



Faculdade de Ciências

Departamento de Ciências Biológicas

Licenciatura em Biologia Aplicada

Trabalho de Culminação de Curso (Investigação)

**Avaliação do efeito da temperatura e diferentes concentrações
de sacarose na conservação *in vitro* de batata-doce (*Ipomea
batatas*)**

Autora:

Neuza Da Graça Ricardo

Maputo, 2024



Faculdade de Ciências

Departamento de Ciências Biológicas

Licenciatura em Biologia Aplicada

Trabalho de Culminação de Curso (Investigação)

**Avaliação do efeito da temperatura e diferentes concentrações
de sacarose na conservação *in vitro* de batata-doce (*Ipomea
batatas*)**

Autora:

Neuza Da Graça Ricardo

Supervisores:

Prof. Doutor. Orlando Quilambo

Co-supervisora:

Mestre Suzana Fernandes

Prof^ª. Doutora. Célia Martins

Mestre Sónia Ventura Guilundo

Maputo, 2024

Agradecimentos

Em primeiro lugar quero agradecer à Deus pelo dom da vida, protecção, graça e bênçãos concedidas.

À minha família, em especial aos meus pais, Ricardo Arnaldo e Emília Pene, por me terem dado a vida, cuidar de mim em todos os momentos e terem garantido que não me faltasse nada na vida, pelo amor, paciência, incentivo, compreensão e por me terem permitido chegar aonde cheguei, muito obrigada.

Agradeço os meus irmãos Emídio Ricardo, Nelson Ricardo, Dário Ricardo, Jéssica Ricardo, Dércio Ricardo pelo companheirismo, amizade, incentivo, carinho, motivação, ensinamentos e dedicação.

Às minhas irmãs e amigas, Jéssica Ricardo e Vânia Fumo com quem partilhei momentos de alegria e de dor, pela amizade, força, motivação, incentivo e por acreditar em mim, endereço os meus agradecimentos.

À Universidade Eduardo Mondlane, em especial ao Departamento de Ciências Biológicas, aos funcionários e docentes que contribuíram positivamente para a minha formação académica, muito obrigada!

Ao Instituto de Investigação Agrária de Moçambique (IIAM), em especial ao Laboratório de Biotecnologia, por disponibilizar o material necessário para a realização da experiência, agradeço.

À toda equipa do laboratório de biotecnologia do IIAM, em especial ao Fidélio, Eng. Frederico e Camilo, pela disposição, disponibilidade, ensinamentos e entrega durante a realização deste trabalho.

Endereço os meus especiais agradecimentos aos meus supervisores: Docentes de Fisiologia Vegetal e mestre Suzana Fernandes pela orientação, disposição, paciência e ensinamentos durante a realização deste trabalho.

Agradeço a turma de Biologia Aplicada-2016, pelos momentos de amizade, respeito e descontração partilhados durante a formação.

Aos meus amigos e colegas, Célia Sílvia, Caldina Malige, Irenê Ichobora, Abdala Toqueia (Em Memória) pelo companheirismo, amizade e disponibilidade durante todos estes anos, o meu muito obrigada! Endereço um agradecimento especial à Célia Sílvia, minha “companheira das trincheiras” por me encaminhar para o IIAM e ao meu eterno amigo Abdala Toqueia, por acreditar em mim, me motivar e acima de tudo me inspirar.

À todos que directa ou indirectamente contribuíram para a realização deste trabalho, “Khanimambo”!

Declaração de honra

Eu, Neuza Da Graça Ricardo, declaro por minha honra que o presente trabalho é da minha autoria e que os dados usados para a realização do mesmo, foram obtidos do estudo experimental por mim realizado.

Maputo, Julho 2024

Neuza Da Graça Ricardo

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais Ricardo Arnaldo e Emília Pene, por nunca terem medido esforços para que eu pudesse me formar, aos meus irmãos, pela inspiração, incentivo, dedicação e suporte.

Ao meu amigo Abdala Luís Toqueia (em memória)

Epígrafe

*“Tudo tem o seu tempo determinado,
e há tempo para todo o propósito debaixo do céu”*

Eclesiastes 3: 1

Resumo

A conservação de germoplasma de batata-doce *in vivo* é vulnerável a perdas, pois a batata-doce é susceptível a numerosas doenças que podem ser causadas por fungos, bactérias, vírus, nemátodes, ataques por insectos e roedores assim como intempéries climáticas, aliado a isso, a manutenção *in vivo* acarreta custos elevados, podendo ser paralisada em períodos de dificuldade económica. O presente trabalho teve como objectivo avaliar o efeito da temperatura e de diferentes concentrações de sacarose na conservação *in vitro* de batata-doce. A experiência obedeceu um delineamento inteiramente causalizado, em esquema factorial 3 (variedades) x 3 (concentrações de sacarose) x 2 (temperaturas), com 20 repetições, cada uma representada por uma planta cultivada em um tubo de ensaio. Os factores avaliados foram a concentração de sacarose e a temperatura, para avaliar a influência da sacarose, foram feitos 3 tratamentos, distribuídos em concentrações diferentes, 30g (controle), 22,5g, e 15g, para cada tratamento foram usados 20 tubos de ensaio e para avaliar o efeito da influência da temperatura, cada tratamento com diferentes concentrações de sacarose foi duplicado e distribuídos e armazenados em 2 salas de crescimento com temperaturas de 18°C e 24°C e fotoperíodo de 16h luz e 8h escuro. A colecta dos dados foi feita em duas fases de 90 dias cada perfazendo 180 dias de experiência. As análises realizadas permitiram verificar que após 180 dias a temperatura de 18 °C com a concentração de sacarose de 15 g/L apresentou um crescimento lento o que proporcionou melhor conservação.

