

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU

**COMPARAÇÃO ENTRE ÁGAR E AMIDO COMO AGENTES
GELIFICANTES NA MICROPROPAGAÇÃO DE BATATA DOCE**
Ipomoea batatas (L.) Lam.

REGINA SMITH PINHO
Eng^a. Agrônoma

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Giuseppina Pace Pereira Lima

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP - Campus de Botucatu, para obtenção do título de mestre em Agronomia – Área de Concentração em Horticultura.

Botucatu-SP
Agosto - 2002

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU

**COMPARAÇÃO ENTRE ÁGAR E AMIDO COMO AGENTES
GELIFICANTES NA MICROPROPAGAÇÃO DE BATATA DOCE**
Ipomoea batatas (L.) Lam.

REGINA SMITH PINHO
Eng^a. Agrônoma

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Giuseppina Pace Pereira Lima

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP - Campus de Botucatu, para obtenção do título de mestre em Agronomia – Área de Concentração em Horticultura.

Botucatu-SP
Agosto - 2002

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CÂMPUS DE BOTUCATU

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO:.....
.....(Letras maiúsculas)

AUTOR:.....(Letras maiúsculas)

ORIENTADOR:.....(Letras maiúsculas)

CO-ORIENTADOR:.....(Letras maiúsculas)

Aprovada pela Comissão Examinadora:

Nome.....Presidente

Nome.....

Nome.....

Data de realização ____/____/____

OBS: Este certificado será impresso e fornecido pela F.C.A.

AGRADECIMENTOS

À Prof^ª. Dr^ª. Giuseppina Pace Pereira Lima, pela orientação e estímulo.

À Prof^ª. Dr^ª. Marney Pascoli Cereda, pela sua colaboração.

A Dr^ª-Isabela Miranda de Toledo Piza pela amizade e incentivo.

Aos funcionários do Departamento de Química e Bioquímica, do Instituto de Biociências, UNESP, Botucatu.

Aos funcionários do CERAT (Centro de Raízes e Amidos Tropicais), UNESP, Botucatu.

Aos colegas do curso de Pós-graduação, pelo convívio.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa para realização deste trabalho.

Obrigada

SUMÁRIO

Lista de Figuras	VII
Lista de Quadros	IX
Lista de Tabelas	XI
Resumo	XII
Summary.....	XIV
1- Introdução.....	1
2- Objetivos	4
3- Revisão Bibliográfica.....	5
3.1- Cultura da Batata Doce <i>Ipomoea batatas</i> L.....	5
3.2. Propagação in vitro	8
3.3- Características dos Agentes Gelificantes.....	11
3.4- Características da Mistura de Amido.....	14
3.5- Mercado do Agente Gelificante.....	16
3.6- Utilização da Sacarose <i>in vitro</i>	18
4- Materiais e Métodos	19
4.1- Fase de Estabelecimento.....	19
4.1.1- Obtenção do Material Vegetal.....	19
4.1.2- Obtenção dos Explantes.....	20
4.1.3- Assepsia do Material.....	20
4.1.4- Meio de Cultura para a Obtenção de Plantas.....	23

4.2- Fase de Multiplicação <i>in vitro</i>	25
4.2.1- Obtenção da Mistura de Amido	25
4.2.2 – Meio de Cultura e Condições de Cultivo.....	27
4.3- Determinações Químicas e Bioquímicas.....	29
4.3.1- Massa Fresca.....	30
4.3.2- Teor de Proteína Solúveis Totais	30
4.3.3- Determinação de Açúcares Redutores	31
4.3.4 pH	31
4.3.5- Condutividade Elétrica	32
4.4 Delineamento Experimental	32
5- Resultados e discussões	33
5.1- Fase de Estabelecimento.....	33
5.1.1- Porcentagem de Contaminação e Desenvolvimento das Gemas	33
5.2- Fase de Multiplicação.....	38
5.2.1- Massa Fresca.....	38
5.2.2-Proteínas Solúveis Totais	46
5.2.3- Determinação de Açúcares Redutores	49
5.2.4 pH	54
5.2.5- Condutividade Elétrica	59
5.3- Custo.....	62
6- Conclusões.....	63
7- Referências Bibliograficas	64

LISTA DE FIGURAS

Figura 01: Esquema de Assepsia em <i>Ipomoea batatas</i> L. adotado no trabalho	22
Figura 02: Planta <i>Ipomoea batatas</i> L. obtida na fase de estabelecimento, com 30 dias em meio ? S básico.	24
Figura 03: Esquema para retirada do amido da semente de feijão guandu (<i>Cajanus cajanus</i>).26	
Figura 04: Porcentagem de contaminação nas diferentes Assepsias aos 30 dias de desenvolvimento de <i>Ipomoea batatas</i> L. durante a fase de estabelecimento.....	36
Figura 05: Porcentagem de gemas desenvolvidas, com emissão de parte aérea e com emissão de raízes nas diferentes Assepsias aos 30 dias de desenvolvimento de <i>Ipomoea batatas</i> L. durante a fase de estabelecimento.....	37
Figura 06: Curva de crescimento em cada Tratamento, durante a fase de multiplicação de <i>Ipomoea batatas</i> L.	42
Figura 07: Planta de <i>Ipomoea batatas</i> L. aos 30 dias de desenvolvimento durante a fase de multiplicação, sob efeito dos tratamentos 1(amido 0,6% e sacarose) e tratamento 2 (amido 7% e sacarose).....	44
Figura 08: Planta de <i>Ipomoea batatas</i> L. aos 30 dias de desenvolvimento durante a fase de multiplicação, sob efeito do tratamento 3 (ágar 0,6% e açúcar cristal) e tratamento 4 (amido 7% e açúcar cristal).....	45
Figura 09: Variação do teor de proteína Solúveis Totais em cada Tratamento, durante a fase de multiplicação de <i>Ipomoea batatas</i> L.	48
Figura 10: Variação da quantidade de açúcares redutores totais no meio de cultura durante a fase de multiplicação de <i>Ipomoea batatas</i> L.	52

Figura 11: Valores médios de pH obtidos durante a fase de multiplicação de *Ipomoea batatas* L. nos diferentes tratamentos58

Figura 12: Valores médios de condutividade elétrica obtidos durante a fase de multiplicação de *Ipomoea batatas* L. nos diferentes tratamentos61

LISTA DE QUADROS

Quadro 01: Resultado das assepsias testadas na fase de estabelecimento da cultura de Ipomoea batatas L. aos 30 dias de desenvolvimento.	35
Quadro 02: Resultado das desenvolvimento dos explantes durante fase de estabelecimento da cultura de Ipomoea batatas L. aos 30 dias de desenvolvimento.	37
Quadro 03: Valores médios obtidos para massa de matéria fresca (g) de Ipomoea batatas L. nos explantes iniciais (0 dias) na fase de multiplicação.	38
Quadro 04: Valores médios obtidos para massa de matéria fresca (g) de Ipomoea batatas L. aos 10 dias de desenvolvimento durante a fase de multiplicação.....	39
Quadro 05: Valores médios obtidos para massa de matéria fresca (g) de Ipomoea batatas L. aos 20 dias de desenvolvimento durante a fase de multiplicação.....	39
Quadro 06: Valores médios obtidos para massa de matéria fresca (g) de Ipomoea batatas L. aos 30 dias de desenvolvimento durante a fase de multiplicação.....	40
Quadro 07: Valores médios obtidos para teor de proteínas solúveis totais nos explantes de Ipomoea batatas L. aos 10 dias de desenvolvimento.	46
Quadro 08: Valores médios obtidos para teor de proteínas solúveis totais nos explantes de Ipomoea batatas L. aos 20 dias de desenvolvimento.	47
Quadro 09: Valores médios obtidos para teor de proteínas solúveis totais nos explantes de Ipomoea batatas L. aos 30 dias de desenvolvimento.	47
Quadro 10: Valores médios de açúcares redutores no meio de cultura aos após a autoclavagem durante a fase de desenvolvimento de Ipomoea batatas L.	49
Quadro 11: Valores médios de açúcares redutores no meio de cultura aos 10 dias de desenvolvimento de Ipomoea batatas L.	50

Quadro 12: Valores médios de açúcares redutores no meio de cultura aos 20 dias de desenvolvimento de <i>Ipomoea batatas</i> L.	50
Quadro 13: Valores médios de açúcares redutores no meio de cultura aos 30 dias de desenvolvimento de <i>Ipomoea batatas</i> L.	51
Quadro 14: Valores médios do pH obtidos após a autoclavagem nos meios de cultura dos diversos tratamentos.	54
Quadro 15: Valores médios obtidos para pH nos meios de cultura dos diversos tratamentos aos 10 dias de desenvolvimento na fase de multiplicação de <i>Ipomoea batatas</i> L.	56
Quadro 16: Valores médios obtidos para pH nos meios de cultura dos diversos tratamentos aos 20 dias de desenvolvimento na fase de multiplicação de <i>Ipomoea batatas</i> L.	56
Quadro 17: Valores médios obtidos para pH nos meios de cultura dos diversos tratamentos 30 dias de desenvolvimento na fase de multiplicação de <i>Ipomoea batatas</i> L.	57
Quadro 18: Valores médios de condutividade elétrica obtidos após quatro horas da autoclavagem nos meios de cultura.	59
Quadro 19: Valores médios obtidos para condutividade elétrica nos meios de cultura dos diversos tratamentos aos 10 dias de desenvolvimento na fase de multiplicação de <i>Ipomoea batatas</i> L.	59
Quadro 20: Valores médios obtidos para condutividade elétrica nos meios de cultura dos diversos tratamentos aos 20 dias de desenvolvimento na fase de multiplicação de <i>Ipomoea batatas</i> L.	60
Quadro 21: Valores médios obtidos para condutividade elétrica nos meios de cultura dos diversos tratamentos aos 30 dias de desenvolvimento na fase de multiplicação de <i>Ipomoea batatas</i> L.	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 01: Rendimento Mundial da Cultura da Batata Doce (FAO, 2001)6

Tabela 02: Superfície Cultivada de Batata Doce no Mundo (FAO, 2001)..... 7

Tabela 03- Custo dos Agentes Gelificantes na Índia. 17

Tabela 04- Custo dos Agentes Gelificantes no Brasil. 17

Tabela 05: Assepsias adotadas para desinfestação de Ipomoea batatas L. durante a fase de estabelecimento..... 21

Tabela 06: Sais Componentes e Suplementação para Constituição do meio Básico de Murashige & Skoog (1962), modificado por Piza (1997) 28

Tabela 07: Composição do Meio de Cultura dos diferentes tratamentos durante a fase de multiplicação de Ipomoea batatas L. 29

RESUMO

O presente trabalho foi realizado no Departamento de Química e Bioquímica, do Instituto de Biociências, da Universidade Estadual Paulista, Campus de Botucatu. Teve como objetivo avaliar o desenvolvimento da batata doce (*Ipomoea batatas* L.) em meio de cultura modificado por amido e verificar a possibilidade de substituição do agente gelificante ágar por amido durante a micropropagação. O experimento foi dividido em duas fases: estabelecimento e multiplicação. Na fase de estabelecimento foram testadas três metodologias de assepsias para desinfestação das microestacas (Assepsia 1 - 40% de solução de hipoclorito de sódio com 2,5% de Cloro ativo, por 20 minutos, Assepsia 2 - 50% de solução de hipoclorito de sódio com 2,5% de Cloro ativo, por 20 minutos seguido de solução de álcool 70% por 1 minuto, Assepsia 3 - 50% de solução de hipoclorito de sódio com 2,5% de Cloro ativo por 20 minutos). Na fase de multiplicação foram testados 4 tipos de meio de cultura (T1- 0,6% ágar e sacarose P.A 30 g.L⁻¹, T2- 7% da mistura de amido e sacarose P.A 30 g.L⁻¹, T3- 0,6% ágar e açúcar cristal comercial 30 g.L⁻¹, T4- 7% da mistura de amido e açúcar cristal comercial 30 g.L⁻¹). Na primeira fase foi realizada uma avaliação aos 30 dias de desenvolvimento, determinando-se o número de microestacas contaminadas por fungos e bactérias, total de microestacas com desenvolvimento de parte aérea e raiz e o número de gemas desenvolvidas. Na segunda fase foram realizadas 4 coletas (aos 0 dias, 10 dias, 20 dias e 30) dias onde analisou-se as condições dos meios de cultura (pH, condutividade elétrica e açúcares redutores) e o desenvolvimento das microestacas (massa de matéria fresca e proteínas solúveis). A assepsia 2 (50% de solução de hipoclorito de sódio com 2,5% de Cloro ativo por 20 minutos seguido de solução de álcool 70% por 1 minuto) foi a que promoveu melhores

XIII

resultados e o uso da mistura de amido (7%) com 30 g.L⁻¹ de sacarose promoveu maior crescimento das microestacas de batata doce aos 30 dias de desenvolvimento.

SUMMARY

EVALUATION OF THE DEVELOPMENT POTATO SWEET *Ipomoea batatas* (L.) Lam. IN MODIFIED MEDIUM CULTURE FOR STARCH. Botucatu, 2002. 62p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Horticultura) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista.

Author: REGINA SMITH PINHO

Adviser: GIUSEPPINA PACE PEREIRA LIMA

The present work was undertaken at the Department of Chemistry and Biochemistry of the Instituto de Biociências, at the Universidade Estadual Paulista, Botucatu Campus. The objective was to evaluate the development of the sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) in a starch-modified culture and verify the possibility of the substitution of the agar agent for starch in the micro propagation of the sweet potato. The experiment was divided in two phases: establishment and multiplication. During the establishment phase three kinds of asepsis for the disinfection of the micro stakes (Asepsis 1 - 40% of solution of sodium hip chlorite with 2,5% of active Chlorine for 20 minutes, Asepsis 2 - 50% of solution of sodium hip chlorite with 2,5% active Chlorine for 20 minutes followed by an alcohol solution at 70% for 1 minute, Asepsis 3 - 50% of solution of sodium hip chlorite with 2,5% active Chlorine), in the multiplication phase 4 types of medium culture were tested (T1- 0,6% agar and saccharin P.A 30 g.L⁻¹, T2- 7% of the starch-saccharin mix P.A 30 g.L⁻¹, T3- 0,6% agar and commercial crystal sugar 30 g.L⁻¹, T4- 7% of the starch-saccharin mix P.A 30 g.L⁻¹). During the first phase an assessment was carried out on the 30th day of development , to determine the number of micro stakes contaminated with fungi and bacteria , the total of micro stakes

with aerial part and root development and the number of developed geµS. During the second phase samples were collected on the day 0, day 10, day 20 and day 30 when the culture medium were analyzed (pH, electric conductivity, and reducing sugars) and the development of micro stakes (fresh matter mass and soluble proteins). The Asepsis 2 (50% of solution of sodium hip chlorite with 2,5% active Chlorine for 20 minutes followed by alcohol solution at 70% for 1 minute) was the one to achieve better results and the use of the starch mixture (7%) with 30 g.L⁻¹ of saccharin has promoted better growth of the micro stakes of sweet potato on the 30th day of development.

1- INTRODUÇÃO

A batata doce *Ipomoea batatas* (L.) Lam. é uma espécie originária da região noroeste da América do Sul (Huaman, 1992). A FAO divulgou em 2001 que a batata doce é uma das principais hortaliças produzidas no Brasil, com aproximadamente 48.000ha cultivados, onde foram colhidos 500.000 toneladas de raiz. Os países em desenvolvimento são responsáveis por 98% da produção mundial de batata doce, sendo que a China contribui com 90% desse total.

