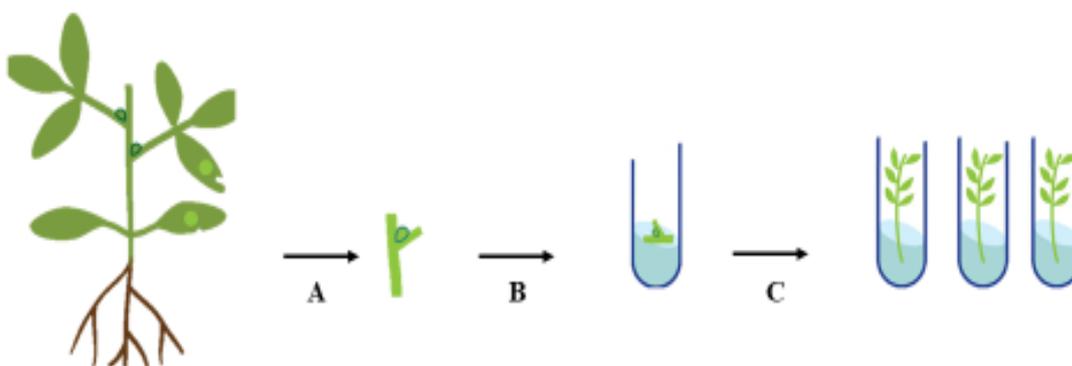


Figura 2: Representação esquemática do estabelecimento *in vitro* da batata-doce: A) segmento nodal após assepsia; B) estabelecimento *in vitro* em meio MS; C) Multiplicação de segmentos nodais em diferentes concentrações de BAP.

(Adaptado de: <https://plantnucleus.com/best-practices/collecting-and-maintaining-exceptional-species-tissue-culture-and-cryopreservation>)

2.4. Enraizamento/aclimação

Foram usados dois ensaios com rebentos caulinares provenientes da proliferação de meristemas:

- a. Plântulas com quatro semanas *in vitro* em substratos obtidos do estabelecimento com cerca de 0.5 cm de comprimento em meio de cultura MS isentos de reguladores de crescimento. Os substratos consistiram em duas misturas nas proporções 1:1; turfa

com perlite e turfa com vermiculite. Em cada substrato foram usadas 8 plântulas. O objetivo deste ensaio era testar a eficiência da micropropagação de clones da batata-doce em diferentes substratos sem passar pelo uso de reguladores de crescimento *in vitro*.

Após quatro semanas de cultura as plantas de cada genótipo foram avaliadas tendo em conta as taxas de sobrevivência: a) número de segmentos nodais, b) número de raízes e c) comprimento da maior raiz em função do tipo de substrato em que estiveram expostas.

b. As plântulas provenientes do ensaio de proliferação de meristemas com BAP. O processo de enraizamento ocorreu em duas fases:

i. Indução

Para a indução, foi preparado meios de cultura MS com 1,5% (p/v) de sacarose e a concentração de sais minerais do meio de cultura MS inicialmente utilizado reduzida a metade. O meio base foi suplementado com a auxina ácido 3-indolbutírico (IBA): a) 0 mg L⁻¹; b) 0,5 mg L⁻¹; e c) 1,0 mg L⁻¹). As plântulas de cada tratamento na multiplicação com BAP (n= 15) foram divididas em três grupos sendo que em cada meio foram inoculadas cinco plântulas. Deste modo cada tratamento foi estabelecido para cada uma das cinco plântulas. As plantas permaneceram na câmara fitoclimática por uma semana com luz e fotoperíodo controlado nas mesmas condições anteriormente citadas.

ii. Aclimação e alongamento radicular

A aclimação das plântulas completas ocorreu após 5 semanas de cultivo *in vitro*, sendo transferidas para tabuleiros de alvéolos contendo substrato comercial na proporção 2:1 de turfa com perlite e vermiculite respetivamente.

Em ambos os ensaios de aclimação, as plântulas foram mantidas em câmara fitoclimática (*Fitoclima 10000 HP*) a 25 °C com fotoperíodo de 16 horas de luz branca e intensidade de 250 μmol m⁻² s⁻¹ e 8 horas de escuro. As plântulas foram regadas duas vezes por semana com água. Adicionou-se à água uma solução Knop como fonte de nutrientes para as plantas (Fig. 3).

Esta fase teve a duração de 5 semanas e no final foram avaliadas: a) taxas de sobrevivência, b) comprimento do caule, c) número de raízes, d) comprimento da maior raiz, e c) biomassa seca.

A biomassa seca foi obtida através da massa seca da parte aérea e parte radicular após 7 dias em estufa a 40 °C. As taxas de enraizamento foram obtidas através do número de plântulas obtidos em função dos rebentos caulinares que foram enraizados inicialmente.

Nos primeiros dias de cultivo, os tabuleiros foram cobertos com uma campânula com filtros de ar como forma de ajudar no ajuste das diferenças entre cultivo *in vitro* e *ex vitro*, nomeadamente a humidade e no impacte das plântulas ao meio externo. Após 5 dias as campânulas foram removidas e ficaram expostas as novas condições do ambiente.

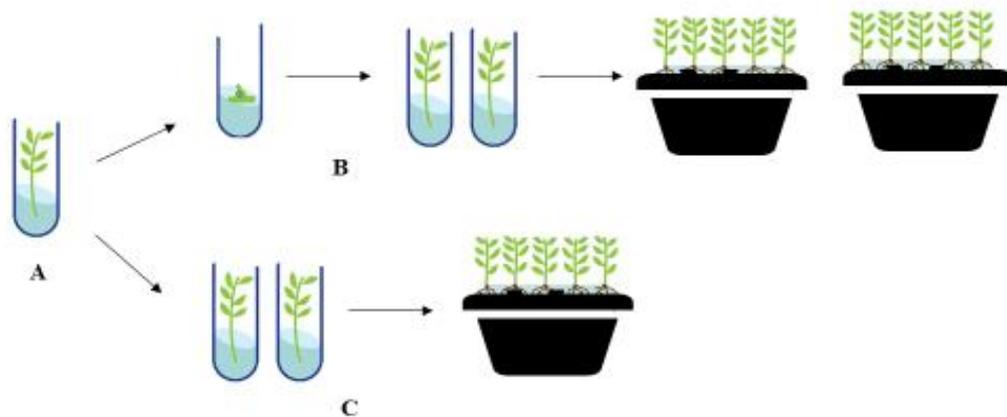


Figura 3: Representação esquemática do processo de obtenção de plântulas para o enraizamento: A) explante inicial; B) segmento nodal usado na multiplicação isento de regulador de crescimento e posteriormente enraizado e aclimatado em diferentes substratos; C) rebentos caulinares em diferentes concentrações de IBA provenientes da fase de multiplicação com BAP e posteriormente enraizados e aclimatados em substratos.

(Adaptado de: <https://plantnucleus.com/best-practices/collecting-and-maintaining-exceptional-species-tissue-culture-and-cryopreservation>)

2.5. Análise dos dados

Para o tratamento estatístico dos resultados, foi utilizado o *software IBM SPSS Statistics 24*, tendo-se procedido a uma comparação de médias através do teste de Tukey, para um nível de significância de $p=0,05$.

3. RESULTADOS



3.1. Estabelecimento *in vitro* dos genótipos

Em geral, foi observado um ligeiro desenvolvimento dos rebentos tanto a nível da parte aérea como na parte radicular, tendo alguns explantes iniciado o processo de enraizamento até 2 dias após a inoculação em meio de cultura. Após três semanas os explantes estavam bem enraizados. Observou-se que, os segmentos mais velhos e com maiores diâmetros, foram os que apresentaram um melhor enraizamento bem como raízes mais compridas.

Inicialmente foram inoculados cerca de 50 explantes de cada genótipo. Ao longo dos primeiros quatro meses de estabelecimento *in vitro*, teve-se particular atenção aos explantes contaminados e oxidados. Assim, após duas subculturas, as percentagens de contaminações foram registadas, tendo-se obtido os seguintes valores: 19% (BRA1), 14% (BRA2), 11% (BVL) e 11% (BBA). No genótipo BVL, registou-se um número significativo de explantes oxidados (7%) logo após serem estabelecidos.

Em função do número de explantes estabelecido por cada genótipo, procedeu-se à repicagem, que ocorreu duas ou três vezes ao longo de cada quatro semanas (Fig. 4). Foi observada uma diminuição geral durante as repicagens do comprimento do caule, pelo que nos ensaios de proliferação foram usados segmentos nodais com aproximadamente 0,5 cm de comprimento.



Figura 4: Batatas-doces após quatro semanas de subcultura a partir de um único segmento nodal com 1,0 cm de comprimento: A-BRA2; B-BBA; C-BVL e D- BRA1.

3.1.1. Proliferação de Meristemas axilares

A proliferação de meristemas de segmentos nodais foi a técnica que teve lugar neste ensaio.

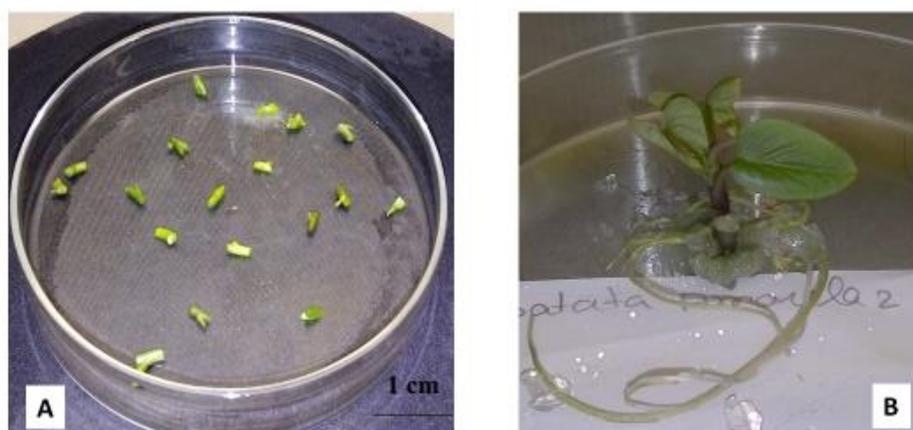


Figura 5: Proliferação de meristemas axilares a partir de segmentos nodais com 0,5 cm de comprimentos (A) e regeneração de uma planta adulta ao fim de quatro semanas *in vitro* (B).