Palavras-chave: Conservação *in vitro*, Germoplasma, *Ipomea batatas*, Batata-doce, sacarose, temperatura

Lista de abreviaturas

H₀- Hipótese nula;

H₁- Hipótese alternativa

ml- Mililitros

cm- Centímetros

MS- Meio MS (Murashige e Skoog, 1962);

g/L- Gramas por litro;

FAO- Organização das Nações Unidas para Alimentação e a Agricultura

IIAM- Instituto de Investigação Agrária de Moçambique;

ANOVA- Análise de variância;

pH- Potencial Hidrogeniônico

%- Percentagem

°C- Graus Celsius

atm- Atmosfera

MITADER- Ministério da Terra, Ambiente e Desenvolvimento Rural

Lista de figuras

Figura 1: Localização geográfica da área de estudo: IIAM.....	13
Figura 2: Efeito da temperatura (18°C e 24°C) e da concentração de sacarose (15,22,5 e 30 g/L) sobre a altura das plântulas após 90 dias (A) e 180 dias (B) de crescimento.	19
Figura 3: Efeito da temperatura (18°C e 24°C) e da concentração de sacarose (15,22,5 e 30 g/L) sobre folhas verdes das plântulas após 90 dias (A) e 180 dias (B) de crescimento.	21
Figura 4: Efeito da temperatura (18°C e 24°C) e da concentração de sacarosa (15, 22,5 e 30 g/L) sobre a altura das plântulas após 90 dias (A) e 180 dias (B) de crescimento.	22
Figura 5: Temperatura e concentração ideal para a conservação em relação aos parâmetros (altura e número de folhas).....	24

Lista de tabelas

Tabela 1: Variação da concentração de sacarose nos diferentes 15

Tabela 2: Análise de variância das variedades de batata-doce apos 90 e 180 dias in vitro sob diferentes temperaturas e concentração de sacarose sob efeito da altura 44

Índice

Agradecimentos	i
Declaração de honra.....	iii
Dedicatória.....	iv
Epígrafe.....	v
Resumo	vi
Lista de abreviaturas	vii
Lista de figuras.....	viii
Lista de tabelas.....	ix
I. Introdução	1
1.1 Problema	2
1.2 Justificativa	2
1.3 Objectivos	4
1.3.1 Geral.....	4
1.3.2 Específicos	4
1.4 Hipóteses.....	4
II. Revisão bibliográfica	5
2.1 Origem e aspectos botânicos da Batata-doce.....	5
2.2 Cultura de batata-doce e sua distribuição	6
2.3 A importância económica e nutricional da batata-doce.....	6
2.3 Cultura de tecidos vegetais	7
2.4 Micropropagação	8
2.5 Conservação de germoplasma vegetal	8
2.6 Métodos de conservação de germoplasma vegetal	8
2.6.1 Conservação <i>ex situ- in vitro</i>	8
2.6.2 Crescimento lento	9
2.6.3 Criopreservação	9
2.6.3 Conservação <i>in situ</i>	9
2.7 Factores que influenciam a conservação.....	10
2.7.1 Temperatura	10
2.7.2 Meio de Cultura	10
2.7.3 Composição dos meios de cultura.....	10
2.7.4 Compostos orgânicos	11
2.7.5 Sacarose	11

2.7.6 Vantagens da conservação <i>in vitro</i>	11
2.7.7 Desvantagens	11
2.8 Teste de viabilidade pós conservação	11
2.9 Conservação <i>in vitro</i> em Moçambique	12
III. Área de estudo.....	13
IV. Material e Metodologia.....	14
4.1 Amostragem.....	14
4.2 Materiais e Equipamentos.....	14
4.3 Soluções	15
4.4 Métodos.....	15
4.2.3. Procedimentos para preparação de 1 litro de meio de cultura	15
4.2.4 Procedimentos para conservação	16
4.2.5 Incubação	16
4.2.6. Controle das plântulas e colecta de dados.....	16
4.2.7 Parâmetros de crescimento	16
4.3. Desenho experimental.....	17
4.4. Análise de dados	17
5. Resultados	18
5.1. Efeito da temperatura e de diferentes concentrações de sacarose sobre os parâmetros fisiológicos:.....	18
5.1.1. Número de folhas senescentes.....	18
5.1.2. Efeito de diferentes temperaturas e concentrações de sacarose na conservação de <i>Ipomea batatas</i>	18
5.2. Identificação da temperatura e concentrações de sacarose eficientes na conservação de <i>Ipomea batatas</i> ;	23
6. Discussão	25
6.1. Parâmetros fisiológicos	25
6.2. Efeito de diferentes temperaturas e concentrações de sacarose na conservação de <i>Ipomea batatas</i> ;	25
7. Conclusão.....	31
8. Limitações.....	32
9. Recomendações.....	33
10. Referências bibliográficas	34

I. Introdução

A batata-doce (*Ipomea batatas* (L.) Lam) é considerada a sétima cultura mais importante do mundo e a quinta mais importante nos países em desenvolvimento (Loebenstein, 2009).