A batata doce é uma cultura amplamente adaptada a diversas condições de solo tanto em termos nutricionais quanto em valores de pH; em relação ao clima, por ser de origem tropical requer um período sem que haja ocorrência de geadas. Desta forma, a batata doce é uma planta facilmente adaptável, de fácil cultivo e com baixo custo de produção (Folquer, 1978).

De acordo com Torres & Teixeira (1996), esta hortaliça é propagada vegetativamente, o que possibilita a ocorrência de muitas doenças, causadas principalmente por vírus, micoplasmas, bactérias e fungos, sendo transmitidas e intensificadas em plantios sucessivos. O vírus do mosaico da batata doce SPFMV é considerado a principal virose, com distribuição mundial, acarretando diminuição na produtividade da cultura e depreciação na qualidade do produto colhido. Pozzer (1993) relatou que plantas provenientes de cultura de tecidos apresentaram maiores produções totais de raízes e um aumento no número de plantas sobreviventes no final do ciclo. Segundo a FAO (2001), os rendimentos da cultura de batata doce não têm melhorado, devido à degeneração varietal, em muitas áreas produtoras.

O método mais prático para obtenção de material sadio em genótipos infectados é a cultura de tecidos, podendo-se produzir propágulos sadios geneticamente uniformes e destinados à manutenção *in vitro* de germoplasma de interesse, realizar propagação rápida para produção comercial, intercâmbio e pesquisa (Grout, 1990).

A maioria dos trabalhos conduzidos sob condições *in vitro* utiliza o ágar como agente gelificante. Apesar de muitas vezes ser considerado biologicamente inerte, o ágar comercial varia de pureza e de poder de gelificação, além do que, como é utilizado em grande quantidade, é normalmente o componente mais caro dos meios de cultura (Ribeiro et al., 1996). Assim, a função do ágar é ser agente de suporte e regulador osmótico, variando de qualidade e pureza, sendo que estas características estão diretamente relacionadas com o custo do produto (Pizarro et al., 1998). O ágar é um tipo de agente gelificante de natureza polissacarídica produzido por algas (*Gelidium amansii*), sendo que sua composição em polissacarídeos pode variar de 50% a 90%, por isso, a procedência do mesmo é importante. Por outro lado, a autoclavagem pode hidrolisá-lo se o pH do meio estiver ácido, fazendo com

que perca firmeza e, dependendo da marca, o agente gelificante pode apresentar impurezas, como, bário, sulfato, etc, que podem afetar o crescimento dos explantes (Cid, 2001).

Diversos tipos de amido vêm sendo utilizados como substitutos para o ágar. Tiwari & Rahimbaev (1992) obtiveram sucesso ao usarem amido de cevada na cultura de anteras especialmente quando combinado com ágaroses. Além disso o amido apresenta preço menor do que o ágar, o que diminuiria o custo da propagação in vitro de diversas espécies vegetais.

2- OBJETIVOS

Verificar a possibilidade de substituição do agente gelificante ágar por amido na micropropagação de batata doce.

Avaliar o desenvolvimento de *Ipomoea Batatas* (L.) *in vitro* em meio de cultura modificado por amido.

Verificar a possibilidade de substituição de sacarose PA por açúcar cristal como fonte de energia.

3- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1- Cultura da Batata Doce *Ipomoea batatas* L.

A batata doce é uma planta de clima tropical ou subtropical, sendo também cultivada em regiões de clima temperado. A planta é rústica, seu cultivo é fácil, de alta tolerância à seca apresentando ampla adaptação e baixo custo de produção. Esta é uma espécie muito popular, cultivada e apreciada em todo país, sendo a quarta hortaliça mais consumida pela população brasileira e a principal hortaliça do nordeste. Seu rendimento médio nacional é bastante baixo 10,42 t/ha e a área cultivada no país tem diminuído nos últimos anos conforme pode ser observado nas Tabelas 1 e 2 (FAO, 2001).

Tabela 01: Produtividade Mundial da Cultura da Batata Doce *Ipomoea batatas* L (FAO, 2001)

Posição	Países	kg/ha
	Média Mundial	14,87
1 ^o	Israel	34,29
2 ^o	Cook, Islas	28,00
3 ^o	Egito	27,47
4 ^o	Japão	24,73
5 ^o	Coréia	20,59
6 ^o	Grécia	20,00
7 ^o	China	19,37
8 ^o	México	19,05
30 ^o	Brasil	10,42

A batata doce é uma espécie dicotiledônea da família Convolvulaceae que apresenta consistência herbácea e, embora seja perene, é cultivada como anual. Seu hábito de crescimento é predominantemente decumbente, crescendo rápida e horizontalmente sobre o solo, embora existam cultivares de porte ereto e semi-ereto (Huaman, 1992).

Raízes de batata doce podem ser utilizadas na alimentação humana e na animal, tanto na forma *in natura* quanto na industrializada para a produção de etanol e metano (Torres & Teixeira, 1996), em indústrias têxteis, de cola e de corantes naturais, principalmente as cultivares com polpa alaranjada e roxa (Figueiredo, 1995).

As raízes de batata doce não podem ser consideradas um alimento completo devido ao baixo teor protéico e a deficiência em lisina, leucina, metionina e cisteína. Elas apresentam teores razoáveis de minerais, principalmente ferro, cálcio e fósforo. Sua principal característica é ser um alimento altamente energético devido ao seu alto teor de carboidrato (em média é superior a 30% em massa fresca) e também ser uma fonte de vitaminas, principalmente B e C. Os cultivares com polpa alaranjada apresentam elevados teores de β -caroteno (Folquer, 1978).

Tabela 02: Superfície Cultivada de Batata Doce *Ipomoea batatas* L no Mundo (FAO, 2001)

Posição	Países	Mil hectares
	Mundo	9.621.040
1 ^o	China	6.310.003
2 ^o	Espanha	900
3 ^o	Ilhas Fiji	900
4 ^o	Paquistão	825
5 ^o	Togo	800
6 ^o	Marrocos	765
7 ^o	Cabo Verde	750
8 ^o	Zimbábue	750
48 ^o	Brasil	48

Na alimentação humana, as raízes tuberosas são consumidas *in natura* cozidas, fritas e assadas, bem como utilizadas para a produção de doces e biscoitos, podendo ainda ser industrializadas e utilizadas para a produção de farinhas, féculas, açúcares e xaropes.

Os métodos tradicionalmente utilizados para a propagação da batata doce são vegetativos por meios de ramos e raízes tuberosas (Folquer, 1978). Porém, segundo Silva et al. (1991), estes métodos de propagação apresentam sérios problemas, dentre os quais destaca-se a dificuldade de conservação do material, disseminação de pragas e doenças, a pequena capacidade multiplicativa do material disponível, desuniformidade nos plantios e a baixa produtividade. Além disso, podem ocorrer degenerescências em decorrência do acúmulo de doenças, principalmente viróticas, no material de propagação.

Para contornar os problemas advindos do uso da propagação vegetativa tradicional, foram desenvolvidas técnicas alternativas de cultivo de partes da planta de batata doce *in vitro*. Assim, tornou-se possível a micropropagação *in vitro* desta espécie através de explantes de folhas, pecíolo, limbos, nós, entrenós, pedaços de raízes, ápices, brotos, pedaços de ramos e meristemas. Este último propágulo é empregado quando se busca a “limpeza” de vírus e outros patógenos (Silva et al., 1991)

3.2. Propagação *in vitro*

A micropropagação de espécies de importância agrícola tem grande aplicabilidade no processo de produção industrial. A clonagem *in vitro* é um procedimento usual, na multiplicação de espécies ornamentais, frutíferas e essências florestais, tanto em países desenvolvidos quanto em desenvolvimento. Atualmente, milhares de pequenas, médias e grandes empresas produzem entre 10.000 e 1.000.000 de mudas de plantas *in vitro* por ano (Fáril & Melo, 1996). Na América Latina a micropropagação industrial começou nos anos 80, existindo atualmente cerca de 404 laboratórios comerciais, dos quais 100 dedicam-se

exclusivamente a propagação, com produção anual estimada em 30 milhões de plantas, sem incluir Cuba (RedBio, 1998).

A cultura de tecidos *in vitro* tem sido recomendada como excelente instrumento auxiliar no melhoramento de culturas de interesse econômico, bem como na propagação vegetativa das espécies, além de influenciar na produtividade agrícola, através de variantes somaclonais desejáveis, com características como resistência a doenças, condições de armazenamento, etc. (Carta Patente, 1995).

A micropropagação ou propagação *in vitro* é vantajosa, pois permite a limpeza do material multiplicado, além da alta taxa de multiplicação alcançada (Pereira & Silva, 1986). Estes fatores são fundamentais para a formação de coleção para manutenção de germoplasma.

Segundo Morales et al. (1998), a produção de *Ipomea batatas*, *Manihot esculenta*, *Xanthosoma spp.*, *Colocasia esculenta* e *Discorea spp.* encontram-se deprimidas, fundamentalmente, pela falta de disponibilidade de propágulos de alta qualidade. As técnicas biotecnológicas são uma alternativa para o resgate do potencial produtivo das espécies, cuja perda de produtividade se deve ao envelhecimento fisiológico provocado, entre outras causas, pela constante multiplicação através de estacas, rizomas e tubérculos. O impacto provocado pelo rejuvenescimento em determinadas espécies tem permitido incrementos de até 40% no seu rendimento.

Dentre os principais problemas da propagação vegetativa de raízes tuberosas estão a dificuldade de conservação do material de plantio, disseminação de pragas e doenças, pequena capacidade multiplicativa, dificuldade de eliminação de vírus, desuniformidade nos plantios e risco de introdução de pragas e doenças no intercâmbio de

germoplasma (Sihachakr, 1982).

Chiu et al. (1982) conseguiram aumentos de produtividade em até 100% através da utilização de variedades de batatas doces submetidas ao cultivo *in vitro*, usando como explante ápices caulinares (meristemas) com 2-3 primórdios foliares.

Alves (1988) relatou que a maioria dos trabalhos com cultura de tecidos em batata doce começa com o estabelecimento de calos, com células diferenciadas, porém com certo grau de organização. Para a formação dos calos, vários meios de cultura têm sido estudados, destacando-se o de Murashige & Skoog (1962) e suas modificações (Henderson et al., 1984).

Segundo Alves (1988), não existe inibição correlativa entre segmentos vegetativos contendo gemas apicais e entre gemas axilares, sendo ainda o meio de cultura ? S com ausência de reguladores de crescimento o meio que oferece as melhores respostas para a obtenção de plântulas completas de batata doce aptas para o transplântio e aclimatação ao final de aproximadamente 40 dias de cultivo *in vitro*.

Apesar da batata doce estar entre os principais alimentos produzidos mundialmente, é relativamente pequeno o número de trabalhos na área de biotecnologia com esta cultura. Entre estes trabalhos, destacam-se aqueles sobre a utilização de marcadores moleculares para a caracterização de germoplasma e estudos de diversidade genética (Villordon & LaBonte, 1995). Alguns trabalhos visam incrementar técnicas da cultura de tecidos para esta espécie, objetivando a eliminação de patógenos sistêmicos, através da cultura de meristema e o aumento da taxa de multiplicação deste material *in vitro*, através de gemas axilares e da embriogênese somática (Schultheis & Cantliffe, 1992).

Diversos fatores podem afetar o sucesso da propagação *in vitro* de espécies vegetais, como temperatura, concentração de íons, luminosidade, pH, entre outros. O crescimento *in vitro* e a organogênese são dependentes do pH. Valores entre 6,3 e 5,7 parecem ser ótimos especialmente para a formação de raízes (Aydieh et al., 1999; Ebrahim et al., 1999).

Em baixo pH ocorrem sintomas de deficiência de minerais como Cálcio nas plantas. Com frequência essa condição de acidez leva a planta a apresentar sintomas de deficiência de fosfato ou molibdato e toxidez de Al ou Mn (Malavolta,).

3.3- Características dos Agentes Gelificantes

A cultura de tecidos vegetais *in vitro* é muito empregada atualmente para realizar a propagação vegetativa das espécies, assim como a produção de metabólitos secundários. A micropropagação é realizada em meio nutritivo semi-sólido que contém agentes gelificantes, sendo os mais utilizados o ágar e a gelana. Esses polissacarídeos são importados e por esta razão encarecem ainda mais as técnicas de micropropagação. Uma alternativa para a redução de custos é a substituição parcial desses agentes gelificantes por outros polissacarídeos (Lima et al., 2001)

Os meios sólidos ou semi-sólidos, tradicionalmente, são solidificados com ágar, um polissacarídeo extraído de algas marinhas, que é dissolvido em água fervente e gelificado na presença de cátions quando esfriado. Se for autoclavado em pH abaixo de 4,5, sofre hidrólise o que faz com que não se polimerize ao esfriar. A consistência do meio depende da concentração de ágar utilizado (normalmente na faixa de 0,4 a 1,0% p/v para cultura de tecidos de plantas), do pH, da concentração de sais (meios com menor concentração de sais

ficam menos sólidos do que meios com concentrações mais altas de sais minerais) e da presença de certas substâncias como carvão ativado, que interferem na gelificação. Por outro lado, altas concentrações de ágar, ou meios muito consistentes, podem limitar a difusão de nutrientes até o explante (Romberger & Tabor, 1971).

Uma diferença entre os agentes de solidificação esta nas impurezas que os acompanham, variando de acordo com a marca e com o grau de pureza (Kordan, 1988). Dados de vários fabricantes indicam concentrações de 1 a 2 mM Na⁺; 0,2 a 0,9 mM Ca⁺⁺ e 0,1 a 0,7 mM Mg⁺⁺ no ágar, bem como concentrações relativamente altas de sulfato e cloreto. O Boro também esta presente em concentrações fisiologicamente ativas, 1 a 12 ppm (Kordan, 1986). Uma nova classe de polímeros esta sendo usada com melhores resultados do que o ágar em algumas culturas, as gomas do tipo “gelan”, produzidas por certas bactérias e comercializadas com os nomes Gel-Gro (ICN Biochemicals) e Gelrite (Kelco Division of Merk & Co, Inc., comercializado como “Phyta-gel” pela Sigma Chemical Co.). Gelrite não contém materiais contaminantes, tais como compostos fenólicos, os quais podem ser tóxicos (Pierik, 1997). Estas gomas são polissacarídeos de ácido glucurônico, ramnose e glicose, com grupos O-acetil. Também solidificam ou gelificam na presença de cátions mono ou divalentes, numa reação termo-reversível. Os meios preparados com estas gomas utilizam, aproximadamente um quarto da concentração do ágar, para a mesma consistência, sendo os meios mais transparentes do que aqueles feitos com ágar. As gomas são atóxicas e resistem a degradação enzimática (Caldas et al., 1998). O “Gelrite” possui 30 vezes mais potássio e 40 vezes mais magnésio do que o Bacto-ágar (Pasqualetto et al., 1988). Apesar de surgirem novas alternativas para substituírem o ágar no meio de cultivo *in vitro*, o alto custo ainda limita o seu uso em cultivos comerciais.

O ágar tem sido preferido para gelificação de meios, embora o amido também tenha sido utilizado com vantagens na cultura de anteras e em explantes de tubérculos de *Solanum tuberosum* (Sorvari, 1986 a, b).

Quando amido de milho, cevada, arroz, trigo e batata foram usados como substituto do ágar para cultura de anteras de cevada, somente o amido de cevada proporcionou as condições físicas necessárias para manter o crescimento especialmente quando combinado com agaroses (Tiwari & Rahimbaev, 1992).