Foram realizados ensaios de proliferação de meristemas provenientes do estabelecimento *in vitro* dos quatro genótipos (BRA1; BRA2; BBA; BVL), testados em meios de cultura contendo diferentes concentrações de BAP (0; 0,1; 0,2; 0,5 e 1,0 mg l⁻¹). O objetivo foi

avaliar quais os tratamentos que favoreciam melhor o desenvolvimento vegetativo das batatas. Em cada tratamento foram avaliados, o número de rebentos originados a partir da base dos explantes, número de entrenós e folhas, número de raízes e o comprimento da maior raiz. A presença de calos e cloroses foliares também foram registados. No total foram inoculados 16 explantes em cada tratamento.

O número de rebentos por explantes manteve-se igual independentemente dos tratamentos, ou seja, cada segmento nodal isolado originou apenas um rebento. Os outros parâmetros foram avaliados e os resultados apresentados na tabela 1.

Tabela 1: Efeito da BAP na cultura *in vitro* de segmentos nodais de batata-doce. NSN - número de segmentos nodais, CC - comprimento do caule, NF - número de folhas, NR - número de raízes e CMR comprimento da maior raiz CMR.

Genótipos	Parâmetros	Concentração de BAP (mg L ⁻¹)				
		Avaliados	0	0,1	0,2	0,5
BRAI + BRA2	NSN	5,6±1,0 ^a	5,7±2,4 ^a	5,9±2,4 ^a	5,0±1,9 ^a	5,3±2,2 ^a
	CC (mm)	0,9±0,6 ^a	1,0±1,0 ^a	1,1±1,0 ^a	0,7±0,7 ^a	1,1±1,3 ^a
	NF	5,1±1,3 ^a	6,1±2,3 ^a	5,7±2,7 ^a	4,9±1,6 ^a	5,6±2,5 ^a
	NR	3,4±2,1 ^b	5,3±1,7 ^a	5,9±1,6 ^a	5,2±2,2 ^a	5,2±2,0 ^a
	CMR (mm)	6,9±2,7 ^a	3,5±2,1 ^{bc}	5,3±3,2 ^{ab}	4,3±2,1 ^{bc}	2,8±2,9 ^c
BVL	NSN	5,5±3,4 ^a	3,2±1,5 ^a	5,0±1,0 ^a	3,3±1,6 ^a	3,3±2,2 ^a
	CC (mm)	1,1±0,8 ^a	0,4±0,5 ^b	0,4±0,1 ^b	0,4±0,4 ^b	0,3±0,2 ^b
	NF	7,2±4,0 ^a	3,7±1,4 ^b	5,0±1,0 ^b	3,5±1,6 ^{ab}	3,7±2,4 ^b
	NR	1,7±1,5 ^{bc}	1,7±1,9 ^{bc}	4,8±1,2 ^a	3,3±3,5 ^{ab}	0,0±0,0 ^c
	CMR (mm)	3,4±2,8 ^{ab}	2,3±3,3 ^{ab}	4,2±2,1 ^{ab}	5,2±6,1 ^a	0,0±0,0 ^b
BBA	NSN	3,7±1,6 ^a	3,0±3,3 ^{ab}	3,5±2,3 ^a	0,9±0,9 ^b	2,5±1,4 ^{ab}
	CC (mm)	0,7±0,6 ^a	0,4±0,5 ^{ab}	0,6±0,4 ^{ab}	0,1±0,1 ^b	0,5±0,2 ^{ab}
	NF	3,9±1,7 ^a	2,3±2,1 ^{ab}	9,6±2,1 ^a	1,4±1,4 ^b	3,8±1,0 ^a
	NR	2,3±1,7 ^a	1,6±1,0 ^{ab}	1,8±0,9 ^{ab}	1,3±1,3 ^{ab}	0,6±1,3 ^b
	CMR (mm)	1,8±2,4 ^{ab}	3,4±4,9 ^{ab}	4,5±2,6 ^a	0,4±0,2 ^b	0,3±1,3 ^b

Os valores das médias e desvios padrões seguidas da mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey com o nível de significância de p=0,05.

A presença do BAP ao meio MS induziu a formação de calos nas plântulas, a exceção do meio com $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP do genótipo BVL, na qual não regenerou nenhuma raiz. Outro facto observado, foi amarelecimento das folhas nos genótipos BRA1 e BRA2 ao final das quatro semanas.

Em geral, após quatro semanas de cultura, o número de nós aumentou face aos tratamentos em ambos genótipos. As maiores taxas de propagação foram obtidas nos genótipos BRA1 com BRA2.

A análise estatística dos resultados da batata BRA1 e BRA2 revelou que a presença de BAP no meio de cultura aumentou significativamente ($p \leq 0,05$) o número de raízes por plântula, porém foi desfavorável ao crescimento das raízes sendo que os maiores comprimentos de raízes foram observados na ausência de BAP e os menores no tratamento em que a concentração deste fitoregulador foi maior (Tabela 1). Não houve diferenças significativas para os demais parâmetros avaliados. Em face destes resultados, decidiu-se comparar a influência da concentração de BAP sob cada parâmetro avaliado nas plântulas de cada uma das duas batatas BRA1 e BRA2 e os resultados foram claros e mostraram que, em geral, as plântulas das batata-doce (BRA1) eram significativamente diferentes ($p \leq 0,05$) mais vigorosas por via vegetativa e radicular, em crescimento e desenvolvimento, no meio suplementado com BAP do que as plântulas do genótipo BRA2 (Tabela 2).

Na batata-doce de polpa laranja (BVL), não foram registadas diferenças significativas no número segmentos nodais em nenhum dos tratamentos, contudo notou-se que a presença do BAP influenciou negativamente a dimensão das plântulas comparativamente com meio sem BAP. Contudo foram nos meios com BAP, as taxas de enraizamento foram mais elevadas sendo a maior média no tratamento com $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ e o maior comprimento no meio com ($0,5 \text{ mg L}^{-1}$) ($p < 0,05$).

No genótipo BBA a semelhança do genótipo BVL, nenhuma das concentrações de BAP foram favoráveis ao crescimento do caule dos rebentos, no entanto, as maiores taxas de propagação ($p \leq 0,05$) determinada pelo número de segmentos nodais foram obtidas no meio sem hormona e com $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP. As plântulas com maior número de folhas foram observadas nos tratamentos com ausência de BAP e naqueles que foram suplementados com as concentrações de $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ e $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP ($p \leq 0,05$). A nível da

parte radicular, observou-se que a ausência de BAP no meio MS foi mais favorável para as taxas de enraizamento, contudo no meio com 0,2 mg L⁻¹ de BAP é que foram registradas as maiores dimensões (p≤0,05).

Tabela 2: Comparação do efeito do BAP na cultura *in vitro* de segmentos nodais dos genótipos BRA1 e BRA2: NSN - número de segmentos nodais, CC - comprimento do caule, NF - número de folhas, NR - número de raízes e CMR comprimento da maior raiz CMR.

Parâmetros Avaliados	Concentração BAP		
	(mg L ⁻¹)		
NSN	0	5,4±1,3 ^a	5,8±0,6 ^a
	0,1	7,5±1,3 ^a	3,9±0,9 ^b
	0,2	7,7±1,8 ^a	4,0±0,9 ^b
	0,5	6,5±1,2 ^a	3,4±1,2 ^b
	1,0	6,4±2,4 ^a	4,1±1,4 ^b
	CC	0	0,8±0,4 ^a
0,1		1,7±0,9 ^a	0,6±0,2 ^b
0,2		1,7±1,1 ^a	0,7±0,3 ^b
0,5		1,0±0,8 ^a	0,5±0,2 ^b
1,0		1,7±1,5 ^a	0,5±0,3 ^b
NF	0	5,6±1,1 ^a	4,6±1,3 ^a
	0,1	8,1±1,2 ^a	4,0±0,8 ^b
	0,2	7,0±3,0 ^a	4,3±1,3 ^b
	0,5	5,9±1,4 ^a	3,9±1,0 ^b
	1,0	7,4±2,2 ^a	3,8±1,2 ^b
NR	0	3,8±2,0 ^a	3,0±2,1 ^a
	0,1	5,5±2,0 ^a	5,1±1,4 ^a
	0,2	6,1±1,7 ^a	5,6±1,6 ^a
	0,5	5,5±2,4 ^a	4,9±2,2 ^a
	1,0	6,4±1,8 ^a	4,0±1,3 ^b
CMR	0	7,8±3,1 ^a	6,0±2,1 ^a
	0,1	3,9±2,4 ^a	3,2±1,8 ^a
	0,2	7,4±3,1 ^a	3,2±1,4 ^b
	0,5	4,0±2,5 ^a	4,6±1,6 ^a
	1,0	3,2±4,1 ^a	2,5±1,0 ^a

Os valores das médias e desvios padrões seguidas da mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey com o nível de significância $p=0,05$.

Da mesma forma, os resultados na Tabela 1, quando analisados separadamente em relação as plântulas de cada batata, também são diferentes (Tabela 3). Naturalmente, um dos motivos para a existência dessas diferenças está relacionado ao tamanho da amostra ($n=20$ vs. $n=10$), mas deve-se destacar que além de haver diferenças mais significativas entre os parâmetros avaliados, essas diferenças não são consistentes entre o material vegetal de cada batata (BRA1 e BRA2 – Tabela 3). Na batata BRA2, o número de entrenós foi significativamente ($p\leq 0,05$) maior na ausência de BAP, enquanto que na batata BRA1 o oposto foi verificado e na ausência de BAP o número de entrenós foi significativamente menor.