Devido a diversidade do seu uso, a batata-doce é considerada uma espécie de alto interesse comercial. A sua raiz é valiosa na dieta humana por ser uma fonte de energia, minerais e vitaminas, suas ramas e raízes são também usadas na alimentação de diversos animais domésticos, suas ramas são ainda usadas como potencial biomassa para a produção de biocombustíveis (Arrigoni-Blank *et al.*, 2014).

A cultura de batata-doce apresenta características favoráveis para o cultivo, tais como o baixo custo de produção, a facilidade de cultivo, a rusticidade, a ampla adaptação a diferentes climas e tipos de solo, a colheita prolongada, o ciclo curto e a protecção do solo contra a erosão, além da função social, que contribui para manter o produtor rural no campo (Loebenstein, 2009; Zhang *et al.*, 2009).

A conservação de germoplasma de batata-doce *in vivo* é vulnerável à perdas, pois a batata doce é susceptível a numerosas doenças que podem ser causadas por fungos, bactérias, vírus, nematodes, ataques por insectos e roedores assim como intempéries climáticas. (Arrigoni-Blank *et al.*, 2014) Aliado a isso, a manutenção *in vivo* acarreta custos elevados, podendo ser paralisada em períodos de dificuldade económica.

Diante da possibilidade de se obter plantas completas a partir do cultivo de células, tecidos ou órgãos, foi sugerido na década de 70, que as técnicas *in vitro* poderiam ser úteis na conservação dos recursos fitogenéticos, alternativas valiosas para a manutenção de colecções a serem empregadas de imediato em programas de melhoramento vegetal (Souza *et al.*, 2007).

A possibilidade do uso da conservação *in vitro* é apelativa tanto por motivos económicos quanto práticos, sendo um componente adicional importante da preservação de recursos genéticos de plantas, pois a conservação *in vitro* das plantas protege as plantas de alguns elementos de riscos aos quais estas estão expostas no campo, reduz os custos de produção, garante a manutenção da variabilidade genética (Arrigoni-Blank *et al.*, 2014)

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objectivo avaliar diferentes temperaturas e concentrações de sacarose, a fim de se desenvolver um protocolo otimizado de conservação *in vitro* de diferentes variedades de *Ipomea batatas*.

1.1 Problema

De acordo com Vettorazzi (2016), as mudanças efectuadas no meio de cultura (nutrientes orgânicos e inorgânicos) são um dos principais factores que actua na redução do metabolismo das plantas e consequentemente o período entre os subcultivos.

Existem diversos métodos de conservação *ex situ*, tais como bancos de sementes, preservação *in vivo*, cultura de tecidos e criopreservação de pólen, meristemas e embriões (Ramalho *et al.*, 2008). Especificamente a conservação *in vitro* é indicada para espécies com sementes recalcitrantes que perdem a viabilidade rapidamente e para espécies de propagação vegetativa, nas quais o processo de clonagem é interessante para a indústria. A batata-doce pertence a esta última categoria.

Entretanto, em Moçambique existem poucos estudos que contribuam para a optimização de protocolos para a manutenção e conservação de todas as variedades de batata-doce. Daí surge a pergunta: Que temperaturas e concentrações de sacarose apresentam maior eficiência na conservação de germoplasma da *Ipomea batatas*?

1.2 Justificativa

Actualmente, o método mais comumente usado para a preservação dos recursos genéticos é a manutenção desses recursos em bancos de germoplasma em condições de campo ou em casas de vegetação. Existem, porém, problemas sérios com banco de genes a campo, como a exposição das colecções a desastres naturais e a ataques de patógenos. Um problema adicional é o risco de transferência de patógenos em casos de intercâmbio de germoplasma (Santos, 2003).

Na conservação *in vitro*, brotos e plantas, derivados directamente de ápices merismáticos e gemas laterais, são mantidos em condições ambientais controladas (temperatura, intensidade luminosa e fotoperíodo) e/ou químicas (meios de cultura) que permitam estender ao máximo o intervalo das transferências para meios novos, sem afectar a viabilidade e estabilidade genética dos cultivos (Moulin, 2010).

O crescimento lento tem sido utilizado com sucesso, principalmente para a conservação de ápices merismáticos de muitas espécies mantidas em bancos de germoplasma *in vitro* (Withers e Williams, 1998; Silveira, 2017). O uso de temperaturas baixas no cultivo *in vitro* reduz a acção de enzimas e do metabolismo geral das plantas (Lemos *et al*, 2002).

A sacarose quando adicionada ao meio de cultura actua externamente removendo o excesso de água intracelular, fazendo com que o desenvolvimento da planta ocorra de forma mais lenta (Dumet *et al* 1993; Sampaio *et al.*, 2018). Portanto uma das estratégias para aumentar o tempo entre os subcultivos e reduzir o crescimento *in vitro* é a redução da temperatura e utilização da sacarose como fonte de carbono e regulador osmótico para a manutenção da viabilidade dos explantes conservados *in vitro* (Lemos *et al*, 2002).

1.3 Objectivos

1.3.1 Geral

- Avaliar o efeito da temperatura e de diferentes concentrações de sacarose na conservação *in vitro* de *Ipomea batatas*.