Bhattacharya et al. (1994) testaram a eficiência do amido de sagu (*Metroxylon sagu* Rottb.) e do ágar como agentes gelificantes na propagação de plantas de crisântemo (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev). Os resultados demonstraram que o aumento na porcentagem de peso fresco foi melhor nos meios gelificados com ágar do que nos meios com amido de sagu.

Embora já existam substitutos para o ágar, os preços ainda são muito elevados. O amido representa uma alternativa valiosa para o setor de micropropagação de plantas, porém estudos mais aprofundados são necessários para que se possam determinar diversos fatores que influenciem na qualidade do meio de cultura.

Ribeiro et al. (1996) relataram que o meio de amido proporcionou o suporte físico e a estabilidade exigida para a cultura *in vitro* de *Arabidopsis thaliana*, mediante o emprego de 7% de amido por litro de meio de cultura. A eficiência dessa mistura foi comprovada para a cultura, quando comparada com 7 outros agentes gelificantes: dois tipos de ágar, dois tipos de “gellam gum” e três tipos de agaroses. O meio de cultura contendo a nova proporção dos amidos de mandioca e feijão guandu induziu maior produção de biomassa em plantas intactas e aumentou o potencial morfo genético de células e tecidos cultivados.

3.4- Características da Mistura de Amido

O amido é quimicamente constituído por dois polissacarídeos estruturalmente diferentes, a amilose e a amilopectina, embora possa conter outros constituintes em menor quantidade que podem influenciar as propriedades dos grânulos. O amido tem como uma de suas aplicações a formação de gel, que o caracteriza como agente espessante; essa propriedade baseia-se em suas propriedades físicas e químicas e tem origem nas reações do amido com suas próprias moléculas ou com moléculas de outras substâncias (Lehninger et al., 1995). Algumas propriedades do amido estão diretamente correlacionadas com a qualidade do meio de cultivo *in vitro*, visto que o amido pode ser utilizado como agente gelificante.

A transparência/opacidade da pasta de amido é um atributo importante de qualidade deste produto e varia consideravelmente com a fonte botânica. Maiores teores de amilose no amido resultam em pastas mais opacas enquanto teores menores propiciam pastas mais claras (Ziembra, 1965). A transparência da pasta é afetada também pelo pH, presença de sais e procedimentos de solubilização (Greenwood, 1964).

Quando uma suspensão aquosa de amido é aquecida a certo nível de energia, as ligações relativamente fracas em áreas amorfas entre as micelas cristalinas dissociam-se, ocorrendo expansão tangencial e hidratação progressiva para formar, eventualmente, uma rede de moléculas altamente debilitada, mantidas juntas por micelas ainda persistentes (Ziembra, 1965). A temperatura de gelificação do amido refere-se a uma faixa, porque os grânulos de amido diferem não somente em tamanho e forma, mas também na energia necessária para que se produza a expansão (Hodge & Osman, 1985).

Quando a temperatura de uma suspensão de amido supera a margem de gelificação, os grânulos continuam expandindo-se, eventualmente embebendo toda a água livre e assim aglomeram-se uns aos outros, tornando a pasta de amido mais viscosa (Ziemba, 1965).

Acima da temperatura de gelificação o processo de expansão é irreversível devido a perda da estrutura cristalina no gel expandido. Entretanto, alguma ordem indefinida é mantida neste gel gelificado, a menos que haja rompimento mecânico, pois o poder de expansão é dependente da temperatura e é reproduzível (Morrison, 1995).

A transição de uma suspensão de amido em água para pasta, quando calor é aplicado, é acompanhada por um grande aumento de viscosidade. Alterações de viscosidade também acompanham a formação de gel pelo resfriamento das mesmas. Quando uma pasta de amido é deixada em repouso, sem agitação antes ou depois de esfriar, a tendência é que se estabeleçam ligações intermoleculares, formando um gel. As regiões de tais ligações nos géis aumentam em número durante o período de repouso tornando a rede mais firme e compacta, em diferentes graus segundo o número, tamanho e distribuição das regiões micelares (Hodge & Osman, 1985). A consistência das pastas de fécula de mandioca aumenta muito pouco sob resfriamento, indicando baixos potenciais de formação de gel (Rickard et al., 1991), ao contrário do que ocorre com cereais e leguminosas.

Os países tropicais possuem uma grande quantidade de espécies amiláceas pouco pesquisadas, e cujas características poderiam atender a nichos de mercado ainda não preenchidos. Essa hipótese se consolida quando se verifica que, das cinco matérias-primas mais utilizadas na produção mundial de amido, quatro são de origem tropical: batata, milho, mandioca e arroz. A probabilidade de se encontrar amidos nativos com propriedades específicas é bastante alta.

A mistura de amido utilizada neste trabalho foi baseada na mistura proposta pela patente PI 9003880-0, em nome da Fundação de Amparo a Pesquisa – FAPESP e da Universidade Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP, sendo inventora a Prof. Dra. Marney Pascoli Cereda. Essa patente propõe uma mistura de 50% p/v de amido de semente de feijão guandu (*Cajanus cajanus*) ou amido de pinhão (*Araucaria angustifolia*) e 50% de amido de mandioca (*Manihot esculenta Crantz*).

3.5- Mercado do Agente Gelificante

É estimado que o ágar contribui com o maior custo do meio de cultura. Na Índia, derivados de amido de sagu (*Metroxylon sagu*) têm custo inferior a 3% quando comparado ao preço do ágar, sendo uma alternativa de agente gelificante de baixo custo para a escala industrial de micropropagação (Bhattacharya et al., 1994). O preço do ágar na Índia e no Brasil podem ser observados nas Tabelas 3 e 4 respectivamente.

Tabela 03- Custo dos Agentes Gelificantes na Índia.

Agente Gelificante	Preço Aproximado (US\$/kg)	Quantidade para 1 litro meio cultura(g)	Preço/litro meio cultura (US\$)
Stigma purified ágar (n° A7921)	146,0	8,00	1,17
Hi-Media purified ágar (n° RM201)	144,0	7,00	1,01
Sagu (<i>Metroxylon sagu</i> Rottb)	0,5	130,00	0,06

Fonte: Bhattacharya et al., 1994

Tabela 04- Custo dos Agentes Gelificantes no Brasil.

Agente Gelificante	Preço Aproximado (US\$/kg)	Quantidade para 1 litro de meio cultura (g)	Preço/litro meio cultura (US\$)
Purificado A 7049	231,50	5,00	1,16
Type M – A6799	135,60	7,00	0,95
Type A – A6549	123,60	8,00	0,99
Mistura de Amidos *	1,05	70,00	0,073

Fonte: Sigma, 2001.

* valor calculado

O amido é uma alternativa de baixo custo entre os agentes gelificantes estudados. Seu uso é importante por representar uma redução de custo na escala industrial para a cultura de tecidos de plantas. O maior problema da sua utilização é a hidrólise causada pela planta caso esta tenha enzimas amilolíticas. Para contornar esse problema, a solução é aumentar a troca de ar no frasco e conseqüentemente a evaporação do excesso de água (Ribeiro, 1995).

3.6- Utilização da Sacarose *in vitro*

A sacarose é o carboidrato mais utilizado nos meios nutritivos, sendo que esse açúcar suporta as mais altas taxas de crescimento na maioria das espécies. A concentração de sacarose normalmente varia entre 1 - 3%, mas, por efeito da autoclavagem e do pH, sua concentração no meio pode variar, já que é hidrolizada em glicose e frutose, sendo que esses limites não são claros e esse problema pode tornar-se limitante para o explante ou para a planta (Cid, 2001).

Oliveira Junior et al. (2001) testaram duas fontes de carboidrato em células de *Rudgea jasminoides*, e observaram que o crescimento celular cessou quando os teores de açúcares atingiram valores muito baixos, observaram ainda que, a sacarose foi quebrada extracelularmente em glicose e frutose, sendo a glicose absorvida preferencialmente, enquanto a frutose foi acumulada no meio e somente utilizada quando os outros açúcares extracelulares atingiram níveis próximos a zero.

A sacarose por ser utilizada em grande quantidade no meio de cultura (1 a 3%), também representa um grande custo em laboratórios de micropropagação industriais. Dessa maneira novas fontes de carboidratos tem sido testada visando reduzir o custo de produção. Em diversos laboratórios comerciais, a sacarose P.A. vem sendo substituída por açúcar cristal comercial.

Kodym & Zapata (2001), relataram que o uso de açúcar comercial, tanto em cana de açúcar como de beterraba, em combinação com amido de milho ou batata, substituindo sacarose P.A. e ágar ou gelrite, reduziram em 90% o custo de produção de bananas por cultura de tecidos.

4- MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Biotecnologia Vegetal do Departamento de Química e Bioquímica, do Instituto de Biociências, da UNESP, em Botucatu.

4.1- Fase de Estabelecimento

4.1.1- Obtenção do Material Vegetal

O material utilizado como fonte de explante foi obtido no Centro de Raízes e Amidos Tropicais (CERAT)– UNESP. O genótipo utilizado foi o CNPH 314.

4.1.2- Obtenção dos Explantes

As raízes tuberosas foram lavadas em água corrente com a utilização de escova de cerdas macias para a completa remoção de detritos. Em seguida, foram colocadas em caixas plásticas (30 x 15 cm) contendo vermiculita, permanecendo em condições ambientais normais ($25 \pm 1^\circ\text{C}$) e recebendo irrigação duas vezes por semana até que os brotos atingissem um desenvolvimento satisfatório (7 – 15 cm), ou seja, por aproximadamente 30 dias.

4.1.3- Assepsia do Material

Selecionaram-se os brotos mais vigorosos e saudáveis, que foram lavados abundantemente em água corrente. Com auxílio do bisturi, estes foram seccionados em micro-estacas de 0,5 a 1,0 cm contendo uma ou duas gemas. Foram testadas três metodologias para a obtenção de uma completa assepsia do material vegetal.

Os segmentos nodais foram desinfestados em câmara de fluxo laminar, em sala asséptica. Na assepsia 1, os segmentos nodais foram submetidos a uma solução de hipoclorito de sódio comercial (Q-Boa, 2,5% de Cl ativo) a 40% durante 20 minutos sob agitação. A assepsia 2 foi semelhante à primeira, porém a solução de hipoclorito de sódio comercial foi a 50%, seguindo de uma solução contendo álcool 70% por um minuto. A assepsia 3 também foi semelhante a primeira, porém a solução de hipoclorito de sódio foi a 50%.

Nas três metodologias de assepsias testadas, após os explantes serem submetidos aos tratamentos denominados assepsia 1, 2 e 3, estes foram enxaguados três vezes em água deionizada estéril e em seguida inoculados em meio de cultura.

As metodologias de assepsias testadas podem ser observadas na Tabela 05 e o esquema geral de assepsias pode ser observado na Figura 01.

Tabela 05: Metodologias testadas para desinfestação de *Ipomoea batatas* L. durante a fase de estabelecimento

Assepsias	Concentração da Solução de Hipoclorito de Sódio * e Tempo Exposição	Tempo de Exposição a Solução de Álcool 70%
1	40% por 20'	-
2	50% por 20'	1'
3	50% por 20'	-

*Q-Boa, 2,5% de Cloro ativo.

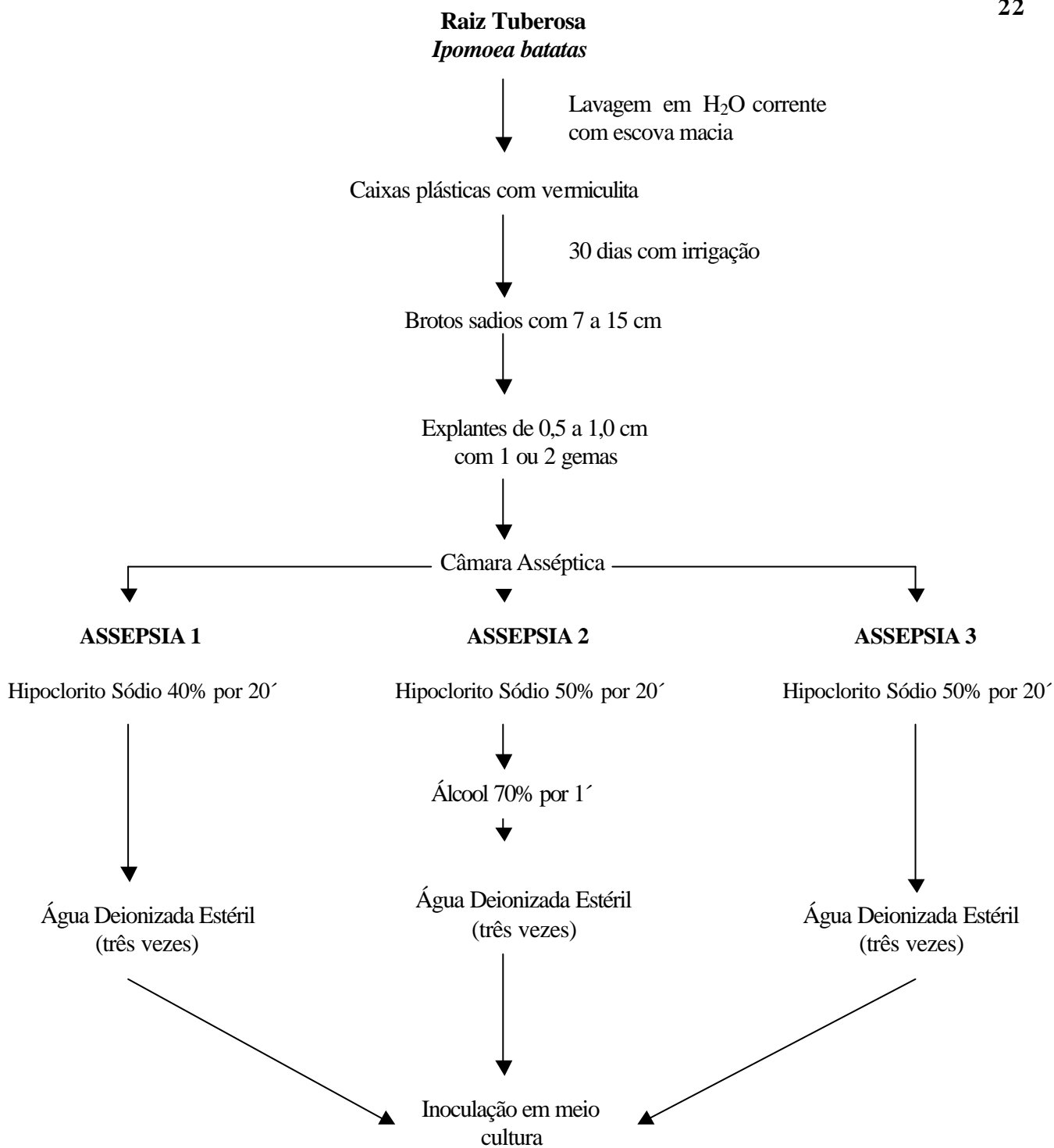


Figura 01: Esquema de metodologias de assepsia testadas no trabalho

4.1.4- Meio de Cultura para a Obtenção de Plantas

O meio de cultura utilizado consistiu nos sais básicos propostos por Murashige & Skoog (1962) conforme a Tabela 06, acrescido de 1 mg.L^{-1} de tiamina como fonte de vitaminas, suplementado com 30 g.L^{-1} de sacarose, 100 mg.L^{-1} de inositol, sendo solidificado com 6 g.L^{-1} de ágar. O pH foi ajustado para 5,8 e o meio autoclavado durante 15 minutos a $121 \text{ }^\circ\text{C}$ e 1,0 atm de pressão. Após a esterilização do material, os explantes, foram inoculados em tubos de ensaio contendo 15 ml de meio de cultura. Os tubos permaneceram em salas de crescimento assépticas com fotoperíodo de 16 horas, intensidade luminosa de 2000 lux e temperatura de $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$.