Tabela 3: Comparação do efeito do BAP na cultura *in vitro* de segmentos nodais de batata-doce. NSN - número de segmentos nodais, CC - comprimento do caule, NF - número de folhas, NR - número de raízes e CMR comprimento da maior raiz.

Genótipos	Parâmetros avaliados	Concentração de BAP (mg L^{-1})				
		0	0,1	0,2	0,5	1,0
BRA1	NSN	5,4±1,3 ^b	7,5±1,4 ^a	7,7±1,8 ^a	6,5±1,2 ^{ab}	6,4±2,4 ^{ab}
	CC (mm)	0,8±0,4 ^a	1,7±0,9 ^a	1,7±1,1 ^a	1,0±0,8 ^a	1,7±1,5 ^a
	NF	5,6±1,1 ^b	8,1±1,2 ^a	7,0±3,0 ^{ab}	5,9±1,4 ^{ab}	7,4±2,2 ^{ab}
	NR	3,8±2,0 ^b	5,5±2,0 ^{ab}	6,1±1,7 ^{ab}	5,5±2,4 ^{ab}	6,4±1,8 ^a
	CMR (mm)	7,8±3,1 ^a	3,9±2,4 ^{bc}	7,4±3,1 ^{ab}	4,0±2,5 ^{bc}	3,2±4,1 ^c
BRA2	NSN	5,8±0,6 ^a	3,9±0,9 ^b	4,0±0,9 ^b	3,4±1,2 ^b	4,1±1,4 ^b
	CC (mm)	1,1±0,8 ^a	0,4±0,2 ^b	0,6±0,1 ^b	0,4±0,4 ^b	0,3±0,2 ^b
	NF	4,6±1,3 ^a	4,0±0,8 ^a	4,3±1,3 ^a	3,9±1,0 ^a	3,8±1,2 ^a
	NR	3,0±2,1 ^b	5,1±1,4 ^{ab}	5,6±1,6 ^a	4,9±2,2 ^{ab}	4,0±1,3 ^{ab}
	CMR (mm)	6,0±2,1 ^a	3,2±1,8 ^{bc}	3,2±1,4 ^{bc}	4,6±1,6 ^{ab}	2,5±1,0 ^c

Os valores das médias e desvios padrões seguidas da mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey com o nível de significância de $p=0,05$.

Não se verificaram diferenças significativas ($p \leq 0,05$) no comprimento do caule das plântulas da batata BRA1, mas este foi significativamente maior no tratamento sem BAP nas plântulas da batata BRA2. Em relação ao número de folhas não houve diferenças significativas entre o material vegetal da batata BRA2, mas curiosamente, no tratamento com menor concentração de BAP ($0,1 \text{ mg L}^{-1}$), o número de folhas por plântulas foi significativamente superior a tratamentos de plântulas sem BAP da batata BRA2. O comprimento foi favorecido pela ausência de BAP em ambos os casos (BRA1 e BRA2) e coincide com os resultados na tabela 1, mas no que diz respeito ao número de raízes, estes existem de forma significativa ($p \leq 0,05$) em quantidade superior no tratamento com $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ e em quantidade significativamente menor no tratamento sem BAP, para as plântulas da batata BRA1, porém, para as plântulas da batata BRA2, foi no tratamento com $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ que o número de raízes foi significativamente maior em relação a ausência de BAP (Tabela 3).

3.2. Enraizamento/aclimação de rebentos caulinares provenientes da proliferação de meristemas sem BAP

O objetivo deste ensaio foi testar a sobrevivência de clones de batata-doce desde a fase de micropropagação, sem passar pelo uso de reguladores de crescimento *in vitro*, até ao enraizamento *ex vitro*. Este ensaio baseou-se no enraizamento de rebentos caulinares obtidos diretamente da proliferação de meristemas em dois tipos de substratos: turfa com perlite e turfa com vermiculite. Os resultados foram obtidos após quatro semanas de cultivo, conforme se evidencia na tabela 4. O ensaio foi feito com ($n = 8$) plântulas em cada substrato.

No final do ensaio obteve-se cerca de 100% da sobrevivência das plântulas enraizadas das diferentes batatas (Fig. 5). Não foram registadas diferenças significativas ($p \leq 0,05$) nos ensaios, tanto na parte aérea como na parte radicular perante os dois tipos de substratos (Tabela 4).

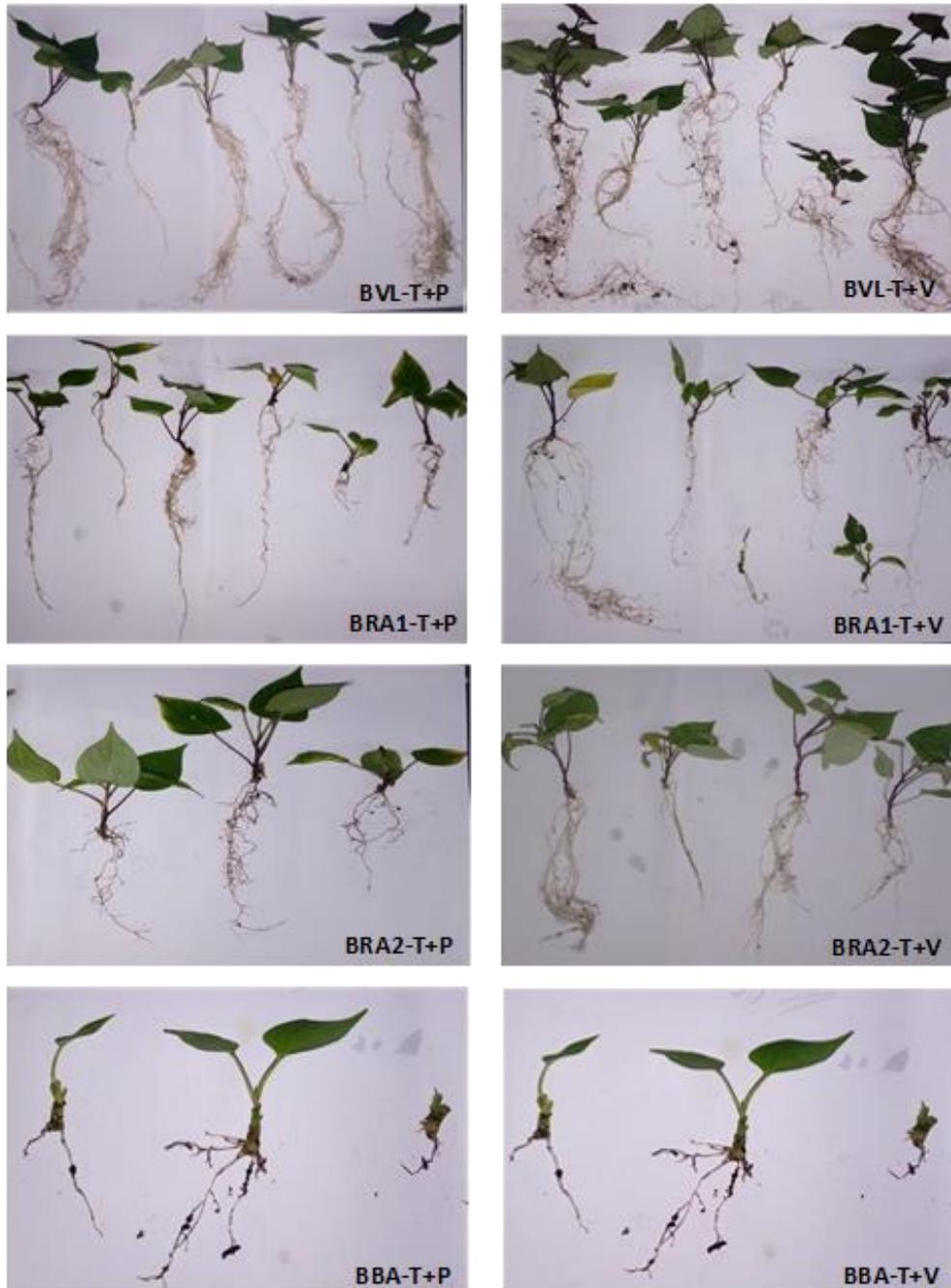


Figura 6: Plântulas após quatro semanas de aclimação em diferentes substratos: T+P-Turfa com Perlite e T+V-Turfa com Vermiculite.

Relativamente à tabela 4, o comprimento médio do comprimento e o número de raízes BRA2 foram superiores na vermiculite comparativamente com a perlite, contudo no substrato contendo perlite é que foi possível obter maior número de segmentos nodais e maior comprimento das raízes. No genótipo BRA2, o valor das variáveis (comprimento do caule, número de segmentos nodais e número de raízes) perante às plântulas em

vermiculite são mais elevados, contudo as raízes tiveram menor dimensões comparadas com as plântulas em perlite. Os rebentos caulinares das batatas BRA1 e BRA2 são extraordinários, possuem muitos nós por comprimento comparativamente com os rebentos caulinares da batata BVL o que sugere que a taxa de propagação seja superior nestes dois genótipos.

Tabela 4: Efeito dos diferentes substratos no enraizamento dos genótipos BRA2, BRA1, BVL e BBA: comprimento do caule (CC), número de nós (NN), número de raízes (NR) e comprimento da maior raiz (CMR).

Genótipos	Parâmetros	Substratos	
		Perlite	Vermiculite
BRA2	CC (mm)	3,0±2,4 ^a	4,0±5,3 ^a
	NSN	9,0±5,7 ^a	7,1±7,6 ^a
	NR	4,3±4,6 ^a	2,5±3,2 ^a
	CMR (mm)	2,5±3,2 ^a	8,2±9,2 ^a
BRA1	CC (mm)	1,8±1,3 ^a	2,4±1,9 ^a
	NSN	8,0±5,4 ^a	8,6±5,6 ^a
	NR	4,0±2,2 ^a	5,6±4,6 ^a
	CMR (mm)	19,8±8,2 ^a	10,5±9,7 ^a
BVL	CC (mm)	9,8±4,5 ^a	10,0±6,8 ^a
	NSN	4,0±1,7 ^a	3,6±3,2 ^a
	NR	2,5±2,1 ^a	2,8±2,1 ^a
	CMR (mm)	21,8±12,4 ^a	17,7±14,3 ^a
BBA	CC (mm)	1,8±2,5 ^a	4,6±6,4 ^a
	NSN	1,6±3,1 ^a	2,5±3,8 ^a
	NR	1,3±2,4 ^a	3,1±4,8 ^a
	CMR (mm)	1,2±1,8 ^a	6,3±9,4 ^a

Os valores das médias e desvios padrões seguidas da mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey com o nível de significância de p=0,05.