1.3.2 Específicos

- Determinar os parâmetros fisiológicos: altura da plântula, número de folhas verdes e número de folhas senescentes
- Identificar a temperatura e concentrações de sacarose eficientes na conservação *in vitro* de *Ipomea batatas*;
- Comparar o desempenho das variedades em função da temperatura e as diferentes concentrações de sacarose.

1.4 Hipóteses

Durante as fases da cultura *in vitro* destacam-se vários factores que podem influenciar no crescimento das plantas, tais como a intensidade luminosa, temperatura, fotoperíodo e composição do meio de cultura (Tavares *et al.*, 2008).

H₀: A combinação de baixas temperaturas e baixas concentrações de sacarose reduzem significativamente o metabolismo das plântulas de *Ipomea batatas* comparativamente às condições padrões de conservação *in vitro*.

H₁: A combinação de baixas temperaturas e baixas concentrações de sacarose não reduzem significativamente o metabolismo das plântulas de *Ipomea batatas* comparativamente às condições padrões de conservação *in vitro*.

II. Revisão bibliográfica

2.1 Origem e aspectos botânicos da Batata-doce

Não há evidências claras sobre a origem da batata-doce, porém os primeiros estudos sobre a batata datam no período posterior a descoberta da América, reforçando a hipótese de que possivelmente tenha surgido neste continente (Srisuwan *et al.*, 2006; Roullier *et al.*, 2013)

A utilização da batata-doce, remota há, mas de 10 mil anos, a partir de análises feitas em batata-doce seca encontrada em cavernas em Chilca Canyon no Peru e evidências arqueológicas encontradas na região Maia da América central (AJAP, 2017).

A batata-doce (*Ipomea batatas* (L) Lam) é uma dicotiledónea pertencente a família convulvulaceae, agrupa cerca de 50 a 60 gêneros e mais de 1000 espécies (Vetorrazi, 2016). É uma planta da classe Magnoliopsida, herbácea com caule geralmente rastejante, que atinge de 2- 3 metros de comprimento, exibindo ramas de coloração verde ou rosada, pecíolos longos, um sistema radicular amplo, composto por dois tipos de sistema radicular, raízes tuberosas ou principais, que constituem a reserva e a parte comercial da planta e as raízes absorventes, que cumprem com a função de absorção de água e nutrientes (Rossel *et al.*, 2008).

As raízes podem apresentar formato redondo, fusiforme ou alongado. Além das características genéticas, o formato das raízes pode ser afectado pela estrutura do solo, pela presença de torrões e pedras. Podem apresentar pele ou casca lisa ou rugosa. A casca e a polpa da batata-doce, podem apresentar uma coloração, roxa, alaranjada, creme ou branca (Silva *et al.*, 2004, citado por Kalkmann, 2011).

Apresenta uma inflorescência do tipo cacho, onde as flores são complexas, axilares, e solitárias com coloração roxa (Ritschel *et al.*, 1995 e Rossel *et al.*, 2008). A batata-doce é o único membro da família convulvulaceae hexaploide ($2n=6x=90$), o que provavelmente faz com que a variabilidade genética nesta espécie seja alta. Esta variabilidade é contemplada nas diferentes cores, texturas, sabores, formato, resistência, entre outras características (Embrapa, 2021).

É uma cultura alógama, auto-incompátível, cujas flores não são fertilizadas pelo próprio pólen e propagada vegetativamente, a polinização cruzada é normalmente feita por insectos (Oliveira *et al.*, 2002).

A propagação vegetativa é feita através de caules ou rebentos produzidos pela germinação de gomos das raízes de reserva ou através de estacas retiradas de ramos vigorosos. O ciclo de vida da cultura varia entre 90 e 240 dias, dependendo da variedade e condições ambientais, e está dividido em três fases fisiológicas: Formação das raízes de reserva e ramos (40-60 dias), desenvolvimento máximo das folhas e tuberização (60-120 dias), maturação dos tubérculos e senescência, esta última fase acaba na colheita das raízes e tem uma duração de cerca de 45 a 90 dias (AJAP, 2017).

2.2 Cultura de batata-doce e sua distribuição

Estima-se que em 91,95 milhões de toneladas da produção mundial de batata-doce, a China somente, produz 53,01 milhões de toneladas anualmente. A Ásia é a maior produtora de batata-doce seguindo a África e por último as américas (Faostat, 2020).

A batata-doce foi introduzida na europa no final do século XV, posteriormente foi levada pelos portugueses para Angola, Moçambique, Índia e Timor-Leste, disseminando-se assim pelos continentes africano e asiático (AJAP,2017).

Em 2019 foram produzidas em Moçambique 504.815 toneladas de batata-doce, tornando-se a segunda cultura mais produzida, entre as raízes e tubérculos (Ferrão e Viegas, 2021).

2.3 A importância económica e nutricional da batata-doce

No que concerne a importância económica, a batata-doce e a sétima hortaliça mais importante em termos de produção global, depois do trigo, arroz, milho, batata reno, cevada e mandioca, e a quinta em países em desenvolvimento, depois do arroz, trigo, batata, milho e a mandioca (Stathers *et al.*, 2013 e Grace *et al.*, 2014).