Ao final de 30 dias as plantas apresentavam um desenvolvimento satisfatório conforme mostra a Figura 02, podendo ser transferidas para o meio de multiplicação.



Figura 02: Planta de *Ipomoea batatas* L. obtida na fase de estabelecimento, após 30 dias em meio ? S básico.

4.2- Fase de Multiplicação *in vitro*

As plantas obtidas na fase de estabelecimento foram seccionadas em microestacas contendo de 1 a 2 gemas e transferidas para os diferentes tratamentos em câmara asséptica.

4.2.1- Obtenção da Mistura de Amido

A mistura de amido foi extraída no Centro de Raízes e Amidos Tropicais (CERAT) – UNESP. A fécula de mandioca foi adquirida no comércio local e o amido de feijão guandu foi extraído a partir de sementes conforme a Figura 03.

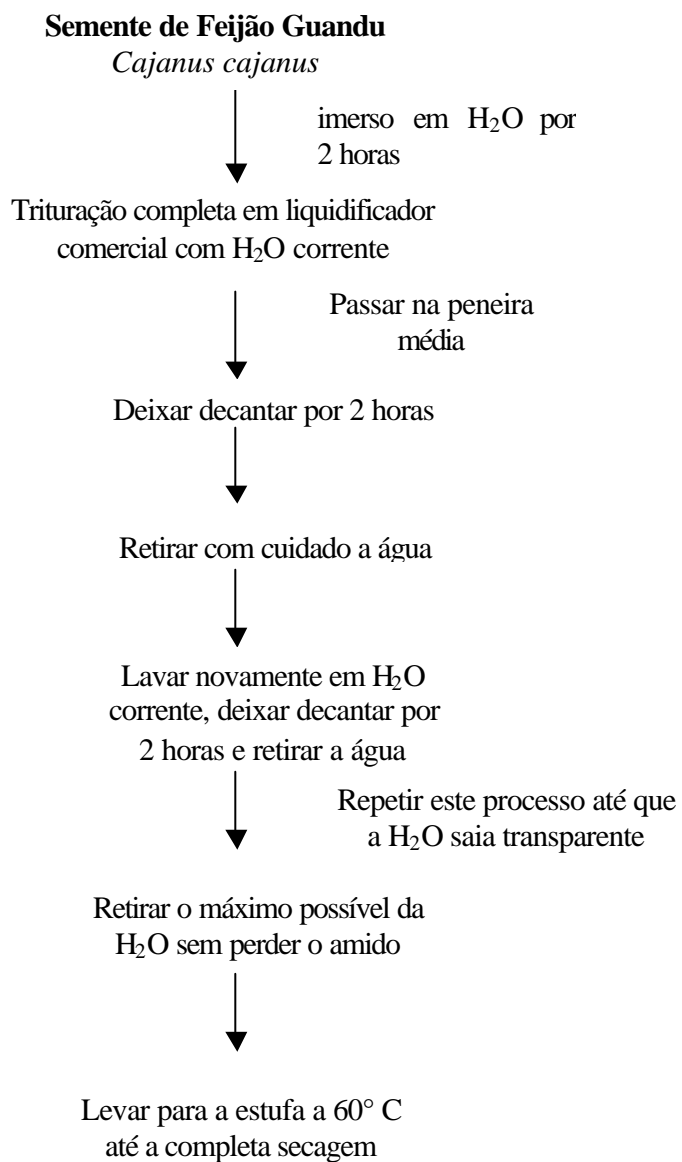


Figura 03: Esquema para retirada do amido da semente de feijão guandu (*Cajanus cajanus*).

4.2.2 – Meio de Cultura e Condições de Cultivo

O meio de cultura foi constituído pelos sais básicos de Murashige & Skoog (1962), suplementado com algumas vitaminas e carboidratos como mostra a Tabela 06.

Os agentes gelificantes utilizados no meio de cultura foram misturas de amidos, sendo 40% p/v de amido de semente de feijão guandu (*Cajanus cajanus*) e 60% p/v de amido de mandioca (*Manihot esculenta* Cratz) e ágar comercial, os quais juntamente com a sacarose, constituíram os tratamentos (Tabela 07).

A sacarose adicionada ao meio de cultura variou de acordo com os tratamentos, sendo utilizado dois tipos de sacarose: P.A. e açúcar cristal (Tabela 07).

O pH do meio foi ajustado para $5,8 \pm 0,2$. Após a adição do ágar o meio foi aquecido para sua completa dissolução. Os meios com adição da mistura de amidos, foram aquecidos até 75°C para sua completa dissolução. Em seguida, os meios foram autoclavados a 120°C e 1 atm de pressão durante 20 minutos.

No Tratamento 1, utilizou-se 30g.L^{-1} de sacarose P.A. e 0,6% de ágar Merck; no Tratamento 2, 30g.L^{-1} de sacarose P.A e 7% da mistura de amido; no Tratamento 3, 30g.L^{-1} de açúcar cristal e 0,6% de ágar Merck e no Tratamento 4, 30g.L^{-1} de açúcar cristal e 7% da mistura de amido.

Os meios foram distribuídos em frascos de vidro a um volume 40 ml de meio por frasco, que receberam três microestacas. Os frascos permaneceram em sala de crescimento asséptica com fotoperíodo de 16 horas, intensidade luminosa de 2000 lux e temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Tabela 06: Sais Componentes e Suplementação para Constituição do meio Básico de Murashige & Skoog (1962), modificado por Piza (1996)

Sais	Concentração (mg.L ⁻¹)
NH ₄ NO ₃	1650
KNO ₃	1900
CaCl ₂ .2 H ₂ O	440
MgSO ₄ .7 H ₂ O	370
K ₂ HPO ₄	170
Na ₂ EDTA	37,3
FeSO ₄ .7 H ₂ O	27,8
HBO ₃	6,2
MnSO ₄ .4 H ₂ O	22,3
ZnSO ₄ .7 H ₂ O	8,6
KI	0,83
NaMoO ₄ .2 H ₂ O	0,25
CuSO ₄ .5 H ₂ O	0,025
CoSO ₄ .6 H ₂ O	0,025
Suplementos	
Tiamina	0,5
L-inositol	100,0

Tabela 07: Composição do meio de cultura dos diferentes tratamentos durante a fase de multiplicação de *Ipomoea batatas* L.

Tratamentos	Agente Gelificante	Sacarose
T1	ágar 0,6%	P.A. - 30 g.L ⁻¹
T2	mistura amido 7%	P.A. - 30 g.L ⁻¹
T3	ágar 0,6%	açúcar Cristal – 30 g.L ⁻¹
T4	mistura amido 7%	açúcar Cristal – 30 g.L ⁻¹

4.3- Determinações Químicas e Bioquímicas

Foram realizadas nas plantas de batata doce, análises da massa fresca e teor de proteínas solúveis totais aos 10, 20 e 30 dias após a transferência para os diferentes meios que constituíram os tratamentos.

As análises de pH, condutividade elétrica e açúcar redutor foram realizadas nos meios nutritivos. Tanto o pH como condutividade foram medidos 4 horas após a autoclavagem dos meios de cultura e aos 10, 20 e 30 dias após a transferência das plantas para os meios definidos como tratamentos, enquanto que o açúcar redutor somente foi analisado aos 10, 20 e 30 dias. Esse fato se deve as possíveis mudanças de pH e minerais que podem ocorrer após a autoclavagem, os teores de açúcares redutores foram analisados aos 10, 20 e 30 dias porque poderia ocorrer degradação do amido, devido à exoenzimas oriundas das plantas.

4.3.1- Massa Fresca

O material vegetal (planta inteira) foi coletado, lavado para a retirada do meio de cultura aderente as raízes, secos com papel toalha e pesados em balança analítica. Os resultados foram expressos em gramas (g).

4.3.2- Teor de Proteína Solúveis Totais

Os teores de proteínas solúveis totais foram determinados nas plantas inteiras (parte aérea e raiz).

As amostras foram obtidas a partir da maceração da matéria fresca em 5ml de tampão fosfato pH 6,7 0,2M gelado, seguida de centrifugação por 20 minutos a 4°C, onde obteve-se o extrato bruto. O sobrenadante foi utilizado para a determinação do teor protéico.

De acordo com o método de BRADFORD (1976), as análises foram conduzidas utilizando 100 µl da amostra (sobrenadante) e 5 ml do reativo de Bradford seguido de 5 minutos de repouso. As leituras foram efetuadas em espectrofotômetro a 595 nm, e comparadas com a curva padrão de caseína, sendo o teor protéico da amostra expresso em µg de proteína . g de matéria fresca⁻¹.

4.3.3- Determinação de Açúcares Redutores

Para determinação dos açúcares totais utilizou-se o método da antrona proposto por Yemm e Willis (1954), com algumas modificações. Amostras do meio de cultura foram coletadas e diluídas 6 vezes em água deionizada estéril, 1ml desta solução foi colocado em tubo de ensaio permanecendo 5 minutos em água com gelo. Após esse período adicionou-se 5 ml do reagente de antrona, permanecendo por mais 5 minutos em água com gelo, após agitação suave, os tubos foram colocados em banho-maria a 100 °C por 10 minutos. As leituras foram efetuadas em espectrofotômetro a 620 nm e comparadas com a curva padrão de frutose sendo o resultado expresso em µg de frutose.

4.3.4- pH

O valor do pH foi determinado de acordo com o método descrito por Bhattacharya et al. (1994). Após a coleta da planta (0, 10, 20 e 30 dias) o pH foi determinado colocando-se o potenciômetro diretamente no meio de cultura.

4.3.5- Condutividade Elétrica

A condutividade elétrica foi determinada de acordo com o método descrito por Bhattacharya et al. (1994), com algumas modificações. Após cada coleta (0, 10, 20 e 30 dias) foram selecionados 5g do meio de cultura e homogenizados em 15ml de água destilada. A seguir foi determinada a condutividade em condutivímetro digital com compensação automática de temperatura, sendo expressa em $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$.

4.4- Delineamento Experimental

O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado, sendo cada tratamento composto por 4 repetições.

O experimento foi conduzido por 30 dias, onde foram realizadas 4 coletas, com intervalos de 10 dias. Em cada coleta e nos 4 tratamentos, 3 plantas foram removidas aleatoriamente, sendo analisados o meio de cultura (agente de contaminação, pH, condutividade elétrica, açúcares redutores) e a planta (número de plantas com raiz e parte aérea, massa de matéria fresca e proteínas solúveis totais).

5- RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1- Fase de Estabelecimento

5.1.1- Porcentagem de Contaminação e Desenvolvimento das Gemas

A porcentagem de contaminação foi obtida através de análise visual, sendo determinada aos 30 dias de desenvolvimento a quantidade de frascos contaminados por fungos e bactérias e o desenvolvimento através do número de gemas com desenvolvimento de parte aérea e do número de plantas com desenvolvimento de raiz.

Um dos fatores limitantes ao sucesso da micropropagação *in vitro* é a adequação da metodologia de assepsia dos explantes. Segundo Grattapaglia e Machado (1990), uma das dificuldades da micropropagação reside no fato de se obter um explante descontaminado sem conduzi-lo a morte, quando isolado.

A assepsia 2, usando solução de hipoclorito de sódio comercial (Q-boa com 2,5% de Cloro ativo) a 50% seguido de imersão em álcool 70% por um minuto, foi satisfatória para a desinfestação e desenvolvimento adequado dos explantes (Quadro 01).

Das 45 microestacas inoculadas em cada tratamento, observou-se a contaminação por fungo em 20% dos explantes na assepsia 1, ausência de contaminação na assepsia 2 e resultados semelhantes ao da assepsia 1 foi notado para a assepsia 3 após 30 dias de desenvolvimento.

O Cloro é o princípio ativo mais utilizado na forma de hipoclorito de sódio para a desinfestação de explantes em cultura de tecidos, mas a utilização de outras soluções desinfestantes devem ser consideradas, porém podem ser menos efetivas (Sweet e Bolton, 1979).

A contaminação por bactérias ocorreu em 40% dos explantes na assepsia 1 e 20% tanto na assepsia 2 como na assepsia 3. Os resultados obtidos podem ser observados no Quadro 01 e na Figura 04.

A contaminação por fungos muitas vezes esta associada a falhas na manipulação do material vegetal utilizado, assim como a esterilização inadequada de vidrarias ou instrumentos utilizados nos procedimentos laboratoriais. A contaminação por bactérias está associada a microorganismos endógenos presentes nos tecidos vegetais, justificando a maior contaminação por bactérias, as quais podem muitas vezes ser de origem endógena (Piza,

2000), como é muito comum em plantas de batata doce. Neste trabalho, a alta taxa de contaminação por bactérias encontrada, principalmente na assepsia 1 (40% hipoclorito de sódio por 20 minutos) e nas demais, mesmo em menor proporção, pode ser devido a presença de bactérias endógenas e a falta de antibióticos.

Quadro 01: Resultado das assepsias testadas na fase de estabelecimento da cultura de *Ipomoea batatas* L. aos 30 dias de desenvolvimento.

Assepsias	Total de Gemas	Contam. Fungo	Contam. Bactéria
1	45	9	18
2	45	—	9
3	45	9	9
TOTAL	135	18	36

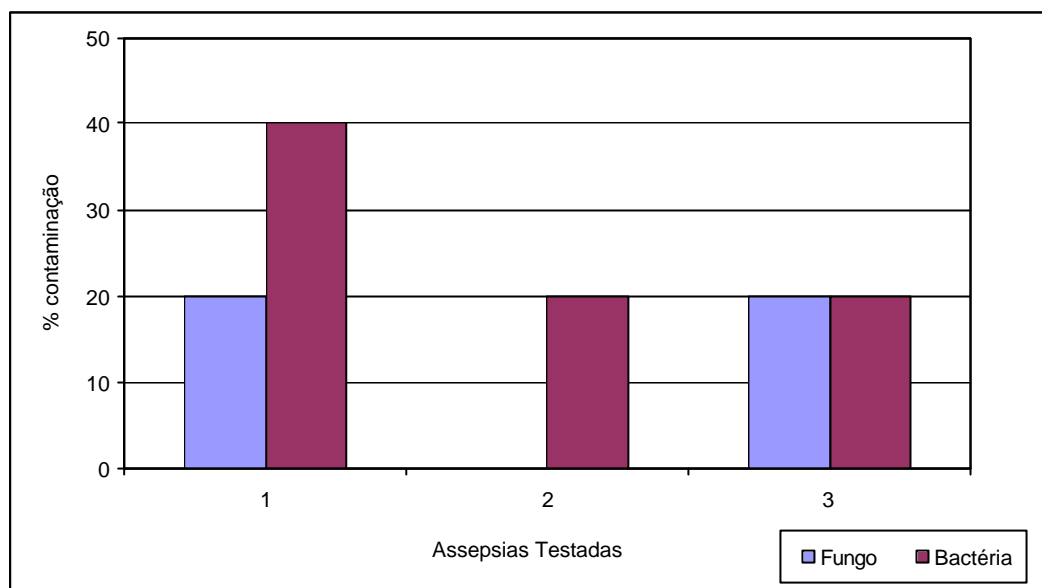


Figura 04: Porcentagem de contaminação nas diferentes Assepsias aos 30 dias de desenvolvimento de *Ipomoea batatas* L. durante a fase de estabelecimento

Em relação ao desenvolvimento das gemas foi observado que após 30 dias de estabelecimento, 33% dos explantes que foram submetidos a Assepsia 2 e 3 apresentaram gemas desenvolvidas (com emissão de raiz e parte aérea). Pode-se notar na Figura 05 e no Quadro 02 que a Assepsia 2 e a Assepsia 1 promoveram os maiores números de gemas com emissão de parte aérea (20%) e a Assepsia 2 promoveu o maior número de gemas com emissão de raiz (13%) seguida da Assepsia 3 (11%).