As plântulas da batata BVL não se comportaram de forma que pudesse ter uma conclusão mais objetiva. As plântulas do genótipo BVL é que tiveram maior comprimento e em

vermiculite, e também maior comprimento das raízes, em perlite. Em geral, as plântulas em vermiculite é que tiveram maiores comprimentos da parte aérea.

No genótipo BBA, conclui-se que a vermiculite favoreceu os melhores resultados, isto constatado em todas as variáveis. A taxa de propagação da batata BBA é, no entanto, inferior em relação às restantes batatas.

3.3.Enraizamento/ aclimação de rebentos caulinares provenientes da proliferação de meristemas com BAP

As plântulas de cada tratamento na multiplicação com BAP (n= 15) foram subdivididos em três grupos nesta nova etapa, sendo que em cada meio constaram-se 5 plântulas. Em ambos os rebentos caulinares inicialmente possuíam em média cerca de 3cm. A cada genótipo foi avaliado individualmente, consoante os tratamentos na proliferação de meristemas com o BAP (Tabelas 5). A finalidade deste ensaio foi testar as melhores condições de desenvolvimento dos genótipos por meio de um pré-enraizamento em diferentes concentrações do IBA.

Tabela 5: Taxas de sobrevivência das plântulas após a aclimação das plântulas em substratos.

Genótipos	IBA (mg L ⁻¹)	Taxas de Sobrevivência (%)				
		0	0,1	0,2	0,5	1,0
BRA2	0	100,00	60,00	60,00	60,00	100,00
	0,5	100,00	80,00	80,00	100,00	00,00
	1,0	40,00	10,00	60,00	40,00	00,00
BRA1	0	100,00	80,00	80,00	80,00	100,00
	0,5	80,00	10,00	80,00	80,00	60,00
	1,0	100,00	40,00	80,00	40,00	80,00
BVL	0	100,00	100,00	40,00	60,00	60,00
	0,5	40,00	40,00	10,00	80,00	10,00
	1,0	10,00	40,00	40,00	60,00	10,00
BBA	0	40,00	100,00	100,00	10,00	00,00
	0,5	40,00	40,00	60,00	00,00	80,00
	1,0	40,00	0,00	40,00	00,00	00,00

Foi observado a presença de cloroses nos caules das plântulas após uma semana de cultura *in vitro*. Neste sentido, o ensaio ficou um pouco inviabilizado dada a alta taxa de mortalidade registada após a aclimação. Contudo observa-se que os genótipos BRA1 e BRA2 foram os que tiveram as maiores taxas de sobrevivência comparativamente com o genótipo BBL e BBA.



Figura 7: Plantas adultas após cinco semanas de aclimação de plântulas enraizadas *in vitro* com concentrações diferentes de IBA.

A análise estatística dos resultados do genótipo BRA1 revelou que a presença do IBA no meio de cultura não influenciou significativamente ($p \leq 0,05$) os parâmetros avaliados, à exceção do número de raízes das plântulas inicialmente tratados com $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP. Neste tratamento, a média do número das raízes não foi influenciado com a presença do IBA (Tabela 6).

Tabela 6: Aclimação de plântulas do genótipo BRA1: CC-comprimento do caule, NR- número de raízes, CMR-comprimento da maior raiz, MSR-massa seca da raiz e MSPA- massa seca da parte aérea.

Genótipo	BAP (mg/ L ⁻¹)	Parâmetros	Concentração IBA (mg/ L ⁻¹)		
			Avaliados	0	1,5
BRA1	0	CC (mm)	4,8±2,5 ^a	3,0±2,1 ^a	4,2±3,0 ^a
		NR	5,0±3,1 ^a	4,8±6,5 ^a	5,6±2,9 ^a
		CMR (mm)	14,5±8,3 ^a	6,4±7,5 ^a	9,0±4,5 ^a
		MSR (mg)	12,9±7,7 ^a	6,7±9,1 ^a	10,3±5,9 ^a
		MSPA (mg)	61,2±32,4 ^a	32,2±42,4 ^a	35,9±20,6 ^a
	0,1	CC (mm)	4,3±3,8 ^a	7,0±4,4 ^a	4,4±6,1 ^a
		NR	6,8±5,3 ^a	6,8±3,7 ^a	0,8±1,3 ^a
		CMR (mm)	16,2±17,1 ^a	13,6±7,2 ^a	1,8±3,0 ^a
		MSR (mg)	18,3±21,1 ^a	16,6±11,5 ^a	4,0±6,8 ^a
		MSPA (mg)	68,8±21,1 ^a	75,5±11,5 ^a	13,4±6,8 ^a
	0,2	CC (mm)	5,2±5,4 ^a	4,1±3,6 ^a	2,6±1,5 ^a
		NR	7,0±5,5 ^a	6,6±4,7 ^a	3,6±2,9 ^a
		CMR (mm)	10,1±6,7 ^a	11,6±8,2 ^a	4,7±5,3 ^a
		MSR (mg)	11,2±14,8 ^a	11,3±9,4 ^a	3,7±2,4 ^a
		MSPA (mg)	73,6±98,6 ^a	54,4±59,4 ^a	17,6±20,0 ^a
	0,5	CC (mm)	6,2±4,9 ^a	3,5±2,7 ^a	0,8±1,1 ^a
		NR	7,8±5,4 ^a	4,2±2,7 ^{ab}	1,2±1,8 ^b
		CMR (mm)	22,6±20,4 ^a	12,0±15,3 ^a	2,0±3,0 ^a
		MSR (mg)	18,1±14,4 ^a	15,7±14,4 ^a	2,3±3,2 ^a
		MSPA (mg)	87,9±105,2 ^a	39,8±30,0 ^a	21,7±30,7 ^a
1,0	CC (mm)	4,5±3,0 ^a	1,3±2,2 ^a	6,1±10,0 ^a	
	NR	6,8±3,1 ^a	1,8±2,7 ^a	4,0±5,8 ^a	
	CMR (mm)	16,8±12,3 ^a	2,8±4,4 ^a	16,3±25,8 ^a	
	MSR (mg)	14,9±6,0 ^a	1,8±2,4 ^a	23,6±43,9 ^a	
	MSPA (mg)	88,5±57,4 ^a	18,2±34,0 ^a	54,7±56,8 ^a	

Os valores das médias e desvios padrões seguidas da mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey com o nível de significância (p=0,05).

A situação foi quase que idêntica no genótipo BRA2, à exceção das plântulas submetidas ao tratamento com BAP ($0,2 \text{ mg L}^{-1}$) e posteriormente em IBA, a única onde se registaram diferenças significativas ($p \leq 0,05$) (Tabela 7). As maiores influências do IBA sobre o comprimento do caule, comprimento da maior raiz e na massa seca da parte aérea foram na concentração entre 0 e $1,0 \text{ mg L}^{-1}$, no entanto a média da massa seca da raiz não sofreu efeito.

Em relação aos clones do genótipo BVL não registou diferenças significativas ($p \leq 0,05$) nos parâmetros avaliados à exceção de um único tratamento com $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de IBA resultante do meio MS com $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP, conforme verificado na Tabela 8, no qual obteve maiores resultados na quer à nível da parte aérea como da parte radicular dos clones.

Relativamente ao genótipo BBA, foram registadas diferenças significativas nos tratamentos suplementados com 0,1 e $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP conforme evidenciado na Tabela 9. Devido à ocorrência de altas taxas de mortalidade como consequência de necroses no material vegetal *in vitro*, os resultados da aclimação foram inconclusivos.

Tabela 7: Aclimação de plântulas do genótipo BRA2: CC-comprimento do caule, NR- número de raízes, CMR-comprimento da maior raiz, MSR-massa seca da raiz e MSPA- massa seca da parte aérea.

Genótipo	BAP (mg/ L ⁻¹)	Parâmetros	Concentração IBA (mg L ⁻¹)		
			Avaliados	0	0,5
BRA2	0	CC (mm)	2,9±1,5 ^a	2,5±0,5 ^a	3,0±2,9 ^a
		NR	6,2±1,8 ^a	4,2±2,8 ^a	3,2±1,9 ^a
		CMR (mm)	14,4±11,3 ^a	1,8±1,6 ^a	12,1±7,3 ^a
		MSR (mg)	3,8±1,7 ^a	4,1±2,5 ^a	3,4±2,5 ^a
		MSPA (mg)	21,0±18,2 ^a	9,7±2,7 ^a	23,8±29,6 ^a
	0,1	CC (mm)	3,5±4,4 ^a	6,8±7,9 ^a	3,7±2,7 ^a
		NR	6,0±6,4 ^a	5,8±3,9 ^a	8,8±4,0 ^a
		CMR (mm)	9,5±13,4 ^a	15,9±12,7 ^a	17,9±20,4 ^a
		MSR (mg)	4,0±3,9 ^a	10,9±6,7 ^a	10,0±1,5 ^a
		MSPA (mg)	24,2±37,2 ^a	74,0±108,8 ^a	28,9±25,5 ^a
	0,2	CC (mm)	0,7±0,6 ^b	8,0±4,5 ^a	1,8±4,5 ^b
		NR	2,2±2,9 ^a	7,6±3,0 ^a	5,2±4,1 ^a
		CMR (mm)	0,9±0,9 ^b	8,2±2,3 ^a	2,1±5,4 ^b
		MSR (mg)	12,1±25,8 ^a	70,4±33,6 ^a	55,6±47,7 ^a
		MSPA (mg)	6,5±7,4 ^b	64,9±44,2 ^a	13,4±23,8 ^b
	0,5	CC (mm)	2,9±4,1 ^a	3,6±7,6 ^a	2,6±2,0 ^a
		NR	3,0±3,3 ^a	1,6±3,0 ^a	4,6±2,2 ^a
		CMR (mm)	11,4±15,4 ^a	6,0±12,9 ^a	5,3±4,8 ^a
		MSR (mg)	21,5±20,1 ^a	4,8±10,4 ^a	5,3±5,0 ^a
		MSPA (mg)	133,7±175,5 ^a	46,3±92,8 ^a	16,7±13,5 ^a
1,0	CC (mm)	17,2±10,5 ^a	12,8±11,3 ^a	2,1±2,3 ^a	
	NR	7,2±1,8 ^a	8,6±4,7 ^a	3,4±3,5 ^a	
	CMR (mm)	31,6±22,5 ^a	28,7±26,2 ^a	9,5±9,4 ^a	
	MSR (mg)	33,6±36,0 ^a	35,8±9,5 ^a	7,5±5,9 ^a	
	MSPA (mg)	189,2±121,8 ^a	170,4±149,8 ^a	18,8±22,6 ^a	

Os valores das médias e dos desvios padrões seguidas da mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey com o nível de significância ((p≤0,05).