Em África a batata-doce é particularmente importante em países vizinhos dos grandes lagos, Malawi, Angola, Moçambique, Madagáscar e Nigéria. Em Moçambique, Uganda, Tanzânia e Malawi a batata-doce é a segunda cultura entre as raízes e tubérculos mais importante, depois da mandioca. A produção de batata-doce em países como Moçambique, pode ser vista como uma potencial oportunidade para redução da pobreza, melhoramento e geração de renda para mulheres e agregado familiar, segurança alimentar e nutricional (Stathers *et al.*, 2013).

A cultura de batata-doce se mostra como uma actividade de considerável retorno financeiro, pois não é uma cultura onerosa, devido à sua facilidade de cultivo, fácil adaptação, com pouca exigência

em termos de fertilidade do solo, resistência à seca e com baixo custo de produção quando comparada com outras culturas, pois não exige o mesmo nível de sofisticação e grande avanço tecnológico para o seu desenvolvimento (Lebot, 2009).

A batata-doce é muito importante na alimentação humana, pois as suas folhas são ricas em proteínas, suas raízes tuberosas contém carboidratos, betacaroteno, vitaminas C, Vitaminas do complexo B e E, minerais (Ferro, Potássio, Cálcio) e antocianina (nas raízes de polpa roxa) (Embrapa, 2021).

As variedades de polpa alaranjada são ricas em betacaroteno, que quando ingerido é convertido em vitamina A nos intestinos e fígado, possuem ainda propriedades anticancerígenas e cardiovasculares que previnem doenças, e podem ser usadas em produtos para consumidores com algumas restrições alimentares (Stathers *et al.*, 2013).

Para o consumo humano as raízes frescas podem ser ingeridas cruas, fervidas, assadas ou fritas, quando processadas podem ser preparadas em forma de puré, doces, sobremesas ou farinha (Embrapa, 2021).

2.3 Cultura de tecidos vegetais

É uma técnica que consiste na multiplicação de células ou tecidos vegetais em ambiente controlado e asséptico, a partir de fragmentos de plantas, em meio nutritivo. Para chegar à condição de assepsia adequada, são usados frascos ou tubos de ensaio de vidro autoclaváveis, razão pela qual esta técnica é também chamada de cultivo *in vitro* (Embrapa., 2006).

Estes fragmentos podem ser gemas apicais, axilares, raízes, fragmentos foliares ou qualquer tecido que responda as condições de indução do meio de cultura, visando a regeneração vegetal *in vitro*. Esta regeneração é fundamentada pela capacidade das células vegetais proliferarem e organizarem-se em tecidos e eventualmente em plantas completas, esta capacidade é designada totipotência (Andrade, 2002; Carvalho *et al.*, 2006).

São vantagens da propagação *in vitro* em relação aos métodos convencionais: a multiplicação de clones em qualquer época do ano, a produção de espécies que dificilmente seriam propagadas pelos métodos convencionais, a rápida multiplicação clonal de espécies raras e a eliminação de vírus, proporcionando a produção de mudas com alta sanidade (Souza *et al.*, 2007).

2.4 Micropropagação

A Micropropagação, também denominada multiplicação *in vitro*, consiste no cultivo de um explante, extraído de uma planta e cultivado sob condições assépticas (Paiva e Paiva, 2001). Entre as vantagens da sua utilização, está a alta taxa de multiplicação, a rapidez na multiplicação, o controle das condições de cultivo, a multiplicação contínua ao longo do ano, a obtenção de propágulos saudáveis e livres de contaminantes, o espaço reduzido, o armazenamento em longo prazo de germoplasma e sua adaptação para plantas de difícil multiplicação por meio das técnicas convencionais de propagação (Guerra *et al.*, 2016).

2.5 Conservação de germoplasma vegetal

A preocupação com a preservação dos recursos genéticos despertou o interesse pela conservação do germoplasma vegetal há mais de 30 anos, de modo a protegê-lo de eventuais perdas e garantir o seu uso sempre que necessário para o atendimento das demandas de variabilidade genética e programas de melhoramento, principalmente aqueles voltados para alimentação (Santos e Salomão, 2010).

2.6 Métodos de conservação de germoplasma vegetal

Segundo Faleiro (2008), uma das ações que podem garantir esta preservação dos recursos genéticos é a conservação da variabilidade genética, que pode ser feita *in situ*, ou *ex situ*. A melhor estratégia de conservação pode ser analisada de acordo com a diversidade biológica e categoria de plantas a ser conservada.

Os métodos de conservação de plantas superiores podem ainda ser ajustados de acordo com o sistema de propagação de cada espécie. Para espécies tropicais produtoras de raízes e tubérculos que geralmente são propagadas vegetativamente, o método mais adequado é o método de conservação *ex situ*, no campo ou no laboratório, *in vitro* (Mroginski.,1991: citado por Souza *et al.*,2009).

2.6.1 Conservação *ex situ- in vitro*

Compreende a manutenção de espécies fora do seu ambiente de ocorrência natural, através de técnicas de cultura de tecido, em ambiente livre de contaminantes, em condições controladas de

temperatura, fotoperíodo e em meio de cultura que favoreça um crescimento lento (Matsumoto *et al.*, 2010).

A conservação *in vitro* pode ser realizada de duas formas, através de crescimento lento (conservação em baixas temperaturas) ou através de criopreservação (conservação em ultra baixas temperaturas) (Guerra *et al.*, 2016).