Quadro 02: Resultado das desenvolvimento dos explantes durante fase de estabelecimento da cultura de *Ipomoea batatas* L. aos 30 dias de desenvolvimento.

Assepsias	Gemas c/ emissão de parte aérea	Gemas c/ emissão de raiz	Total de gemas desenvolvidas *
1	9	4	9
2	9	6	15
3	6	5	15
TOTAL	24	15	39

* foram considerados as plantas com desenvolvimento de raiz e parte aérea

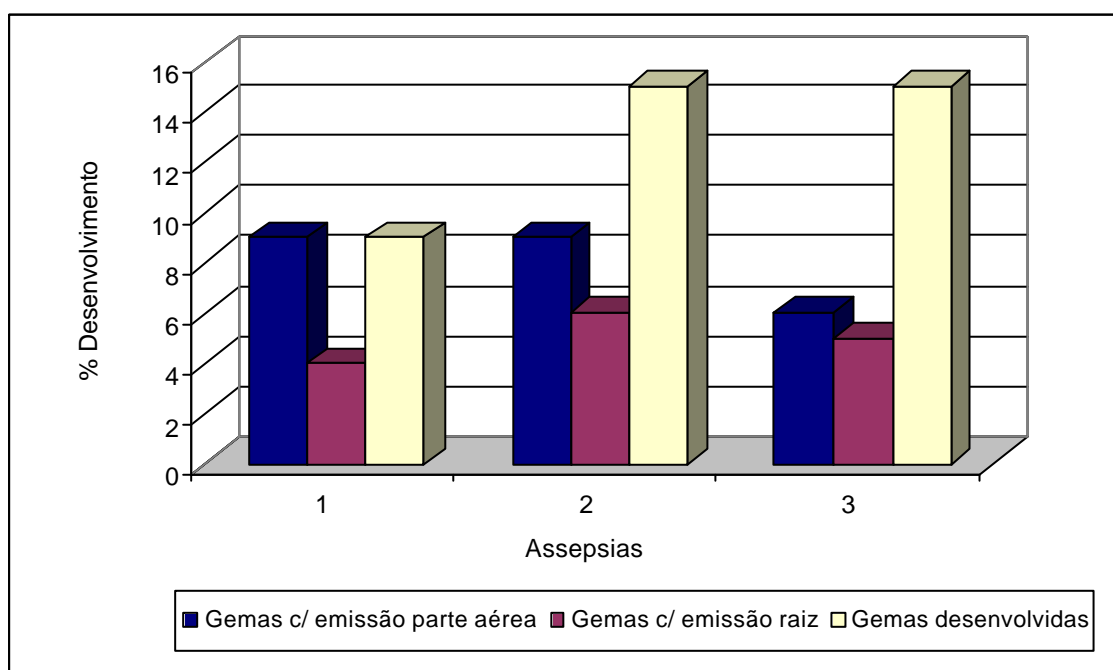


Figura 05: Porcentagem de gemas desenvolvidas, com emissão de parte aérea e com emissão de raízes nas diferentes Assepsias aos 30 dias de desenvolvimento de *Ipomoea batatas* L. durante a fase de estabelecimento.

5.2- Fase de Multiplicação

5.2.1- Massa Fresca

Durante a fase de multiplicação, a cada coleta (10, 20 e 30 dias) foram realizadas pesagens do material coletado a fim de se construir uma curva de crescimento do material submetido a cada um dos tratamentos.

As análises estatísticas que foram realizadas para massa fresca aos 0 (explante inicial), 10, 20 e 30 dias estão apresentadas no Quadro 03, 04, 05 e 06 respectivamente.

Quadro 03: Valores médios obtidos para massa de matéria fresca (g) de *Ipomoea batatas* L. nos explantes iniciais (0 dias) na fase de multiplicação.

Tratamentos	Médias (g)
T1 - ágar 0,6% + sacarose	0,0350 ^a
T2 – amido 7% + sacarose	0,0450 ^a
T3 – ágar 0,6% + açúcar	0,0267 ^a
T4 – amido 7% + açúcar	0,0342 ^a

As médias seguidas de mesma letra na vertical não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

Quadro 04: Valores médios obtidos para massa de matéria fresca (g) de *Ipomoea batatas* L. aos 10 dias de desenvolvimento durante a fase de multiplicação.

Tratamentos	Médias (g)
T1 - ágar 0,6% + sacarose	0,0496 ^a
T2 – amido 7% + sacarose	0,0659 ^a
T3 – ágar 0,6% + açúcar	0,0256 ^a
T4 – amido 7% + açúcar	0,0715 ^a

As médias seguidas de mesma letra na vertical não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

De acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$), os tratamentos não promoveram resultados que diferiram significativamente entre si aos explantes iniciais e aos 10 dias de desenvolvimento, porém aos 10 dias de desenvolvimento nota-se maior teor de massa fresca nos tratamentos T2 e T4

Quadro 05: Valores médios obtidos para matéria fresca (g) de *Ipomoea batatas* L. aos 20 dias de desenvolvimento durante a fase de multiplicação.

Tratamentos	Médias (g)
T1 - ágar 0,6% + sacarose	0,1373 ^a
T2 – amido 7% + sacarose	0,2250 ^a
T3 – ágar 0,6% + açúcar	0,0948 ^a
T4 – amido 7% + açúcar	0,1325 ^a

As médias seguidas de mesma letra na vertical não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

Os tratamentos promoveram resultados semelhantes aos obtidos aos 10 dias, isto é, não promoveram resultados que diferiram significativamente entre si aos 20 dias de desenvolvimento, entretanto no tratamento T3 pode-se notar o menor teor de massa fresca, também semelhante aos valores obtidos aos 10 dias de desenvolvimento.

Quadro 06: Valores médios obtidos para massa de matéria fresca (g) de *Ipomoea batatas* L. aos 30 dias de desenvolvimento durante a fase de multiplicação.

Tratamentos	Médias (g)
T1 - ágar 0,6% + sacarose	0,1465 ^{bc}
T2 – amido 7% + sacarose	0,4339 ^a
T3 – ágar 0,6% + açúcar	0,0320 ^c
T4 – amido 7% + açúcar	0,2093 ^b

As médias seguidas de mesma letra na vertical não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

Pela análise dos resultados, nota-se que os tratamentos promoveram resultados que diferiram significativamente entre si aos 30 dias de desenvolvimento. Nesta fase as plantas sob o efeito do tratamento 2 apresentaram massa fresca superior àquelas cultivadas nos tratamentos 4, 1, 3 nesta ordem. O tratamento 2 também promoveu maior massa fresca aos 10 dias de desenvolvimento e o tratamento 3 mostra a mesma tendência observada nas coletas anteriores, isto é, menor desenvolvimento.

Estes resultados podem ser melhor visualizados na Figura 06, onde observa-se que os tratamentos 2 e 4 que continham como agente gelificante a mistura de amido promoveram maior acúmulo de massa de matéria fresca, principalmente o tratamento 2 quando comparados aos tratamentos com ágar.

É bem conhecido que o ágar como agente gelificante pode afetar positiva ou negativamente o crescimento e desenvolvimento de plantas cultivadas *in vitro* (Soltz, 1971; Romberger & Tabor, 1971).

A sensibilidade das espécies vegetais ao ágar é determinada por fatores complexos, que incluem os minerais presentes, compostos inibidores, força iônica, entre outros (Sihachakr, 1982; Scholten & Pierik, 1998; Kohlenvach & Wernicke, 1978). Um problema relacionado ao ágar que causa diminuição na produtividade das plantas in vitro é a vitrificação (Pasqualetto et al., 1986; Pierik et al., 1997).

Algumas culturas não são sensíveis ao tipo de ágar utilizado, como *Gubera* e *Syringa*, nesses casos, provavelmente o vigor das culturas é alto o suficiente para serem afetadas pela qualidade do ágar (Scholten & Pierik, 1998). De acordo com diversos estudos, nenhuma relação foi descrita entre o preço e a qualidade dos ágars testados (Merck 1614, Daishin, DifcoBacto, MC29, Bacto Dickinson grade A, Bacto Dickinson granulado e Bacto Dickinson purificado) (Scholten & Pierik, 1998) e a performance de ágars pode ser melhorada pela lavagem antes do uso (Shillito et al., 1983).

Neste trabalho, a batata doce foi sensível ao ágar utilizado, mantendo menor crescimento e desenvolvimento em relação a mistura de amido, mesmo utilizando-se o ágar Merck 1614 considerado por Scholten & Pierik, (1998) um bom agente gelificante e um dos que mostrou melhores resultados em experimentos com substâncias solidificantes no desenvolvimento de *Lilium*, *Rosa* e *Sulcorebutia* (cactus). Provavelmente o ágar imobilizou nutrientes através de ligações químicas (Scholten & Pierik, 1998), em relação ao amido, o que teria promovido menor crescimento.

Em relação a fonte de energia, a sacarose P.A. parece ter promovido melhores resultados do que o açúcar cristal, tanto no meio solidificado com ágar como no solidificado com a mistura de amido. Embora os resultados tenham demonstrado que aos 10 e aos 20 dias de desenvolvimento as diferenças de crescimento não eram significativas, nota-se

que ao longo do desenvolvimento, essas diferenças se tornaram significativas podendo ser um fator determinante do ponto de vista econômico, pois observando-se os resultados obtidos da mistura de amido com o açúcar cristal, estes mostraram melhores resultados do que nos dois tratamentos com ágar.

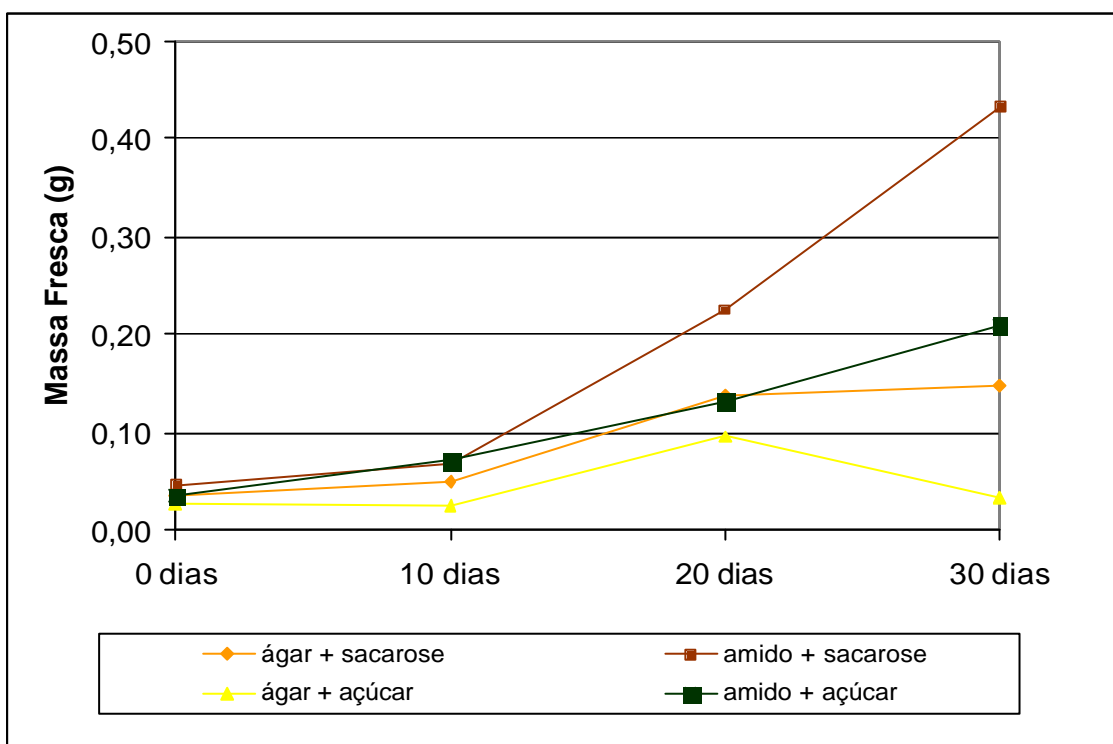


Figura 06: Curva de crescimento em cada Tratamento, durante a fase de multiplicação de *Ipomoea batatas* L. baseada em massa fresca.

Desta maneira pode-se inferir que a mistura de amido representa uma boa alternativa para a substituição do ágar como agente gelificante na micropropagação de plantas de batata doce.

As Figuras 07 e 08 demonstram as diferenças de crescimentos entre os tratamentos, onde além do desenvolvimento diferenciado da parte aérea nos meios contendo amido, as raízes também mostram-se mais grossas e curtas, com maior número de pelos, o que poderia dar condições melhores de adaptação na aclimação.



Figura 07: Planta de *Ipomoea batatas* L. aos 30 dias de desenvolvimento durante a fase de multiplicação, sob efeito dos tratamentos 1(ágar 0,6% e sacarose) e tratamento 2 (amido 7% e sacarose).



Figura 08: Planta de *Ipomoea batatas* L. aos 30 dias de desenvolvimento durante a fase de multiplicação, sob efeito do tratamento 3 (ágar 0,6% e açúcar cristal) e tratamento 4 (amido 7% e açúcar cristal).

5.2.2-Proteínas Solúveis Totais

Os Quadros 07, 08 e 09 apresentam as análises de variância e os resultados do teste de Tukey para o teor de proteínas solúveis totais.

Quadro 07: Valores médios obtidos para teor de proteínas solúveis totais nos explantes de *Ipomoea batatas* L. aos 10 dias de desenvolvimento.

Tratamentos	Médias (mg.g ⁻¹)
T1 - ágar 0,6% + sacarose	1.722,56 ^a
T2 – amido 7% + sacarose	1.824,38 ^a
T3 – ágar 0,6% + açúcar	1.780,53 ^a
T4 – amido 7% + açúcar	1.169,48 ^b
CV% 4,5	

As médias seguidas de mesma letra na vertical não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

De acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$) os tratamentos promoveram resultados que diferiram significativamente entre si aos 10 dias de desenvolvimento, sendo que o tratamento 2 mesmo não diferindo significativamente dos tratamentos 1 e 3 foi o que promoveu maior teor protéico nos explantes.

Quadro 08: Valores médios obtidos para teor de proteínas solúveis totais nos explantes de *Ipomoea batatas* L. aos 20 dias de desenvolvimento.

Tratamentos	Médias (mg.g ⁻¹)
T1 - ágar 0,6% + sacarose	1.896,27 ^b
T2 – amido 7% + sacarose	2.007,26 ^a
T3 – ágar 0,6% + açúcar	1.913,86 ^b
T4 – amido 7% + açúcar	1.515,69 ^c

CV% 2,17

As médias seguidas de mesma letra na vertical não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

Aos 20 dias de desenvolvimento obteve-se resultados semelhantes aos obtidos aos 10 dias de desenvolvimento, onde pode-se notar que o tratamento 2 diferiu significativamente dos demais tratamentos seguido pelos tratamentos 3, 1 e 4 respectivamente. As plantas de batata doce sob efeito do tratamento 4 (amido 7% + açúcar) apresentaram menor teor protéico.