Tabela 8: Aclimação de plântulas do genótipo BVL: CC-comprimento do caule, NR- número de raízes, CMR-comprimento da maior raiz, MSR-massa seca da raiz e MSPA- massa seca da parte aérea.

Genótipo	BAP (mg L ⁻¹)	Parâmetros avaliados	Concentração IBA (mg L ⁻¹)		
			0	0,5	1,0
BVL	0	CC (mm)	8,9±3,6 ^a	3,6±5,5 ^a	2,4±5,4 ^a
		NR	4,4±2,5 ^a	3,2±4,5 ^a	2,0±4,5 ^a
		CMR (mm)	45,0±23,4 ^a	10,2±11,0 ^a	9,2±20,6 ^a
		MSR (mg)	16,1±7,0 ^a	5,1±7,1 ^a	7,0±15,7 ^a
		MSPA (mg)	116,0±78,5 ^a	44,9±82,2 ^a	27,4±61,2 ^a
	0,1	CC (mm)	8,0±2,6 ^a	2,2±3,0 ^b	0,8±1,0 ^b
		NR	4,6±2,1 ^a	1,8±2,4 ^a	1,4±2,0 ^a
		CMR (mm)	28,8±16,8 ^a	2,3±4,0 ^b	0,9±1,6 ^b
		MSR (mg)	20,2±12,4 ^a	11,3±17,0 ^a	2,2±3,0 ^a
		MSPA (mg)	75,0±63,5 ^a	21,8±29,7 ^b	3,7±6,3 ^b
	0,2	CC (mm)	1,7±2,7 ^a	1,1±2,5 ^a	0,6±0,9 ^a
		NR	1,2±1,8 ^a	0,6±1,3 ^a	1,2±2,1 ^a
		CMR (mm)	3,1±5,8 ^a	3,3±7,2 ^a	2,3±4,0 ^a
		MSR (mg)	1,3±2,4 ^a	1,5±3,3 ^a	1,3±1,8 ^a
		MSPA (mg)	10,7±18,0 ^a	12,5±28,0 ^a	2,3±3,2 ^a
	0,5	CC (mm)	2,1±2,3 ^a	1,9±1,8 ^a	8,6±8,4 ^a
		NR	3,8±4,7 ^a	1,8±2,5 ^a	2,7±2,5 ^a
		CMR (mm)	6,6±7,7 ^a	11,0±11,0 ^a	1,0±3,0 ^a
		MSR (mg)	5,2±5,8 ^a	14,5±12,3 ^a	7,6±11,0 ^a
		MSPA (mg)	31,5±1,3 ^a	24,8±30,5 ^a	55,3±82,9 ^a
1,0	CC (mm)	2,0±2,9 ^a	0,3±0,6 ^a	0,2±0,4 ^a	
	NR	4,2±5,9 ^a	0,2±0,4 ^a	0,0±0,0 ^a	
	CMR (mm)	9,4±9,6 ^a	1,3±2,9 ^a	0,0±0,0 ^a	
	MSR (mg)	9,8±12,9 ^a	0,7±1,6 ^a	0,0±0,0 ^a	
	PSPA (mg)	48,0±53,3 ^a	0,3±0,6 ^a	0,5±1,1 ^a	

Os valores das médias e dos desvios padrões seguidas da mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey com o nível de significância (($p \leq 0,05$)).

Tabela 9: Aclimação de plântulas do genótipo BBA: CC-comprimento do caule, NR- número de raízes, CMR-comprimento da maior raiz, MSR-massa seca da raiz e MSPA-massa seca da parte aérea.

Genótipo	BAP (mg L ⁻¹)	Parâmetros	Concentração IBA (mg/ L ⁻¹)		
			Avaliados	0	0,5
BBA	0	CC (mm)	3,2±4,6 ^a	0,7±1,2 ^a	1,2±2,5 ^a
		NR	1,2±2,2 ^a	1,2±2,2 ^a	2,2±3,5 ^a
		CMR (mm)	17,7±24,3 ^a	2,8±4,6 ^a	0,6±1,3 ^a
		MSR (mg)	16,7±24,1 ^a	1,8±3,7 ^a	6,1±13,0 ^a
		MSPA (mg)	70,9±103,1 ^a	12,1±25,6 ^a	30,2±67,3 ^a
	0,1	CC (mm)	11,4±10,2 ^a	2,8±5,7 ^{ab}	0,0±0,0 ^b
		NR	2,4±2,0 ^a	1,2±2,2 ^a	0,0±0,0 ^a
		CMR (mm)	30,5±22,3 ^a	7,5±12,2 ^b	0,0±0,0 ^b
		MSR (mg)	614,5±673,7 ^a	51,0±103,5 ^a	0,0±0,0 ^a
		MSPA (mg)	114,2±102,8 ^a	43,6±88,4 ^a	0,0±0,0 ^a
	0,2	CC (mm)	11,1±15,0 ^a	3,6±4,3 ^a	2,5±3,7 ^a
		NR	2,0±1,4 ^a	1,4±1,5 ^a	1,2±1,6 ^a
		CMR (mm)	23,4±18,8 ^a	19,9 ±19,2 ^a	11,5±16,7 ^a
		MSR (mg)	38,5±60,8 ^a	17,0±31,4 ^a	8,8±14,5 ^a
		MSPA (mg)	214,7±248,1 ^a	64,2±106,5 ^a	51,1±82,6 ^a
	0,5	CC (mm)	0,3±0,7 ^a	0,0±0,0 ^a	0,0±0,0 ^a
		NR	0,2±0,5 ^a	0,0±0,0 ^a	0,0±0,0 ^a
		CMR (mm)	6,2±13,8 ^a	0,0±0,0 ^a	0,0±0,0 ^a
		MSR (mg)	5,5±12,2 ^a	0,0±0,0 ^a	0,0±0,0 ^a
		MSPA (mg)	27,0±60,4 ^a	0,0±0,0 ^a	0,0±0,0 ^a
1,0	CC (mm)	0,0±0,0 ^a	3,9±4,4 ^a	0,0±0,0 ^a	
	NR	0,0±0,0 ^b	2,4±1,9 ^a	0,0±0,0 ^b	
	CMR (mm)	0,0±0,0 ^b	0,0±0,0 ^b	16,4±131,2 ^a	
	MSR (mg)	0,0±0,0 ^a	17,1±20,2 ^a	0,0±0,0 ^a	
	MSPA (mg)	0,0±0,0 ^a	80,3±107,9 ^a	0,0±0,0 ^a	

Os valores das médias e dos desvios padrões seguidas da mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey com o nível de significância ($p \leq 0,05$).

4. DISCUSSÃO

4.1. Estabelecimento *in vitro* dos genótipos

A micropropagação engloba um conjunto de técnicas de cultura *in vitro* maioritariamente aplicadas à propagação em larga escala, para ensaios de campo ou para suprir necessidades de mercado, normalmente utilizada para espécies difíceis de propagar por outras vias ou para fixar genótipos de interesse (Canhoto, 2010). A cultura de meristemas caulinares, isolados ou inseridos em ápices ou segmentos nodais, é um tipo mais simples de micropropagação, pois não ocorre a indução de formação de novos meristemas, mas apenas o desenvolvimento de meristemas já existentes no explante e o ulterior enraizamento dos rebentos caulinares deles resultantes (Canhoto, 2010). Esta técnica possui muitas vantagens, nomeadamente a produção de material vegetal sadios e em grandes quantidades bem como a multiplicação de forma rápida e uma característica bem marcante é a existência de uniformidade das plântulas, portanto altamente comerciáveis (Ogero *et al.*, 2012).

A fase de estabelecimento é extremamente necessária para o sucesso de culturas *in vitro*. Para que ocorra sucesso das outras fases de cultivo é preciso também que antes da inoculação *in vitro*, o material seja completamente desprovido de organismos patogénicos. Obteve algumas contaminações durante o processo de estabelecimento *in vitro* de alguns explantes dos genótipos. Apenas no genótipo BVL, registou um número significativo de explantes oxidados (7%) logo após serem estabelecidos devido ao caule ser relativamente mais fino que os outros restantes genótipos, pelo que a sua exposição aos desinfetantes teria gerado algum desgaste. Segundo Carvalho & Medeiros (2006), a oxidação fenólica é altamente dependente da espécie e do genótipo. Alguns fatores como danos físicos e químicos no momento da excisão e desinfecção podem contribuir para o impasse.

As barreiras ocasionadas pela oxidação e contaminação na fase de estabelecimento foram facilmente ultrapassadas pela seleção e repicagem das plântulas sadias e com bastante vigor vegetativo.