2.6.2 Crescimento lento

Consiste em reduzir drasticamente o metabolismo da planta, sem afectar sua viabilidade, pela indução de stresse osmótico, redução da intensidade de luz ou temperatura, acréscimo de retardantes de crescimento e/ou diminuindo a concentração dos componentes salinos e orgânicos do meio de cultura (Withers e Williams, 1998; Silveira, 2017).

Essa técnica *in vitro* visa reduzir o metabolismo celular, com a finalidade de aumentar o tempo entre os subcultivos (Engelmann, 2011).

Dentre os factores que afectam o sucesso da conservação por crescimento lento, podem ser citados, a qualidade dos explantes a ser utilizados, a temperatura de armazenamento dos explantes, o regime de fotoperíodo adequado, o meio de cultura e frascos utilizados (Guerra *et al.*, 2016).

2.6.3 Criopreservação

Consiste na conservação de material biológico por um longo período, sob condições de ultrabaixas temperaturas em nitrogénio líquido (-196°C) (Santos, 2001; Gimeneses e Barbieri, 2010; Guerra *et al.*, 2016).

2.6.3 Conservação *in situ*

A conservação *in situ* abrange a preservação contínua de uma população na comunidade a qual pertence, e dentro do ambiente a qual esta adaptada, a manutenção e recuperação de populações viáveis de espécies em seus ecossistemas e habitats naturais, e no caso de espécies domesticadas ou cultivadas, nos meios onde tenham desenvolvido suas propriedades características (Eira, 2001).

2.7 Factores que influenciam a conservação

2.7.1 Temperatura

A baixa temperatura tem sido utilizada amplamente e com sucesso como alternativa viável para a conservação *in vitro* de células de varias espécies (Kiwi, maçã, pêra, ameixa, cereja, uva, morango, batata, beterraba, batata-doce, mandioca, várias forrageiras, ananás e brócolis) (Lemos *et al.*, 2002).

A temperatura fixada para a conservação *in vitro* varia de 20°C a 10-15°C para culturas tropicais e subtropicais respectivamente. Pode também ser utilizada a diminuição da intensidade luminosa e do fotoperíodo, porém de forma moderada, pois a diminuição drástica destes factores pode causar o estiolamento e inactivação da clorofila, podendo causar a uma redução intensa no crescimento e eventualmente a morte da planta (Matsumoto, 2010).

2.7.2 Meio de Cultura

Os meios de cultura são a combinação de macro e micronutrientes, corbohidratos, vitaminas e fitohormonas (Andrade, 2002). Podendo ser classificados de meios sólidos, adicionando-se ágar ou gerlite e líquido (Guerra *et al.*, 2016). Os meios de cultura são baseados nas exigências nutricionais das plantas, variando de acordo com as exigências nutricionais de cada planta, pois essas substâncias controlam o desenvolvimento natural destas no meio *in vitro* (Guerra *et al.*, 2016).

2.7.3 Composição dos meios de cultura

Os meios de cultura são constituídos por múltiplos componentes essenciais e opcionais, que variam em função da espécie vegetal e da origem dos explantes (Paiva e Paiva, 2001). Os essenciais compreendem a água, os sais inorgânicos, a fonte de carbono, as vitaminas e os aminoácidos. Entre os componentes opcionais estão incluídos as amidas, os ácidos orgânicos, os reguladores de crescimento e as substâncias naturais complexas. (Paiva e Paiva, 2001; Guerra *et al.*, 2016).

Segundo Guerra *et al.* (2016), o meio White (1942), foi um dos primeiros meios de cultura a ser desenvolvido, meio este que apresenta baixo nível de nitrogénio e de potássio. O meio MS (Murashige e Skoog, 1962) foi um dos primeiros meios com uma formulação melhorada a ser usado em cultura de tecidos de plantas, apresentando altos níveis de nitrato, potássio e amónio.

2.7.4 Compostos orgânicos

Os compostos orgânicos importantes são os carboidratos, substâncias reguladoras de crescimento, vitaminas, aminoácidos e amidas, certas purinas e pirimidinas, hexitóis e ácidos orgânicos.

As células, tecidos e plântulas cultivadas *in vitro*, apresentam uma baixa taxa fotossintética, portanto é necessário que seja adicionada uma fonte de carboidratos. Os carboidratos mais usados nos meios de cultura são a sacarose, a glicose e a frutose (Guerra *et al.*, 2016).

2.7.5 Sacarose

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 hidrolisada em glicose e frutose (CID, 2001).

2.7.6 Vantagens da conservação *in vitro*

Segundo Guerra *et al.* (2016), a conservação *in vitro* apresenta vantagens, como conservação por longos ou médios períodos em particulares as espécies recalcitrantes, fácil acesso dos recursos fitogenéticos, redução dos custos de manutenção e a susceptibilidade a doenças e pragas que as plantas e sementes estão sujeitas no meio *ex vitro*.

2.7.7 Desvantagens

Segundo Guerra *et al.* (2016), a conservação *in vitro* apresenta algumas desvantagens, como variações deletérias, como redução na fertilidade e fixação de frutos e sementes e outras variações morfológicas, ocorrem em variantes somaclonais, com várias implicações no melhoramento de plantas, principalmente quando a uniformidade genética é o objectivo. O sucesso de um sistema regenerativo *in vitro* é dependente da adequação de um meio de cultura apropriado para cada espécie.