Quadro 09: Valores médios obtidos para teor de proteínas solúveis totais nos explantes de *Ipomoea batatas* L. aos 30 dias de desenvolvimento.

Tratamentos	Médias (mg.g ⁻¹)
T1 - ágar 0,6% + sacarose	2.085,20 ^b
T2 – amido 7% + sacarose	2.578,20 ^a
T3 – ágar 0,6% + açúcar	1.881,02 ^b
T4 – amido 7% + açúcar	1.832,37 ^b

CV% 6,91

As médias seguidas de mesma letra na vertical não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

Aos 30 dias de desenvolvimento obteve-se resultados semelhantes aos resultados obtidos aos 20 dias. O tratamento 2 continuou diferindo significativamente dos demais, seguidos pelos tratamentos 1, 3 e 4 respectivamente.

A Figura 9 apresenta a variação do teor protéico dos explantes submetidos aos diferentes tratamentos durante a fase de desenvolvimento.

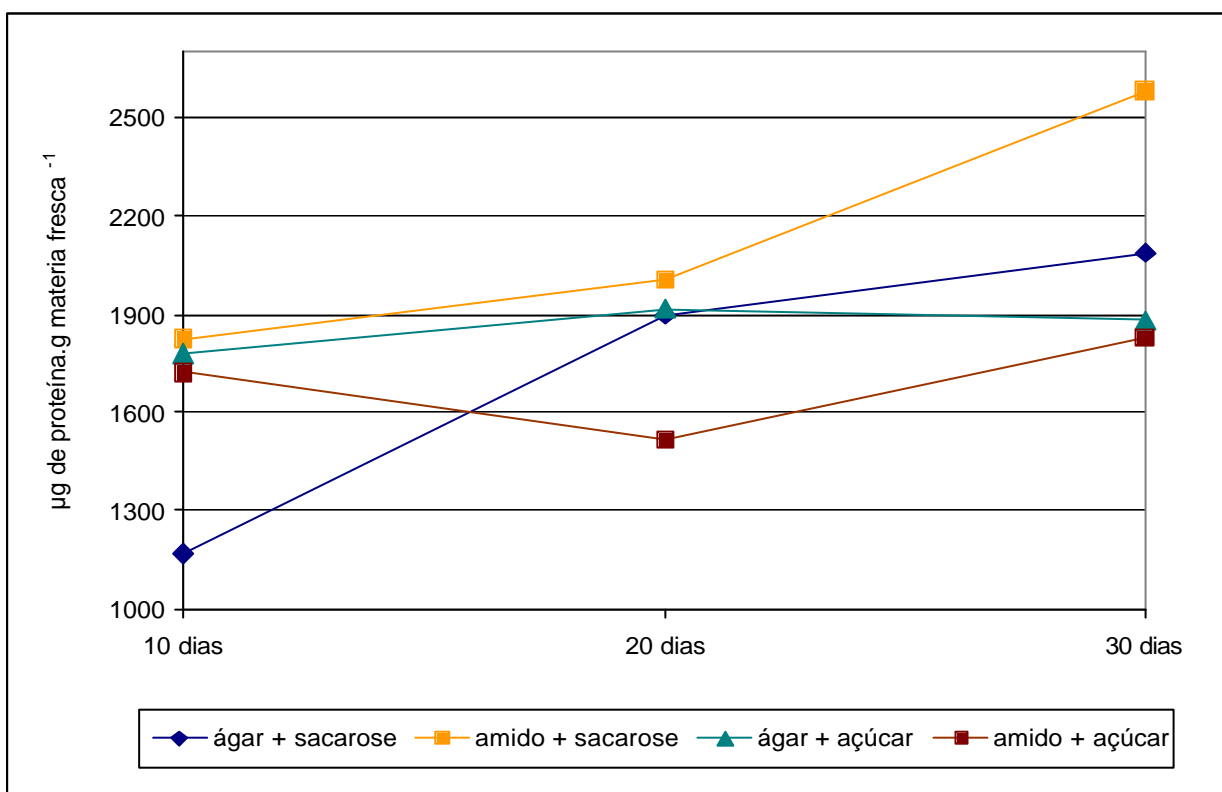


Figura 09: Variação do teor de proteína solúveis totais em cada Tratamento, durante a fase de multiplicação de *Ipomoea batatas* L.

Observando-se a Figura 09 pode-se notar que o teor máximo de proteína ocorreu aos 30 dias, com exceção do tratamento 3 (ágar com açúcar cristal) que não mostrou variação em relação aos 20 dias.

Diante dos resultados, o amido combinado com sacarose, teria promovido o melhor desenvolvimento para a batata doce, como observado anteriormente, isto é, massa de matéria fresca, quando analisada através de proteínas solúveis totais.

O teor de proteínas em plantas tem sido demonstrado por vários pesquisadores, estar diretamente relacionado com os processos de divisão celular e crescimento. Blanco et al. (1997) verificaram que a análise de proteína total solúvel poderia possivelmente servir como indicador de estádios específicos de desenvolvimento em vegetais.

Estas observações podem ser confirmadas em diversos trabalhos, como o de Syōno (1965) onde constatou inibição da formação de brotos em calos de cenoura, quando utilizou cloramfenicol, um inibidor de síntese protéica.

5.2.3- Determinação de Açúcares Redutores

Os Quadros 10, 11 e 12 e 13 apresentam as análises de variância e os resultados do teste de Tukey para o teor de açúcares totais.

Quadro 10: Valores médios de açúcares redutores no meio de cultura após a autoclavagem durante a fase de desenvolvimento de *Ipomoea batatas* L.

Tratamentos	Médias (mg.g ⁻¹)
T1 - ágar 0,6% + sacarose	1.641,75 ^{ab}
T2 – amido 7% + sacarose	1.667,50 ^{ab}
T3 – ágar 0,6% + açúcar	1.704,50 ^a
T4 – amido 7% + açúcar	1.555,50 ^b
CV% 3,67	

As médias seguidas de mesma letra na vertical não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

De acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$) os tratamentos apresentaram variações significativas. O tratamento 3 apresentou os maiores teores de açúcares redutores não diferindo significativamente dos tratamentos 1 e 2. O tratamento 4 foi o que resultou em menores teores de açúcares redutores e também não apresentaram diferença significativa em relação aos tratamentos 1 e 2.

Quadro 11: Valores médios de açúcares redutores no meio de cultura aos 10 dias de desenvolvimento de *Ipomoea batatas* L.

Tratamentos	Médias (mg.g ⁻¹)
T1 - ágar 0,6% + sacarose	2.872,70 ^a
T2 – amido 7% + sacarose	2.515,46 ^a
T3 – ágar 0,6% + açúcar	2.608,22 ^a
T4 – amido 7% + açúcar	2.227,30 ^a

CV% 19,29

As médias seguidas de mesma letra na vertical não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

De acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$) os tratamentos promoveram resultados que não diferiram significativamente entre si aos 10 dias de desenvolvimento, porém houve uma tendência do tratamento 1 em manter maior teor de açúcares redutores.

Quadro 12: Valores médios de açúcares redutores no meio de cultura aos 20 dias de desenvolvimento de *Ipomoea batatas* L.

Tratamentos	Médias (mg.g ⁻¹)
T1 - ágar 0,6% + sacarose	3.455,92 ^a
T2 – amido 7% + sacarose	2.710,85 ^{bc}
T3 – ágar 0,6% + açúcar	3.164,80 ^{ab}
T4 – amido 7% + açúcar	2.505,59 ^c

CV% 9,18

As médias seguidas de mesma letra na vertical não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

Aos 20 dias de desenvolvimento os tratamentos apresentaram variações significativas. Os tratamentos 1 e 3 mostraram os maiores teores de açúcares redutores e não apresentaram diferença significativa.

Quadro 13: Valores médios de açúcares redutores no meio de cultura aos 30 dias de desenvolvimento de *Ipomoea batatas* L.

Tratamentos	Médias (mg.g ⁻¹)
T1 - ágar 0,6% + sacarose	3.026,64 ^a
T2 – amido 7% + sacarose	2.845,06 ^{ab}
T3 – ágar 0,6% + açúcar	3.097,70 ^a
T4 – amido 7% + açúcar	2.548,02 ^b
CV% 6,91	

As médias seguidas de mesma letra na vertical não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

Aos 30 dias de desenvolvimento ocorreram resultados semelhantes aos resultados obtidos aos 20 dias. Os tratamentos também mostraram diferenças significativas, sendo que o tratamento 3 foi o apresentou maiores teor de açúcar redutor não diferindo não diferindo apenas do tratamentos 4, o qual mostrou o menor teor de açúcar redutor.

A Figura 10 apresenta a variação dos valores médios de açúcares redutores obtidos nos meios de cultura, durante o desenvolvimento de *Ipomoea batatas* L. durante a fase de desenvolvimento.

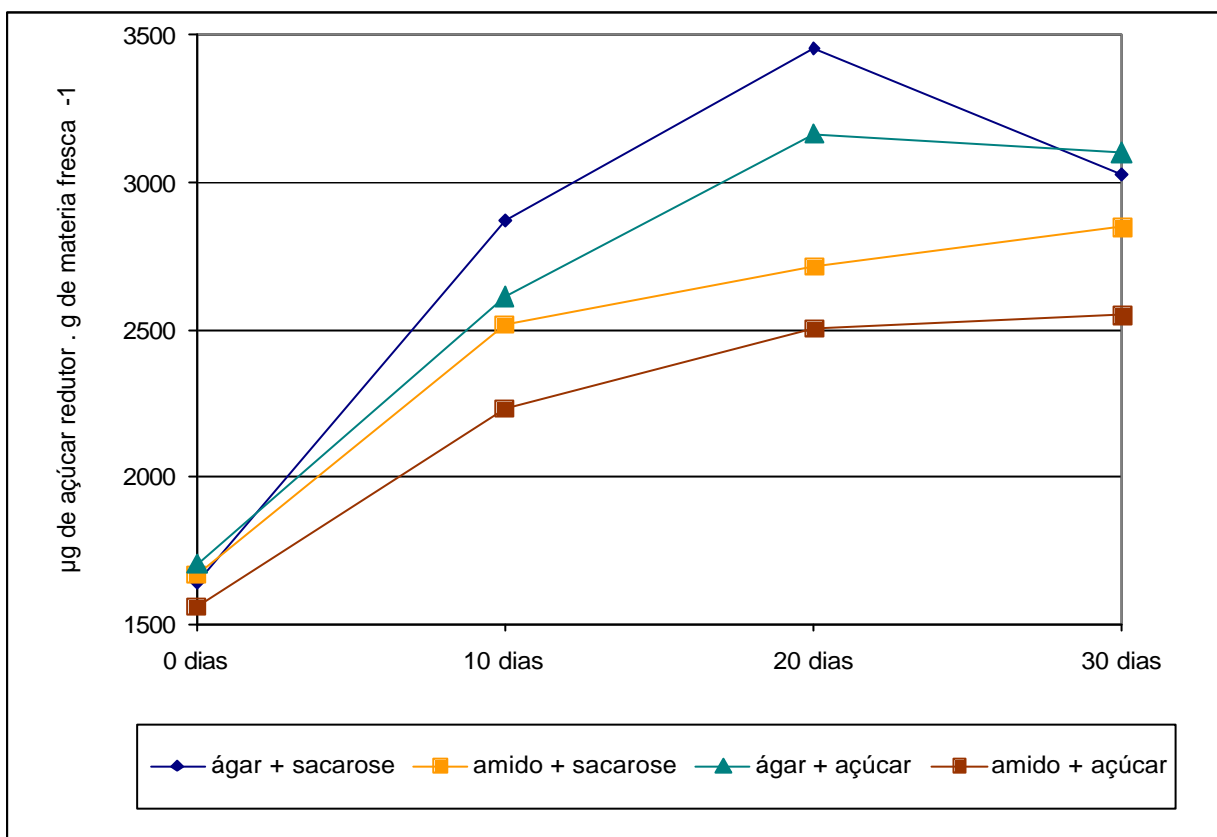


Figura 10: Variação da quantidade de açúcares redutores totais no meio de cultura durante a fase de multiplicação de *Ipomoea batatas* L.

Observando-se a Figura 10 pode-se notar que os tratamentos que utilizaram o ágar como agente gelificante no meio de cultura apresentam um pico no teor de açúcar redutor aos 20 dias de desenvolvimento da cultura, decrescendo aos 30 dias de desenvolvimento. Os tratamentos que possuem a mistura de amido como agente gelificante mostram aumento gradativo no teor de açúcar redutor, embora o teor seja menor, quando comparado aos tratamentos com ágar.

O uso de sacarose PA ou comercial não promoveu resultados que pudessem diferenciá-lo, para a característica de açúcar redutor no meio de cultura.

Açúcares são fonte de carbono disponível para as plantas cultivadas *in vitro*, especialmente nos primeiros estádios, onde há necessidade de alta energia e esqueleto carbônico para que haja divisão celular e desenvolvimento, pois a taxa fotossintética ainda é pequena, não suprimindo a necessidade da célula. Em alguns trabalhos, há relatos de que a substituição de sacarose por glicose principalmente durante a última fase do cultivo *in vitro* (enraizamento e pré aclimatação) pode aumentar a fotossíntese (Ziv, 1995).

De acordo com Vinã et al. (1999) o tipo de açúcar é importante para o desenvolvimento de espécies vegetais *in vitro*. Capellades et al. (1990, 1991) observaram maior acúmulo de amido e menor taxa de fotossíntese em folhas micropropagadas de *Rosa* sp crescidas em meio contendo altas concentrações de sacarose.

Assim em relação aos resultados encontrados, plantas mantidas em meio contendo ágar apresentaram aumento do açúcar redutor, assim como as cultivadas em meio com amido, aos 20 dias. Provavelmente, pode ter ocorrido hidrólise da sacarose em açúcar redutor. Entretanto, durante o desenvolvimento das plantas em meio com ágar, a disponibilidade desses açúcares diminui, o que não é notado para os meios contendo amido, o que poderia levar à uma hipótese de que possivelmente estaria ocorrendo uma degradação do amido, um polissacarídeo em açúcares simples (glicose e frutose).

5.2.4- pH

O valor do pH foi determinado diretamente no meio de cultura após cada coleta (4 horas após autoclavagem, 10, 20 e 30 dias).

Os meios nutritivos utilizados para cultura de células vegetais, por ocasião de seu preparo, são infestados por microorganismos existentes no ar, na água, nos recipientes e em outras fontes de contaminação. A assepsia do meio é obtida através da autoclavagem a 120° C por 20 minutos. Segundo Skirvin et al. (1986), há uma diminuição do pH, com a autoclavagem, de 0,3 a 0,5 unidades, em média, podendo chegar a 1,3 unidades. Durante o armazenamento dos meios, antes da sua utilização, também há uma tendência de acidificação, provavelmente devido a dissolução do gás dióxido de carbono (Mellor & Stace-Smith, 1969).

O Quadro 14 apresenta os resultados obtidos para o pH após 4 horas da autoclavagem. De acordo com os resultados, o tratamento 1 diferiu significativamente dos demais, sendo que o tratamento 3 seguido pelos tratamentos 4 e 2, foram os que tiveram menor variação em relação ao pH inicial antes da autoclavagem ($5,8 \pm 0,2$).

Quadro 14: Valores médios do pH obtidos 4 horas após a autoclavagem dos meios de cultura dos diversos tratamentos.