A contaminação é um problema que tem prejudicado a condução de vários ensaios *in vitro* (Oliveira *et al.*, 2008). Um dos maiores problemas diz respeito à contaminação bacteriana e fúngica. As contaminações por bactérias acontecem, geralmente, devido à contaminação endógena dos explantes e plântulas enquanto que a contaminação por

fungo ocorre em virtude da deficiência na manipulação durante as subculturas e à presença de esporos no ambiente onde as repicagens são realizadas (Carvalho *et al.*, 2006). De acordo com Dugassa & Feyissa (2011) o sucesso de eliminação de vírus dependendo do tamanho do meristema. A seleção de meristemas com tamanho inferior à 0,6 mm diminuem a probabilidade de ocorrências de contaminações. Contudo não se recomenda muitas subculturas quando se quer obter boas respostas fisiológicas nas plântulas. Durante as repicagens, verificou-se a diminuição gradativa da distância entre dois nós consecutivos bem como a redução do tamanho das folhas.

Na proliferação de meristemas dos genótipos da batata-doce, o número de rebentos por cada explante foi sempre um, mas um único segmento nodal foi capaz de originar um rebento caulinar com média quatro nós.

4.1.1. Proliferação de meristemas axilares

A micropropagação *in vitro* por proliferação de meristemas é uma importante ferramenta para reproduzir quantidades de material vegetal em curto espaço de tempo. Sendo a micropropagação *in vitro* uma chave importante para acelerar a produção de espécies de valor, é essencial que ela seja bem otimizada para garantir resultados satisfatórios na propagação de clones em termos de quantidades em função do tempo.

A eficiência de um protocolo de micropropagação é influenciada por vários fatores, destacando-se o meio nutritivo, o qual deve ser ajustado para cada genótipo ou cultivar em estudo (Flores *et al.*, 2015). Os reguladores de crescimento de plantas em combinação com outras fontes de azoto fornecem ao meio de cultura os minerais essenciais necessários para o crescimento da planta (Abubakar *et al.*, 2018).

Levando em conta a aplicação dos ensaios feitos com diferentes concentrações do BAP nos genótipos BRA2, BVL e BBA, conclui-se que para as maiores taxas de propagação *in vitro* de ambos os genótipos devem ser feitos em meio MS sem a presença do BAP, a ausência deste fitorregulador permitiu a regeneração de plântulas mais vigorosas. No entanto as concentrações intermédias entre 0 e 0,2 mg L⁻¹ de BAP podem ser usadas na regeneração completa de plântulas mais vigorosas do genótipo BBA (parte aérea e radicular).

O meio sem BAP teve-se mais vantagens no enraizamento nos genótipos BBA, BRA1 e BRA2. No entanto, no genótipo BVL as melhores taxas de enraizamento bem como o comprimento da maior raiz foram obtidas em meios suplementados com BAP. Neste caso, a propagação vegetativa *in vitro* deste genótipo pode ser feita em meio sem o BAP, e posteriormente submetidas à fase de enraizamento.

Quando comparado os genótipos BRA1 e BRA2 (Tabela 3), observa-se que genótipo BRA1 possui uma alta variabilidade e neste caso de acordo com o ensaio a sua proliferação (parte aérea) pode ser facilitada com a aplicação dos reguladores de crescimento, citocininas. Em contrapartida para melhores taxas de enraizamento é necessário a aplicação do BAP. Segundo Sivparsad & Gubba (2012), uma das estratégias adotadas para minimizar os efeitos da BAP no enraizamento dos rebentos caulinares é a transferência dos brotos para o meio isento de regulador de crescimento.

De acordo com Oliveira *et al.*, (2013), a micropropagação *in vitro* da batata-doce pode ser realizada em meio nutritivo livre de fitorreguladores, mas pode haver necessidade de adição de fitorreguladores para favorecer o processo (Alam *et al.*, 2010; Oliveira *et al.*, 2008; Sivparsad & Gubba, 2012).

As citocininas são fitorreguladores amplamente utilizados em culturas de tecidos (Oliveira *et al.*, 2008). Segundo Roca & Mroginski (1991), o BAP é um dos mais utilizados; promovendo a proliferação de brotos em segmentos caulinares e nodais até determinada concentração, após o que ocorre a diminuição da divisão celular devido a possíveis efeitos fitotóxicos (Soares *et al.*, 2008), redução no alongamento dos brotos e inibição de enraizamento (Flores *et al.*, 2015).

Um fator que contribui para o alto custo de produção é o custo do meio nutriente de cultura, que requer produtos químicos que muitas vezes são muito caros (Savangicar *et al.*, 2004). A fim de aumentar a aplicação da tecnologia de cultura de tecidos no cultivo da batata-doce, abordagens inovadoras são necessárias para reduzir o custo de produção de micropropágulos (Ogero *et al.*, 2012). Sivparsad & Gubba (2012), defendem que a capacidade regenerativa de vários explantes pode ser dependente do genótipo da planta. Para que a multiplicação na produção do material vegetal torna viável em termos comerciais, é necessário ultrapassar obstáculos relacionados com os custos de produção que se devem em grande parte, com as desordens fisiológicas e morfológicas nas plantas,

a baixa taxa de sobrevivência das plantas na aclimação às condições *ex vitro*, a necessidade de mão-de-obra especializada e ao elevado custo de funcionamento e manutenção das salas de crescimento com regime de luz artificial e temperaturas controladas, onde as culturas *in vitro* são incubadas (Silva *et al.*, 2008).

A quantidade e qualidade da luz também podem modificar características do desenvolvimento foliar, como espessura da folha, diferenciação do mésofilo, desenvolvimento vascular, divisão celular e desenvolvimento dos estômatos (Cassana *et al.*, 2008).

4.2. Enraizamento/aclimação de rebentos caulinares provenientes de meristemas sem BAP

Para a formação de raízes *in vitro* o processo é feito em três fases: indução, iniciação e alongamento da raiz (Canhoto, 2010), contudo em algumas espécies o enraizamento de plântulas pode ocorrer em simultâneo no mesmo meio de cultura da multiplicação de explantes (Hussain *et al.*, 2012). À exemplo disso é a batata-doce, a formação dos brotos *in vitro* da batata-doce ocorre junto com o enraizamento.

A escolha do substrato na adaptação das mudas tem grande influência no crescimento e desenvolvimento vegetal. Os substratos podem ser formados por diversas matérias primas de origem mineral ou orgânica. Os de origem mineral mais utilizados são a vermiculite, perlite e a areia. Dentre os orgânicos destacam-se as turfas, a casca de árvores compostadas e a casca de arroz carbonizada (Carvalho *et al.*, 2012). Deste modo, neste ensaio foi aproveitado dos rebentos em meio isento de fitorreguladores e posteriormente transferidas diretamente para dois substratos diferentes. Em ambas as plântulas dos quatro génotipos tiveram 100% de sucesso no processo de enraizamento/aclimação, embora não havendo diferença de resultados perante os substratos. O enraizamento e aclimação *ex vitro* demonstrou ser o método mais eficaz, não só porque houve melhores resultados (taxa de enraizamento e desenvolvimento das raízes), mas também porque é um método que requer menos tempo, menos mão de obra e menos custos.

Os meus resultados vão de encontro com os trabalhos de Dewir *et al.* (2020) no qual comprovaram que a ausência da auxina não teve relevo no enraizamento e aclimatização de rebentos caulinares da variedade “Abees”. O enraizamento de plântulas pode ocorrer em simultâneo no mesmo meio de cultura da multiplicação de explantes (Hussain *et al.*, 2012). Altas taxas de sobrevivência na aclimatização de plântulas provenientes da multiplicação de cultivares de batata-doce foram obtidos nos ensaios de Sivparsad & Gubba (2012) e Flores *et al* 2015.

4.3.Enraizamento/aclimatação de rebentos caulinares provenientes de meristemas com BAP

O enraizamento e aclimatização é uma etapa crucial na micropropagação de espécies dado que as raízes têm um papel e função essenciais na vida e no desenvolvimento das plantas, fornecendo água e nutrientes para a planta. Para a formação de raízes *in vitro* o processo de micropropagação é feito em três fases: indução, iniciação e alongamento da raiz.

O ensaio teve-se enfoque na aclimatização rebentos caulinares provenientes do meio MS com diferentes concentrações da hormona de BAP e ulteriormente em IBA. Este ensaio foi muito inviabilizado pela ocorrência de altas taxas de mortalidades, devido ao enfraquecimento dos rebentos ainda *in vitro*. A causa pode ser alguns fatores relacionados com a redução do comprimento das raízes *in vitro*. Segundo Canhoto (2010), as auxinas são utilizadas como agentes indutores de enraizamento, promovem a extensibilidade da parede celular e induzem a síntese proteica e de DNA e RNA o que parece indicar uma ação do nível dos genes. Segundo Singh e Agarwal (2016), a auxina embora seja essencial para a indução do enraizamento, pode não ser necessário para o crescimento das raízes, e a sua presença pode ser prejudicial a ponto de inibir o crescimento da raiz.

Nos meios suplementado com auxinas as raízes para além de formarem pequenas crostas (calos) as suas dimensões eram também mais reduzidas. Concentrações muito elevadas de auxina ou períodos de exposição longos podem levar à formação de calos na base dos rebentos caulinares só depois ocorrendo a formação de raízes. Esta situação pode levar a uma deformação na conexão entre o sistema vascular do caule e das raízes, impedindo a conclusão do processo de micropropagação (Canhoto, 2010).

Como referido anteriormente, a cada subcultura o vigor vegetativo dos rebentos foram ficando cada vez menor, principalmente no genótipo BVL cuja o potencial organogénico diminuiu consideravelmente. Para além disso, os rebentos provenientes dos meios com BAP também teriam influenciado no tamanho dos rebentos, deste modo, foram muitos fatores responsáveis pela alta taxa de mortalidade. Relativamente à fase de aclimatização das plântulas poucas foram as diferenças significativas assinaladas.