2.8 Teste de viabilidade pós conservação

É necessário que o método de conservação garanta a máxima viabilidade e estabilidade genética dos acessos após o período de conservação (Souza *et al.*, 2009).

Para o teste de viabilidade, colectou-se aleatoriamente para cada variedade tubos de ensaio contendo plântulas, de seguida retirou-se as folhas e cortou-se as plântulas em segmentos de cerca de 1 cm, contendo uma gema lateral, de seguida os segmentos foram inoculados em frascos contendo meio de cultura para multiplicação e submetidos a temperatura de 24°C por um período de 15 dias, pois a retoma do crescimento das plântulas pós conservação sob crescimento lento, deve ser restabelecida nas condições normais de cultivo. Após 15 dias, fez-se uma análise qualitativa das plântulas, observando a cor e aspecto das folhas e com o auxílio de uma régua mediu-se o comprimento médio das plântulas.

2.9 Conservação *in vitro* em Moçambique

A diversidade biológica em Moçambique esta registada a nível de sistemas de conservação *ex-situ*, estes sistemas incluem jardins botânicos, arboreto, bancos de semente, bancos de germoplasma *in vivo* e colecções *in vitro*. As colecções *in vitro* que existem em Moçambique estão concentradas no IIAM, no sector de raízes e tubérculos, e têm a finalidade de uma rápida multiplicação, manutenção e distribuição segura da mandioca e da batata-doce (MITADER, 2015).

Em Moçambique os sistemas de conservação da biodiversidade *ex situ*, mostram-se precários, há portanto uma necessidade de maior investimento em recursos, capacitação, sistematização e melhoramento das colecções existentes para garantir a conservação dos recursos genéticos (MITADER, 2015).

III. Área de estudo

O estudo foi realizado no laboratório de biotecnologia do Instituto de Investigação Agrária de Moçambique (IIAM), sito na cidade de Maputo, bairro de Mavalane “A” na latitude 25°931611 e longitude 32°585692. O laboratório de cultura de tecidos do IIAM está dividido em 4 compartimentos: sala de lavagem, a sala de preparação do meio de cultura, a sala de inoculação, e a salas de crescimento. As salas e crescimento e de inoculação possuem equipamentos que possibilitam o controlo da temperatura, intensidade luminosa e fotoperíodo e que possibilitam que o trabalho seja feito em condições assépticas.