Tratamentos	Médias (g)
T1 - ágar 0,6% + sacarose	4,6950 ^b
T2 – amido 7% + sacarose	5,5500 ^a
T3 – ágar 0,6% + açúcar	5,8200 ^a
T4 – amido 7% + açúcar	5,5850 ^a
CV% 2,89	

Pasqualeto et al. (1988) observaram redução de pH após o processo de autoclavagem do meio de cultura na presença ou ausência de ágar. A autoclavagem causou decréscimo de pH de 0,1 unidade em meio ? S; em pH muito baixo (menos que 4), não houve alterações e se o pH fosse ajustado antes da autoclavagem, geralmente ocorria um decréscimo de 0,3 unidades durante as primeiras 24 horas e depois permanecia constante por um período de armazenagem de 48 horas, podendo ocorrer posteriormente novas mudanças ou acidificação. Estas mudanças poderiam ser causadas por desidratação do meio ou por precipitação de componentes minerais, ou ainda pela eliminação de íons pela planta para promover o equilíbrio de pH no meio.

Durante a micropropagação de *Maranta leucinera*, Ebrahim & Ibrahim (2000) observaram que pH levemente ácido é preferido para o crescimento e desenvolvimento, embora, pH 5,7 tenha resultado em uma taxa de multiplicação máxima (formação de brotos e diferenciação foliar), nem alongamento de parte aérea, nem enraizamento, apresentaram melhores resultados pela mudança do pH do meio.

Os Quadros 15 e 16 apresentam os resultados do teste de Tukey obtidos para o pH aos 10 e aos 20 dias de desenvolvimento respectivamente. De acordo com os resultados do teste de Tukey, o tratamento 3 diferiu significativamente dos demais tratamentos, nas duas épocas estudadas.

Quadro 15: Valores médios obtidos para pH nos meios de cultura dos diversos tratamentos aos 10 dias de desenvolvimento, na fase de multiplicação de *Ipomoea batatas* L.

Tratamentos	Médias (g)
T1 - ágar 0,6% + sacarose	4,6950 ^b
T2 – amido 7% + sacarose	4,8850 ^b
T3 – ágar 0,6% + açúcar	5,5725 ^a
T4 – amido 7% + açúcar	4,7600 ^b
CV% 3,94	

Quadro 16: Valores médios obtidos para pH nos meios de cultura dos diversos tratamentos aos 20 dias de desenvolvimento na fase de multiplicação de *Ipomoea batatas* L.

Tratamentos	Médias (g)
T1 - ágar 0,6% + sacarose	4,0775 ^b
T2 – amido 7% + sacarose	4,2025 ^b
T3 – ágar 0,6% + açúcar	5,3200 ^a
T4 – amido 7% + açúcar	4,2225 ^b
CV% 5,95	

O Quadro 17 apresenta os valores obtidos para o pH aos 30 dias de desenvolvimento. De acordo com os resultados do teste de Tukey, o tratamento 1 e 3 diferiram entre si e dos tratamentos 2 e 4, os quais não apresentaram variação significativa. Embora o tratamento 1 e 3 tenham diferido entre si, apresentaram os maiores valores de pH,

Singha (1982) observou que a presença de ágar no meio de cultura confere menor grau de acidez. A redução depende do valor do pH aferido antes da autoclavagem, e que mudanças nos valores de pH provocadas pela autoclavagem e pelo acondicionamento acontecem com maior intensidade nos valores de pH que variam entre 5,2 e 5,8. Entretanto o fato de conferir menor grau de acidez pelo ágar é observado no presente

trabalho, onde nota-se que o tratamento que contém ágar e açúcar comercial mantém os mais altos valores de pH durante toda a fase experimental, enquanto que ágar e sacarose P. A. mostram maior acidez

Quadro 17: Valores médios obtidos para pH nos meios de cultura dos diversos tratamentos 30 dias de desenvolvimento na fase de multiplicação de *Ipomoea batatas* L.

Tratamentos	Médias (g)
T1 - ágar 0,6% + sacarose	4,2350 ^b
T2 – amido 7% + sacarose	3,9650 ^c
T3 – ágar 0,6% + açúcar	5,2950 ^a
T4 – amido 7% + açúcar	4,0550 ^c
CV% 1,65	

A Figura 11 permite visualizar melhor os resultados obtidos. Pode-se observar que os tratamentos onde utilizou-se como agente gelificante o ágar (T1 e T3) foram os que mantiveram a melhor estabilidade do pH, porém, o uso de ágar e de açúcar cristal não promoveu grandes variações ou diminuição podendo ser este, um tratamento eficiente quando se busca uma pequena variação no pH. Os tratamentos que utilizaram a mistura de amido tiveram uma queda acentuada no valor do pH inicial, apresentando aos 30 dias os menores valores.

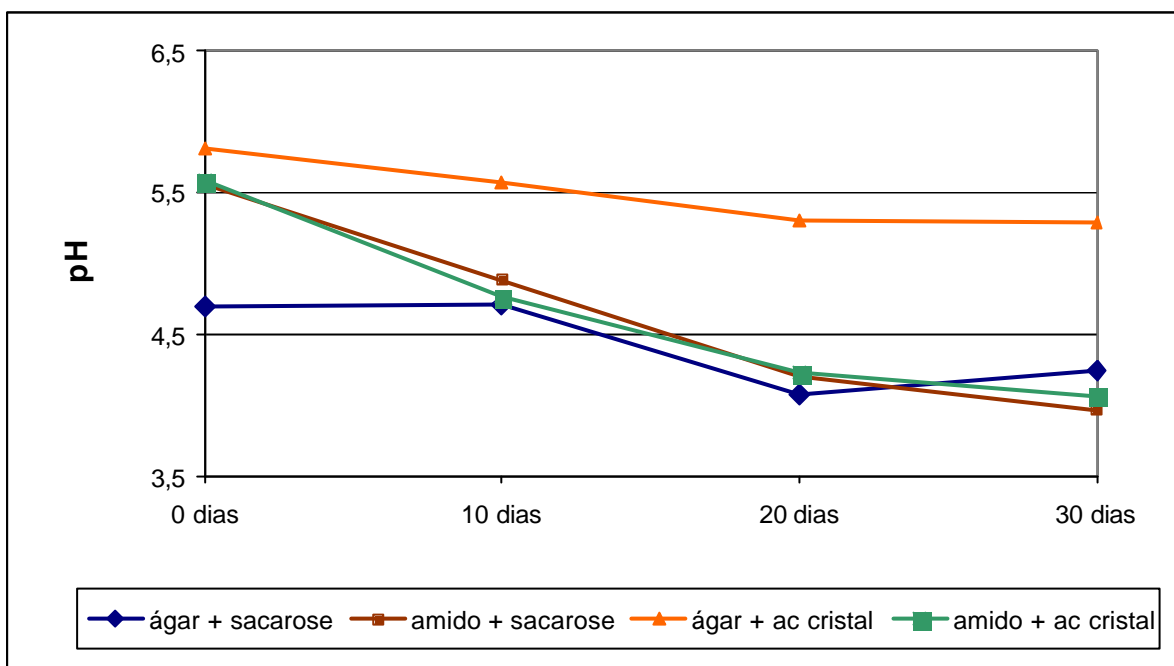


Figura 11: Valores médios de pH obtidos durante a fase de multiplicação de *Ipomoea batatas* L. nos diferentes tratamentos

Objetivando determinar as variações de pH que ocorrem durante o período de cultivo de cana de açúcar, Piza et al. (2002) notaram diminuição nos valores de pH em todos os tratamentos após a autoclavagem até o final do período de cultivo (45 dias) de 5,8 para 3,6 em média, independente do pH inicialmente ajustado. Resultados semelhantes são descritos por Lal & Singh (1995) também em cana de açúcar.

5.2.5- Condutividade Elétrica

Os valores médios de variância obtidos para condutividade elétrica e os resultados do teste de Tukey são apresentados nos Quadros 18, 19, 20 e 21.

Quadro 18: Valores médios de condutividade elétrica obtidos após quatro horas da autoclavagem dos meios de cultura.

Tratamentos	Médias ($\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$)
T1 - ágar 0,6% + sacarose	1.641,75 ^{ab}
T2 – amido 7% + sacarose	1.667,50 ^{ab}
T3 – ágar 0,6% + açúcar	1.704,50 ^a
T4 – amido 7% + açúcar	1.555,50 ^b
CV% 3,67	

De acordo com o teste de Tukey, pode-se notar que após 4 horas da autoclavagem os valores obtidos para condutividade elétrica diferiram significativamente entre si. O tratamento 3 foi o que mostrou maior valor de condutividade elétrica seguido pelos tratamentos 2, 1 e 4 respectivamente.

Quadro 19: Valores médios obtidos para condutividade elétrica nos meios de cultura dos diversos tratamentos aos 10 dias de desenvolvimento na fase de multiplicação de *Ipomoea batatas* L.

Tratamentos	Médias ($\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$)
T1 - ágar 0,6% + sacarose	1.492,75 ^b
T2 – amido 7% + sacarose	1.414,25 ^b
T3 – ágar 0,6% + açúcar	1.789,75 ^a
T4 – amido 7% + açúcar	1.304,50 ^b
CV% 6,8	

Aos 10 dias de desenvolvimento o tratamento 3 diferiu significativamente dos demais tratamentos sendo, que o tratamento 3, apresentou novamente o maior valor de condutividade elétrica seguido pelos tratamentos 1, 2 e 4 respectivamente.

Quadro 20: Valores médios obtidos para condutividade elétrica nos meios de cultura dos diversos tratamentos aos 20 dias de desenvolvimento na fase de multiplicação de *Ipomoea batatas* L.

Tratamentos	Médias ($\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$)
T1 - ágar 0,6% + sacarose	1.450,00 ^a
T2 – amido 7% + sacarose	1.259,00 ^b
T3 – ágar 0,6% + açúcar	1.160,50 ^b
T4 – amido 7% + açúcar	1.395,00 ^a
CV% 4,87	

Aos 20 dias de desenvolvimento os tratamentos 2 e 3 diferiram significativamente dos tratamentos 1 e 4. O tratamento 1 foi o que apresentou maior condutividade elétrica.

Quadro 21: Valores médios obtidos para condutividade elétrica nos meios de cultura dos diversos tratamentos aos 30 dias de desenvolvimento na fase de multiplicação de *Ipomoea batatas* L.

Tratamentos	Médias ($\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$)
T1 - ágar 0,6% + sacarose	1.519,25 ^a
T2 – amido 7% + sacarose	1.465,25 ^a
T3 – ágar 0,6% + açúcar	1.260,25 ^b
T4 – amido 7% + açúcar	1.547,00 ^a
CV% 3,08	

Na Figura 12 pode-se visualizar os resultados obtidos para condutividade elétrica durante a fase de desenvolvimento.

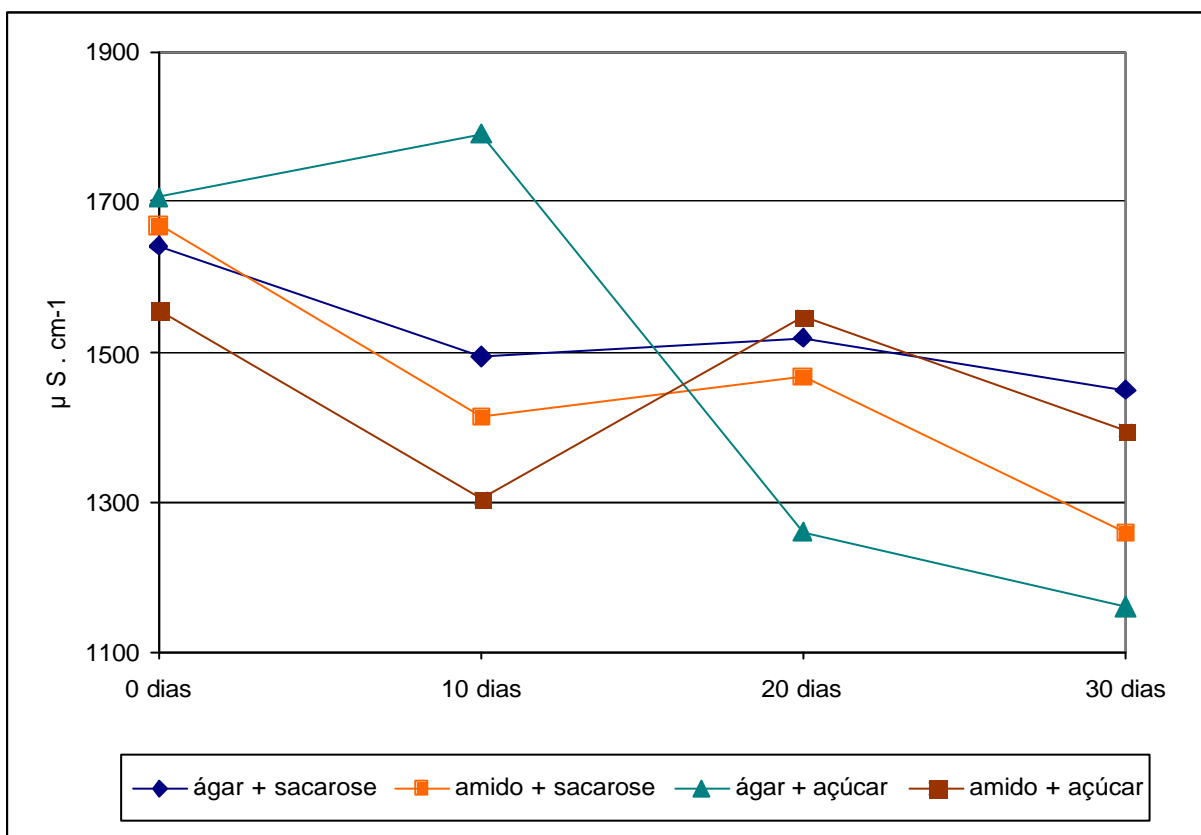


Figura 12: Valores médios de condutividade elétrica obtidos durante a fase de multiplicação de *Ipomoea batatas* L. nos diferentes tratamentos

Na última coleta, o tratamento 3 (ágar 0,6% com açúcar cristal) apresentou menor condutividade elétrica, diferindo dos demais tratamentos, os quais não mostraram diferenças significativas entre si.

Nota-se pelos resultados que ocorreu diminuição na condutividade elétrica ao longo do desenvolvimento em todos os tratamentos propostos. Possivelmente, as plantas estariam absorvendo os íons livres, o que ocasionaria diminuição da condutividade elétrica. Neste trabalho, os resultados indicam que houve absorção de íons tanto em meio solidificado com ágar como com amido, porém Debergh (1983) relatou que o uso de 0,8% de

ágars Difco Bacto e purificados exibiram valores de condutividade de 0,17 a 0,078 $\mu\text{ S.cm}^{-1}$ respectivamente.

De acordo com Bhattacharya et al. (1994) a condutividade elétrica é menor em meio solidificado com ágar, que varia entre 0,29 a 0,33 $\mu\text{S.cm}^{-1}$ quando comparado com amido de sagu, onde os valores estão em torno de 0,38 a 0,40 $\mu\text{S.cm}^{-1}$, entretanto todos os agentes gelificantes usados, isto é, sagu e ágar, mostraram-se significantes taxas de contaminação por íons, o que alteraria a condutividade elétrica.

5.3- Custo

O amido é uma alternativa de baixo custo entre os agentes gelificantes estudados. Seu uso é importante por representar uma redução de custo na escala industrial para a cultura de tecidos de plantas, Cereda et al. (1998) por ocasião do “III Encuentro Latino Americano de Biotecnologia Vegetal” em Cuba, onde foi apresentado o trabalho “La Búsqueda de Nuevos Almidones para Industrias de Alimentos”, obtiveram informações que estimam o número de Bio-fábricas e a partir da produção destas, o mercado potencial do amido como substituto do ágar empregado nos meios de cultivo em 20.000 toneladas anuais.