Após o processo de enraizamento as plantas são aclimatizadas, passando de condições heterotróficas para autotróficas, ficando sujeitas a severas condições de stresse, principalmente em relação à humidade, temperatura, luz e contaminações, levando frequentemente a elevadas taxas de mortalidade. A dessecação é um dos principais problemas devido, essencialmente, à elevada relação entre as taxas de transpiração e absorção. Isto pode ser explicado pelas quantidades reduzidas de ceras epicuticulares, grande espaço intercelular e deficiências na resposta dos estomas ao stresse hídrico (Canhoto, 2010).

A sacarose é uma importante fonte de carbono para cultura de tecidos *in vitro*, cuja concentração normalmente varia entre 1 e 3%, contudo Cassana *et al.*, (2008) defendem que estas concentrações podem inibir a síntese de clorofila afetando o desenvolvimento da capacidade de fotossíntese, a redução do crescimento e a morte durante a fase de aclimatação.

À partida, a aplicação da hormona auxina não exerceu nenhum efeito adicional no enraizamento das plântulas dos genótipos, observado naqueles onde a regeneração foi 100%. Neste caso, devem ser realizados mais testes em relação a estes fatores, com a utilização de um maior número de réplicas, para obtenção de dados mais concretos isto porque, a eficácia deste ensaio seria muito útil para avaliar a necessidade da indução do enraizamento dos genótipos em estudo.

Dugassa & Feyissa (2011) enraizaram plântulas das variedades batata-doce Awassa-83, Awassa local e Guntute em meio MS com redução para a metade das concentrações de sais minerais e suplementado com diferentes concentrações de IBA. Os resultados da sobrevivência após a aclimatação foram acima de 91% de sobrevivência.

5. CONCLUSÃO

A micropropagação *in vitro* constitui um importante instrumento capaz de solucionar muitas das questões relacionadas com a propagação convencional. A proliferação de meristemas axilares é uma técnica muito usada na propagação de espécies de interesse. Através desta técnica é possível se obter em curto período de tempo muitos clones saudáveis, dificilmente com os métodos tradicionais. Para além disso a sua aplicação permite fazer estudos sobre a adequação das melhores condições de cultura para a produção de espécie. Contudo, torna-se necessário recorrer à otimização dos processos relacionados com o enraizamento e aclimação. Sendo assim, estes podem ser ajustados às necessidades fisiológicas do material vegetal de interesse de modo a obtenção de resultados satisfatórios.

É necessário a otimização dos meios de cultura a fim de saber as condições de cultura que determinada espécie/genótipo requer para evitar gastos desnecessários.

Tratando-se de uma espécie como a batata-doce, na qual existe muita variabilidade intraespecífica nos cultivares/genótipos, e também uma importante fonte de nutrientes, muito apreciado a nível mundial torna-se essencial dar mais valor a sua produção.

A batata-doce é muito fácil de ser propagado *in vitro* através da proliferação de meristemas axilares. Embora, tenha tido algumas contaminações *in vitro*, os ensaios não tiveram muita influência perante a manutenção do material *in vitro*, graças ao grande potencial da batata-doce regenerar com muita facilidade em pouco espaço de tempo.

Nos ensaios de proliferação de meristemas, concluiu-se que ambos os genótipos, à exceção de BRA1, podem ser multiplicados *in vitro* em meio MS sem a adição da hormona BAP. No entanto os genótipos BBA e BVL podem ser propagadas com meio BAP em concentrações limitadas. O genótipo BRA1 as maiores taxas de multiplicação também poder ser conseguidas em meio sem adição do BAP quando comparado nas mesmas condições que os genótipos BVL e BBA, ou seja, como o mesmo número de amostras. Muita variabilidade foi observada nos genótipos BRA1, BVL e BBA.

Relativamente ao enraizamento/ aclimação de plântulas provenientes do estabelecimento *in vitro* os ensaios demonstraram a eficácia de um sistema de propagação de genótipos simples sem a necessidade de recorrer a suplementos aditivos.

Relativamente ao último ensaio altas taxas de mortalidade inviabilizaram um pouco do estudo. Sobre um pouco daquilo que foi constatado, parece não ter havido algum efeito adicional do IBA no enraizamento pelo menos nos tratamentos onde o número de plantas manteve-se igual ao em relação ao início.

Em geral, os dois primeiros ensaios podem ser um grande auxílio para os produtores. Podendo ser feito um ajuste no meio MS para as batatas BVL e BBA e obter plantas bem vigorosas a nível da parte aérea e radicular e posteriormente o enraizamento em substratos. Com isso poupa o esforço físico, matéria-prima e aumenta os rendimentos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Referências Bibliográficas

- Abubakar, A. S., Yahaya, S. U., Shaibu, A. S., Yahaya, S. U., Ibrahim, H., Ibrahim, A. K., Lawan, Z. M., & Isa, A. M. (2018). In vitro propagation of sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) cultivars. *Agricultural Science Digest - A Research Journal*, 00. <https://doi.org/10.18805/ag.d-128>
- Addae-Frimpomaah, F., Amponsah, J., & Tengey, T. (2014). Regeneration of Three Sweet Potato (*Ipomoea batatas* (L.)). *International Journal of Plant Breeding and Genetics*, 8(3), 121–138. <https://doi.org/10.3923/ijpbg.2014.121.138>
- AJAP, Associação dos Jovens Agricultores de Portugal (2017). *Manual Boas Praticas para Culturas Emergentes: A cultura da Batata-doce* (p. 41). <https://doi.org/10.1590/s0100-29452004000200001>
- Alam, I., Sharmin, S. A., Naher, M. K., Alam, M. J., Anisuzzaman, M., & Alam, M. F. (2010). Effect of growth regulators on meristem culture and plantlet establishment in sweet potato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.]. *Plant OMICS*, 3(2), 35–39.
- Austin, D. F. (1987). The taxonomy, evolution and genetic diversity of sweet potatoes and related wild species. In *Exploration, maintenance, and utilization of sweet potato genetic resources* (pp. 27–59).
- Bovell-Benjamin, A. C. (2007). Sweet Potato: A Review of its Past, Present, and Future Role in Human Nutrition. *Advances in Food and Nutrition Research*, 52(06), 1–59. [https://doi.org/10.1016/S1043-4526\(06\)52001-7](https://doi.org/10.1016/S1043-4526(06)52001-7)
- Brune, S., Freitas, R. A. De, & Silva, J. B. C. da. (2005). Novas técnicas de multiplicação de batata-doce. *Embrapa Hortaliças-Circular Técnica (INFOTECA-E)*. infoteca.cnptia.embrapa.br
- Câmara, F. A. A., Grangeiro, L. C., Dombroski, J. L. D., Freitas, R. M. O., Freitas, F. C. L., & Negreiros, M. Z. (2017). Crescimento de cultivares de *Ipomoea batatas* oriundas de rebentos produzidas de forma convencional e in vitro. *Revista de Ciências Agrárias*, 40(2), 363–372. <https://doi.org/10.19084/rca15019>
- Canhoto, J. M. (2010). *Biotecnologia vegetal: Da Clonagem de Plantas à Transformação Genética*. Imprensa da Universidade de Coimbra. Coimbra.

CARDI. (2010). Sweet Potato Technical Manual. In The Caribbean Agricultural Research Development Institute 2010 (Ed.), *The Caribbean Agricultural Research and Development Institute 2010*, Ed. Cardi.

Carvalho, J. M. C., Silva, M. M. A., Lacerda, M., J.(2006). *Fatores Inerentes À Micropropagação República Federativa do Brasil*. 28. <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/276578/1/DOC148.pdf>.

Carvalho, J. M. F. C., & ARAÚJO, S. D. S. (2008). Técnicas de cultivo in vitro aplicadas na mamoneira. *Embrapa Algodão-Documentos (INFOTECA-E)*.

Carvalho, G. L., Erpen, L., Cocco, C., Vignolo, G., & Antunes, L. E. C. (2012). Influência de Diferentes Substratos no Crescimento e Desenvolvimento de Mudanças de Morangueiro.

Cassana, F., Braga, E., Bacarin, M., Falqueto, A., & Peters, J. (2008). Atividade fotoquímica máxima do fotossistema II em plantas de batata-doce cultivadas *in vitro* e aclimatizadas. *Revista Brasileira de Agrociencia*, 14(4), 612–615. <https://doi.org/10.18539/cast.v14i4.1954>

Castro, L. A. S., & Noronha, A. (2018). Cultivo de batata-doce: principais utilidades. *Embrapa Clima Temperado-Capítulo. Em Livro Técnico (INFOTECA-E)*. <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/1101040>

Castro, L. L. (2011). *El cultivo de la batata: Una oportunidad agroalimentaria para pequeños productores de clima cálido* (L. F. Santiago (ed.); p. 40). SENA & SAC. <http://hdl.handle.net/20.500.12324/13373>

Cusumano, C., & Zamudio, N. (2013). *Manual técnico para el cultivo de Batata (Camote o Boniato) en la Provincia de Tucumán (Argentina)* (Cosme Cusumano y Néstor Zamudio (ed.); INTA). https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-manual_batata.pdf

Dewir, Y. H., Aldubai, A. A., Kher, M. M., Alsadon, A. A., El-Hendawy, S., & Al-Suhaibani, N. A. (2020). Optimization of media formulation for axillary shoot multiplication of the red-peeled sweet potato (*Ipomoea batatas* [L.] Lam.) ‘Abees.’ *Chilean Journal of Agricultural Research*, 80(1), 3–10.

Dugassa, G., & Feyissa, T. (2011). *In vitro* production of virus-free sweet potato

[*Ipomoea Batatas* (L.) Lam] by Meristem culture and thermotherapy. *Ethiop. J. Sci*, 34(1), 17–28.

Edwin F, G., Hall, M. A., & Klerk, G. de. (2008). *Plant propagation by Tissue Culture* (G. Edwin F, M. A. Hall, & G. de Klerk (eds.); 3rd ed.).

El-Far, M. M. M. (2007). Optimization of growth conditions during sweet potato micro-propagation. *African Potato Association Conference Proceedings*, 7(Issn 3934), 204–211.

Flores, R., Maggio, L. P., Flôres, P. Z., Bempck, G. S., Auler, N. M. F., Carvalho, F. C., Godoi, R. S., Franzin, S. M., & Becker, L. (2015). *Otimização da produção de plantas in vitro de cultivares de Ipomoea batatas Optimization of the in vitro plants production of Ipomoea batatas cultivars*. 38(3), 429–437.

Gaspar, T., Keveks, C., Penel, C., Greppin, H., Reid, D. M., & Thorpe, T. A. (1996). Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 32(4), 272–289. <https://doi.org/10.1007/BF02822700>

Gichuki, S. T., Berenyi, M., Zhang, D., Hermann, M., Schmidt, J., Glössl, J., & Burg, K. (2003). Genetic diversity in sweetpotato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.] in relationship to geographic sources as assessed with RAPD markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 50(4), 429–437. <https://doi.org/10.1023/A:1023998522845>

Glimn-Lacy, J., & Kaufman, P. B. (2006). *Botany Illustrated: Introduction to Plants, Major Groups, Flowering Plant Families* (2nd ed.). Springer US. <https://doi.org/10.1007/0-387-28875-9>

Glória, Z. M. D. (2009). *Caracterização Físico-Química e Sensorial da Batata-doce de Alzezur*. Escola Superior Agrária.

Hauman, Z. (1999). Sweetpotato germplasm management (*Ipomea batatas*). *Training Manual*, 218.

Hussain, A., Ahmed, I., Nazir, H., & Ullah, I. (2012). Plant Tissue Culture: Current Status and Opportunities. *Recent Advances in Plant in Vitro Culture*, 1–28. <https://doi.org/10.5772/50568>

Jones, A. (1980). Sweet Potato. In *Hybridization of Crop Plants* (pp. 645–655). American Society of Agronomy, Crop Science Society of America. <https://doi.org/doi:10.2135/1980.hybridizationofcrops.c46>

Kumar, N. (2011). *In vitro* Plant Propagation: A Review. *Journal of Forest and Environmental Science*, 27(2), 61–72.

Kwak, S. S. (2019). Biotechnology of the sweet potato: ensuring global food and nutrition security in the face of climate change. In *Plant Cell Reports* (Vol. 38, Issue 11, pp. 1361–1363). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00299-019-02468-0>

Lagoa, R., & Rodrigues, J. R. (2016). Biodiversidade, as Biotecnologias e a procura de uma nova Bioeconomia Conhecimento e Processos Biotecnológicos. *ESTG-Instituto Politécnico de Leiria*, 24–11.

Lebot, V. (2009). *Tropical roots and tuber crops: Cassava, sweet potato, yams and aroids*. CABI. <http://library.lol/main/00002D625C65F48743480986A447E21E>

Lebot, V. (2010). Sweet Potato. *Root and Tuber Crops*, 97–125. https://doi.org/10.1007/978-0-387-92765-7_3

Loebenstein, G., & Thottappilly, G. (2009). The Sweet potato. In G. Loebenstein & G. Thottappilly (Eds.), *The Sweetpotato*. Springer Science & Business Media. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-9475-0_12

Marti, H. R., Mittidieri, M., Feo, L. del V. Di, Segade, G., & Constantino, A. (2014). *Producción agroecológica de batata para el gran cultivo y la huerta familiar* (H. Marti, M. C. Chiandussi, & M. Filippi (eds.); INTA). https://www.researchgate.net/publication/301481649_Produccion_agroecologica_de_batata_para_el_gran_cultivo_y_la_huerta_familiar

Masekesa, R. T., Gasura, E., Matikiti, A., Kujeke, G. T., Ngadze, E., Icishahayo, D., Chidzondo, F., & Robertson, A. I. (2016). Effect of BAP, NAA and GA₃, either alone or in combination, on meristem culture and plantlet establishment in sweet potato (cv Brondal). *African Journal of Food, Agriculture, Nutrition and Development*, 16(1), 10649–10665. <https://doi.org/10.18697/ajfand.73.15875>

Miranda, J. E. C. de, França, F. H., Carrijo, O. A., Souza, Francisco, A., Pereira, W., & Lopes, C. A. (1989). Batata-doce (*Ipomoea batatas* (L.) LAM). In *infoteca.cnptia.embrapa.br*.

Monteiro, A. B. (2007). Silagens de cultivares e clones de batata doce para alimentação animal visando sustentabilidade da produção agrícola familiar. *Revista Brasileira De Agroecologia*, 2(2), 978–981.

Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plant*, 15, 473–497. <https://doi.org/10.1104/pp.113.231753>

Ogero, K. O., Nkanata Mburugu, G., Mwangi, M., Ngugi, M. M., & Ombori, O. (2012). Low Cost Tissue Culture Technology in the Regeneration of Sweet Potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam). *Research Journal of Biology*, 02, 51–58. www.scientific-journals.co.uk

Oliveira, C. M., Zambon, C. R., Boas, A. V., Menino, G. C. O., & Pinto, J. E. P. B. (2013). Efeito de Reguladores de Crescimento na Micropropagação *in Vitro* de Batata Doce. *Global Science and Tecnology*, 6(3), 108–114.

Oliveira, T. De, Karla, M., Neto, B., & Augusto, F. (2008). Multiplicação *in vitro* de batata-doce (*Ipomoea batatas* Lam.). *Revista Caatinga*, 21(4), 129–134.

Ramirez, G. P. (1992). Cultivation Harvesting and Storage of Sweet Potato. *Roots, Tubers, Plantains and Bananas in Animal Feeding*. 13.

Roca, W. M., & Mroginski, L. A. (1991). *Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones*. Colômbia, Centro Internacional de Agricultura Tropical.

Roullier, C., Kambouo, R., Paofa, J., McKey, D., & Lebot, V. (2013). On the origin of sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) genetic diversity in New Guinea, a secondary centre of diversity. *Heredity*, 110(6), 594–604. <https://doi.org/10.1038/hdy.2013.14>

Ruiz, G. C., Bermúdez, E. C., García, A. M., Guillen, F. C., & Cedeño, Á. G. (2017). Manual técnico del cultivo de camote. *Manual N° 106*.

Santos, M. T. (2018). *Vírus da batata-doce em Portugal*. 40–41.

Savangicar, V. A., Prakash, J., & Ahloowalia, B. S. (2004). *Low cost options for tissue culture technology in developing countries*.

Silva, J. B. C. da, Lopes, C. A., Miranda, J. E. C. de, Franca, F. H., Carrijo, O. A., Souza, A. F., & Pereira, W. (1995). Cultivo da Batata-doce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam). *Instruções Técnicas Do CNPHortaliças*, 7, 18.

Silva, J. B.C., Lopes, C.A & Magalhães, J. S. (2008). *Batata-doce (Ipomoea batatas)* (Issue 6). Embrapa Hortaliças.

Silva, S. O., Souza, A. S., & Paz, O. P. (1991). Efeito da multiplicação vegetativa *in vitro* na produtividade da batata-doce (*Ipomoea batatas* L. Lam.). *Rev. Bras. Fisiol. Vegetal*, 3(1), 47–52.

Singh, A. and Agarwal, P.K. (2016). Enhanced micropropagation protocol of ex vitro rooting of a commercially important crop plant *Simmondsia chinensis* (Link) Schneider. *Journal of Forest Science*, 62:107-115.

Sivparsad, B. J., & Gubba, A. (2012). Development of an efficient plant regeneration protocol for sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) cv. Blesbok. *African Journal of Biotechnology*, 11(84), 14982–14987. <https://doi.org/10.5897/AJB12.2249>

Soares, É., Reis, É. S., Domiciano, L., Rosado, S., & Corrêa, R. M. (2008). Influência do meio de cultura na germinação de sementes *in vitro* e taxa de multiplicação de *Melissa officinalis* L. *Revista Ceres*, 55(3), 160–167.

Stathers, T., Low, J., Mwanga, R., Carey, T., McEwan, M., David., S., Gibson, R., Namanda, S., McEwan, M., Malinga, J., Ackatia-Armah, R., Benjamin, M., Katcher, H., Blakenship, J., Andrade, M., Agili, S., Njoku, J., Sindi, K., Mulongo, G., Tumwegamire, S., Njoku, A., ... Muzhingi, T. (2018). Everything You Ever Wanted to Know About Sweetpotato: Topic 2: The Origin and Importance of Sweetpotato. In *Reaching Agents of Change ToT Manual*. International Potato Center. <https://doi.org/10.4160/9789290605027T2>

Thorpe, T. A. (2007). History of plant tissue culture. *Molecular Biotechnology*, 37(2), 169–180. <https://doi.org/10.1007/s12033-007-0031-3>

Ugent, D., & Peterson, L. W. (1988). Archaeological Remains of Potato and Sweet Potato in Peru. *CIP Circular*, 16(3), 10.

Vidal, A., Zuñiga, A., & García, M. (2018). Propiedades nutrimentales del camote (*Ipomoea batatas* L.) y sus beneficios en la salud humana. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, 19(2), 1–15.

Whitford, R., Gilbert, M., & Langridge, P. (2010). Biotechnology in agriculture. *Climate Change and Crop Production*, 24(70), 219–244. <https://doi.org/10.1201/b15271-5>

Wilson, L. A., & Lowe, S. B. (1973). The anatomy of the root system in west Indian sweet potato (*Ipomoea Batatas* (L.) Lam.) cultivars. *Annals of Botany*, 37(3), 633–643. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aob.a084729>

Wondimu, T., Feyissa, T., & Bedada, G. (2012). Meristem culture of selected sweet potato (*Ipomoea batatas* L. Lam.) cultivars to produce virus-free planting material. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 87(3), 255–260. <https://doi.org/10.1080/14620316.2012.11512861>

Zhang, D., Cervantes, J., Huamán, Z., Carey, E., & Ghislain, M. (2000). Assessing genetic diversity of sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) cultivars from tropical America using AFLP. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 47(6), 659–665. <https://doi.org/10.1023/A:1026520507223>.