A substituição do ágar por amido como agente gelificante apresentou uma redução de mais de 90% no custo final do meio de cultura básico (Ribeiro, 1996). Neste trabalho o custo da mistura de amido representou uma redução de 94% em relação ao custo do ágar, demonstrando que a substituição do ágar por mistura de amido em meio de cultura é viável do ponto de vista econômico.

6- CONCLUSÕES

1. A utilização da mistura de amido com agente gelificante no meio de cultura durante a fase de multiplicação de *Ipomoea batatas* L. promoveu aumento de massa fresca e proteínas solúveis totais.
2. O meio de cultura modificado por amido foi eficiente para micropropagação de *Ipomoea batatas* L.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, J. M. C. *Cultivo in vitro de batata doce (Ipomoea Batatas L.)*. Lavras, 1988.82p.

Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura de Lavras.

AYDIEH, A.A.; EBRAHIM, M.K.H., IBRAHIM, I.A. Propagation and fruiting of pineapple (*Ananás comosus* L. Merr) through tissue culture techniques. *Physiologia Science*. Egypt, v. 23, p. 213-28, 1999.

BHATTACHARYA, P., DEY, S., BHATTACHARYA, B.C. Use of low-cost gelling agents and support matrices for industrial scale plant tissue culture. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. Netherlands, v.37, p.15-23, 1994.

- BLANCO, M.A.; NIEVES, N.; SANCHEZ, M.; BORROTO, C.G.; CASTILLO, R.; GONZALES, J.L.; ESCALONA, M.; BAEZ, E.; HERNANDEZ, Z. Protein changes associated with plant regeneration in embryogenesis calli of sugar cane (*Saccharum* sp.). *Plant Cell tissue and Organ Culture*, v.51, p. 153-58, 1997.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilize the principle of protein-dye binding. *Annals Biochemistry*, v.72, p.248-54, 1976.
- CALDAS, L.S., HARIDASAN, P., FERREIRA, M.E. Meios Nutritivos. In: TORRES, A.C., CALDAS, L.S. *Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas*. Brasília, v.1, p.87-131, 1998.
- CAPELLADES, M., LEMEUR, R.; DEBERGH, P. Effects of sucrose on starch accumulation and rate of photosynthesis in *Rosa* cultured in vitro. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, v.25, p.21-26, 1991.
- CAPELLADES, M.; VANDERSCHAEHE, A.; LEMEUR, R.; DEBERGH, P. How important is photosynthesis in micropropagation? In: Sangwan, R.S.; Sangwan-Norreel, B.S. (Eds.). *The impact of biotechnology in Agriculture*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, p.29-38, 1990.
- CARTA PATENTE PI 9003880-0. Agente geleificante para meios de cultivo de tecidos de plantas superiores, 10p., 1995. *Instituto Nacional da Propriedade Industrial*.

- CEREDA, M. P., VILPOUX, X. O., SMIDT, R. P., La Búsqueda de Nuevos Almidones para Industrias de Alimentos. In: Anais do III Encontro Latino Americano de Biotecnologia Vegetal, Cuba, p. 128, 1 à 5 junho de 1998
- CHIU, R. J., LIAO, C. H., CHIUNG, M.L. Sweet potato virus disease and meristem culture as a mean of disease control in Taiwan. Taiwan, *Vegetable Research and Development*, p.169-76, 1982.
- CID, L. P. B. A propagação *in vitro* de planta. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, n.19, p16-21, 2001.
- DEBERGH, P.C. Effects of Ágar brand and concentration on the tissue culture medium. *Physiol. Plant.* V.59, p. 270-276, 1983.
- EBRAHIM, M.K.H.; IBRAHIM, I.A. Influence of medium solidification and ph value on in vitro propagation of *Maranta leuconera* cv. Kerchoviana. *Scientia Horticulturae*, v. 86, p.211-221, 2000.
- EBRAHIM, M.K.H.; ZINGSHEIM, O.; VEITH, R.; ABRO-KASSEN, E.E.M.; KOMOR, E. Sugar ciptake and storage by sugarcane suspension cells at different temperatures and high sugar concentration. *Plant Physiology*, Itália, v.154, p. 610-16, 1999.
- FAO, 2001 <http://www.fao.org>
- FÁRIL, M. & MELO, N.F. Automação e Racionalização na Micropropagação Industrial. *Boletim Informativo da Associação Brasileira de Cultura de Tecidos de Plantas*, n.26, p.2-6 1996.

- FIGUEIREDO, S. A. Influência de reguladores de crescimento e fotoperíodo no crescimento secundário de raízes de *Ipomoea batatas* (L.) Lam. cv. Brazilândia em branca em condições *in vitro*. Lavras, 1995 Dissertação de mestrado (Mestrado em Agronomia) Universidade Federal de Lavras.
- FOLQUER, F. *La batata (camote): estudio de la planta y su producción comercial*. San Jose, 1978. 144p.
- GRATTAPAGLIA, D., MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C. e CALDAS, L. S. (Ed.) **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: EMBRAPA – CNPH, 1990. p. 99-169.
- GREENWOOD, C.T. Structure, properties and amylolytic degradation of starch. **Food Technology**, v.18, n.5, p.138-44, 1964.
- GROUT, B. W. W. Meristem-tip culture. In: pollard, J. W. e Walker, J. M. eds. *Methods in Molecular Biology – 6. Plant and Tissue culture*. Clifton: Humana Press, 1990, 771p.
- HENDERSON, J. H. M., PHILLS, B. R., WHATLEY, B. T. Sweet potato. In: SHARP, W. R. et al. *Handbook of plant cell culture*, New York, MacMillan, v.2 p.302-26, 1984.
- HODGE, J.E. e OSMAN, E.M. Hidratos de carbono. In: FENNEMA, O.R. Introducción a ciencia de los alimentos. Reverté, p.48-160, 1985.
- HUAMAN, Z. *Systematic botany and morphology of sweet potato plant*. Lima: International Potato Center, 1992. 22p.
- KODYM, A.; ZAPATA, A.F.J. Low-cost alternatives for the micropropagation of banana. *Plant Cell Tissue and Organ Culture.*, v.66, p.67-71, 2001.

- KOHLENVACH, H.W.; WERNICKE, w. INVESTIGATIONS on the inhibitory effect of agar and the function of active carbon anther culture. *Z. Pflanzenphysiol.*, v. 86, p.463-472, 1978.
- KORDAN, H.A. Boron in aqueous extracts of non-nutrients ágars. *Plant and Soil*, v.92, p.309-311, 1986.
- KORDAN, H.A. Inorganic ions present in commercial ágars. *Biochemie und Physiologie der Pflanzen*, v.183, p.355-359, 1988.
- LAL, N. & SINGH, S. B. Effect agar concentration on pH of the medium and plantlet formation in in vitro grown sugarcane shoots. *Indian J. Plant Physiol.*, 38(4), 301-4, 1995.
- LEHNINGER, A.L., NELSON, D.L., COX, M.M. Bioquímica. São Paulo, 2ed., v.1, 1995.
- LIMA, N. N., QUOIRIN, M., NADDAF, Y. G., RIBAS, L. F., SIERAKOWSKI, M. N. Novo tipo de suporte para a cultura de tecidos vegetais *in vitro*. In: Resumos do VIII congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal, Ilheus, p.283, 2001.
- MELLOR, F.C.; STACE-SMITH, R. Development of excised potato buds in nutrient medium. *Canadian Journal of Botany*, v.47, p.1617-1621, 1969.
- MORALES, S. R., GARCIA, M.G., VEJA, V.M., TORRES, J.L., MARTIM, J.C.V., Las técnicas biotecnológicas, una valiosa herramienta para rescatar el potencial productivo en las raíces y tubérculos tropicales. In: *Anais do III Encontro Latino Americano de Biotecnologia Vegetal*, Cuba, p.52, 1998.

- MORRISON, W.R. Starch lipids and how they relate to starch granule structure and functionality. *Cereal Foods World*, v.40, n.6, p.437-46, 1995.
- MURASHIGE, T., SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, v.15, p.473,497, 1962.
- OLIVEIRA JUNIOR, C. J. F., BUCKERIDGE, M. S., BRAGA, M. R. Utilização de carboidratos em suspensões celulares de *Rudgea jasminoides* (Rubiaceae). Resumos do VIII congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal, Ilheus, p.277, 2001.
- PASQUALETTO, P.L., ZIMMERMAN, R.H., FORDHAM, I. The Influence of cation and gelling agent concentrations on vitrification of apple cultivars *in vi tro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v.14, p.31-40, 1988.
- PASQUALETTO, P.L.; ZIMMERMAN, R.H.; FORDHAM, L. Gelling agent and growth regulator effects on shoot vitrification of Gala apple in vitro. *Journal American Soc. Horticultural Science*, v. 111, p.976-980, 1986.
- PEREIRA, A.V., SILVA, S.O. *Citogenética e cultura de tecidos em mandioca (Manihot esculenta Cratz)*. Piracicaba. USP/ESALQ, 46p., 1986.
- PIERIK, R.L.M.; STEEGMANS, H.H.M.; SPRENKELS, P.A. Micropropagation of lilac (*Syringa vulgaris* L.) In: Bajaj, Y.P.S. (Ed.). *Biotechnology in Agriculture and Forestry, High-Tech and micropropagation IV*. Springer, Berlin/Heidelberg/New York, p.407-426, 1997.

- PIZA, I. M. T. Poliaminas e micropropagação do abacaxizeiro (*Ananás comosus* L. Merr. Cv. Smoth cayenne) Botucatu, 1996 .107p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual Paulista UNESP.
- PIZARRO, F.C., URBINA, P.R., VIEYRA, R.J., SOLÍS, T.F., ARELLANO, O.G. Efecto de la concentración y tipo de ágar en el cultivo *in vitro* de Vid (*Vitis vinifera*) cv. Malaga roja. *In: Anais do III Encontro Latino Americano de Biotecnologia Vegetal*, Cuba, p. 149, 1 à 5 junho de 1998.
- POZZER, L. Caracterização de um isolado de “ Sweet Potato Feathery Mottle Virus” em batata doce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam). e avaliação das perdas nas produção devido ‘a infecção. Brasília, 117p. 1993.
- REDBIO Informe Red Latinoamericana de Biotecnologia. *Circular Palacio de las Convenciones*, Havana, Cuba, 1998
- RIBEIRO, R.C.S. *Tissue culture, genetic manipulation and germplasm storage of Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh, 281p., 1995 (Dissertação de Doutorado, University of Nottingham).
- RIBEIRO, R.C.S., CEREDA, M.P., MULLIGAN, B.J., DAVEY, M.R., POWER, J.B. Avaliação do amido de mandioca e feijão guandú como agente gelificante alternativo na cultura *in vitro* de *Arabidopsis thaliana*. *In: Anais do I Congresso Latino Americano de Raízes Tropicais e IX Congresso Brasileiro de Mandioca*, São Pedro, 07 à 10 de outubro de 1996.

- RICKARD, J.E.; ASAOKA, M., BLANSHARD, J.M.V. The physicochemical properties of cassava starch. *Tropical Science*, v.31, p.189-207, 1991.
- ROMBERGER, J.A., TABOR, C.A. The *Picea abies* shoot apical meristem in culture. *American Journal of Botany*, v.58, p.131-40, 1971.
- SCHOLTEN, H.J.; PIERIK, R.L.M. Agar as a gelling agent: differential biological effects in vitro. *Scientia Horticulturae*, v. 77, p.109-116, 1998.
- SCHOLTEN, H.J.; PIERIK, R.L.M. Agar as a gelling agent : Chemical and physical analysis. *Plant Cell Report.*, v. 17, p.230-235, 1998.
- SCHULTHEIS, J. R., CANTLIFFE, D.J. Growth of somatic embryos of sweet potato (*Ipomoea batatas* L. Lam) in hydroxyethyl cellulose gel amended with salts and carbohydrates. *Sci. Hort.*, v.50 p.21-33, 1992.
- SHILLITO, R.D.; PASZKOWSKI, J.; POTRYKUS, I. Agarose plating and a bead type technique enable and stimulate development of protoplast-derived colonies in a number of plant species. *Plant Cell Reports*, v.2, p. 244-247, 1983.
- SIHACHAKR, P. Premiers resultats concernant la multiplication vegetative *in vitro* de la patate douce (*Ipomoea batatas* (L) Lam., Convolvulacea). *Agronomi Tropicale*, Paris, v.37, n.2, p.142-51, 1982.
- SILVA, S. O. C., SOUZA, A. S., PAZ, O. P. Efeito da multiplicação vegetativa *in vitro* na produtividade de batata doce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam). *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, São Carlos, v.3, n.1, p.47-52, 1991.

- SINGHA, S. Influence of Ágar concentration on *in vitro* shoot proliferation of *Malus* sp. *Almey* and *Pyrus communis* Seekel. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, v.107, p.657-660, 1982.
- SKIRVIN, R.M.; CHU, M.C.; MANN, M.L.; YOUNG, H.; SULLIVAN, J.; FERMANIAN, T. Stability of tissue culture medium pH as a function of autoclaving, time and cultured plant material. *Plant Cell Reports*, v.5, p.292-294, 1986.
- SOLTZ, L.P. Agar restriction of the growth of excised mature Iris embryos. *J Am. Soc. Hort. Science*, v.96, p.618-684, 1971.
- SORVARI, S. Differentiation of potato tuber discs in barley starch gelatinized nutrient media. *Annales Agriculturae Fenniae*, v.25, p.135-38, 1986b.
- SORVARI, S. The effect of starch gelatinized nutrient media in barley anther cultures. *Annales Agriculturae Fenniae*, v.25, p.127-33, 1986a.
- SWEET, H.C.; BOLTON, W.E. The surface decontamination of suds to produce arsenic seedlings. *American Journal Botany*, v.66, p.692-98, 1979.
- SYOÑO, K. Physiological and biochemical changes of carrot root callus during successive cultures. *Plant Cell Phsyiol.*, v.6, p.371-92, 1965.
- TIWARI, S., RAHIMBAEV, I. Effect of barley starch in comparison and in combination with agar and agarose on anther culture of *Hordeum vulgare*. *Current Science*, v.62, p.430-32, 1992.

TORRES, A. C.& TEIXEIRA, D. M. C., Considerações sobre a cultura de tecidos em batata doce. *Cultura de Tecidos de Plantas*, n.26, p.6-8, 1996.

VILLORDON, A. Q., LABONTE, D. R. Variation in randomly amplified DNA markers and storage root in jebel sweet potato clones. *J. Am. Society Hort. Sci.*, v.120, p.734-740, 1995.

VIÑA, G. de la, PLIEGO-ALFARO, F.; DRISCOLL, S.P.; MITCHELL, V.J.; PARRY, M.A.; LAWOR, D.W. Effects of CO₂ and sugars on photosynthesis and composition of avocado leaves grown in vitro. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 37, p.587-595, 1999.

YEMM, E.W., WILLIS, A.J. The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. *Biochem.*, 57: 508-514, 1954.

ZIEMBRA, J.V. Foodstarches. *Food Engineering*, v.37, n.10, p.71-9, 1965.

ZIV, M. In vitro acclimatization , In: Aitken-Christie, J.; Kozai, T.; Smith, M.A.L. (Eds.). *Automation and Environmental Control in plant tissue culture*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1995, p.493-516.