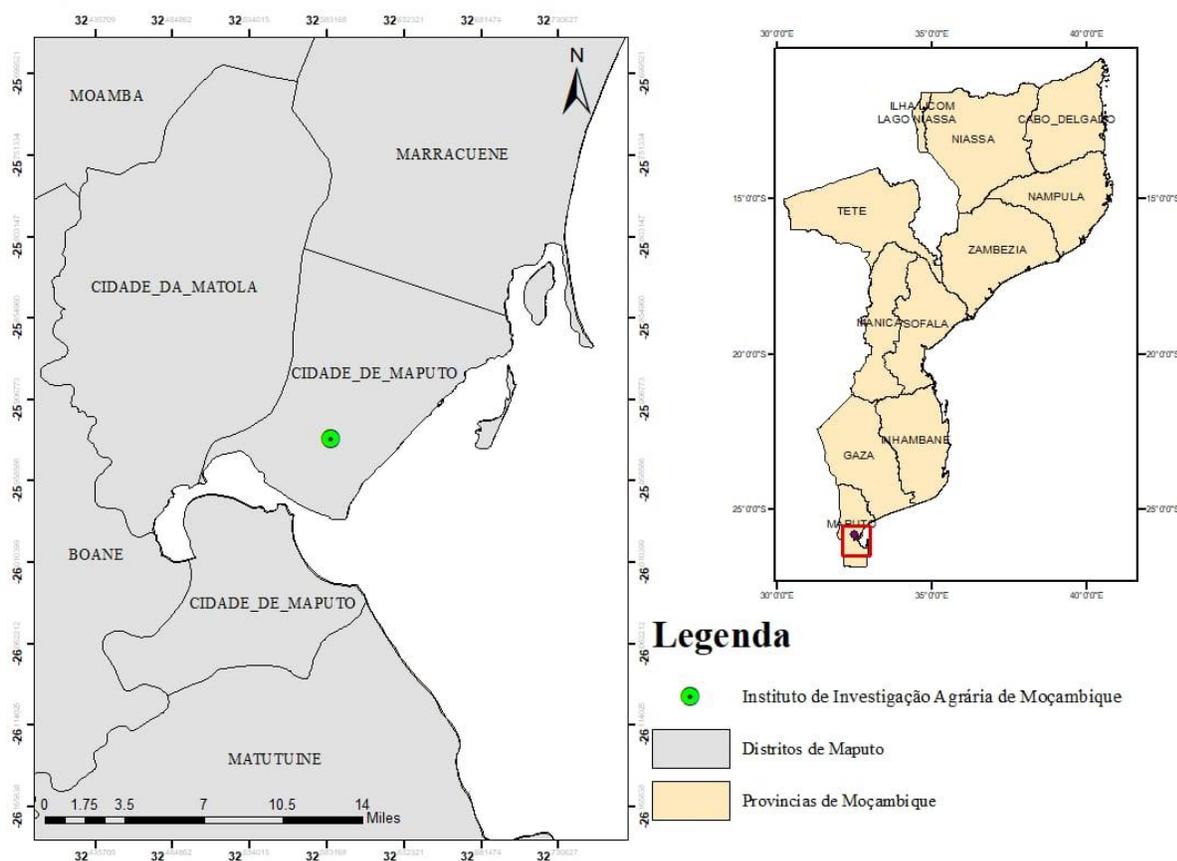


Figura 1: Localização geográfica da área de estudo: IIAM

IV. Material e Metodologia

4.1 Amostragem

O material vegetal usado para obtenção de explantes e posterior conservação, foram plântulas da espécie *Ipomea batatas*, variedades Ininda, Palmira e Resisto, mantidas em uma sala de crescimento no laboratório de Biotecnologia do IIAM, a uma temperatura de 24° C, intensidade luminosa de 2000 Lux fornecida por lâmpadas fluorescentes e fotoperíodo de 16/8 horas de luz/escuro, respectivamente, num meio de cultura específico para multiplicação, em condições assépticas.

4.2 Materiais e Equipamentos

1. Agitador magnético;
2. Algodão;
3. Autoclave;
4. Balança analítica;
5. Bandejas plásticas;
6. Barra Magnética;
7. Bisturis;
8. Borrifadores;
9. Buretas;
10. Câmara de fluxo laminar;
11. Copos de Becker (2l, 250 ml);
12. Pipetas graduadas e micropipetas
13. Régua (30cm);
14. Tubos de ensaio;
15. Copos graduados;
16. Esferográfica;
17. Etiquetas;
18. Frascos de vidro (250ml);
19. Lamparina;
20. Microondas;
21. Papel A4;
22. Papel de alumínio;
23. Película aderente;
24. pH metro;
25. Pinças;
26. Provetas;
27. Tesoura.

4.3 Soluções

1. Água destilada
2. Álcool (95% e 70%)
3. Sacarose
4. Meio MS
5. Ágar

4.4 Métodos

Numa câmara de fluxo laminar com o auxílio de pinça e bisturi, foram excisados um total de 240 segmentos nodais de aproximadamente de 1 cm, contendo uma ou duas gemas. Cada explante foi posteriormente introduzido no tubo de ensaio contendo o meio de cultura para multiplicação, porém com algumas alterações (Tabela 1). Posteriormente os tubos foram fechados com papel de alumínio e selados com película aderente e etiquetados com o código de identificação correspondente a concentração de sacarose.

Tabela 1: Variação da concentração de sacarose nos diferentes

Tratamento	
Tratamento 1	MS + 30 g/L de sacarose
Tratamento 2	MS + 22,5 g/L de sacarose
Tratamento 3	MS + 15 g/L de sacarose

4.2.3. Procedimentos para preparação de 1 litro de meio de cultura

Preencheu-se um copo de 1 l com aproximadamente 700 ml de água e foram adicionados os outros componentes consoante o tipo de tratamento (Tabela 1) e colocou-se o copo num agitador magnético. A seguir, adicionou-se água destilada para perfazer o volume de 1000 ml de solução, ajustou-se o pH para 5.7 e adicionou-se 7g/l de ágar em cada meio, deixou-se homogeneizar, a seguir colocou-se o copo contendo a solução no microondas por 12 minutos.

Por fim distribuiu-se 2.5 ml de meio em tubos de ensaio autoclavados, num total de 20 tubos por tratamento, posteriormente foram fechados com papel de alumínio e submetidos à autoclavagem

por 15 minutos, a 121 °C e pressão 1 atm, para esterilização. Após este procedimento os tubos foram retirados e conservados em local fresco por 72 horas, de modo a verificar possíveis contaminações.

4.2.4 Procedimentos para conservação

Para evitar contaminações por fungos e bactérias, e trabalhar em condições de assepsia, limpou-se a área de trabalho (câmara de fluxo laminar) com algodão e álcool a 70% e ligou-se a câmara de fluxo laminar, regulou-se a pressão para 180 atm, 30 minutos antes do seu uso. Após 30 minutos, limpou-se as mãos e braços com álcool a 70%.

Com auxílio de uma pinça, bisturi e tesoura, esterilizados e passados em chama, retirou-se as folhas das plântulas estabelecidas *in vitro* e mantidas em sala de crescimento nas condições descritas acima (amostragem) e cortou-se em segmentos nodais de aproximadamente 1 cm contendo 1 ou 2 gemas, estes segmentos foram usados como explantes. De seguida cada explante foi inoculado em um tubo de ensaio contendo meio, foram tapados com papel alumínio e selados com película aderente e etiquetado com o código de identificação correspondente a concentração de sacarose e data de inoculação.

4.2.5 Incubação

As culturas foram distribuídas e armazenadas em 2 salas de crescimento sob as temperaturas de 18° C e 24°C, fotoperíodo de 16h luz e 8h escuro, com intensidade luminosa de 2000 Lux por um período de 180 dias.

4.2.6. Controle das plântulas e colecta de dados

A experiência foi controlada semanalmente para verificar se havia material contaminado e retirar de modo a não contaminar outro material. A colecta dos dados foi feita num período de 180 dias, 90 dos quais na primeira fase e os restantes 90 na segunda fase, onde 3 tubos de ensaio foram seleccionados aleatoriamente.

4.2.7 Parâmetros de crescimento

Foram avaliados os seguintes parâmetros fisiológicos: altura da parte aérea em cm, contagem do número de folhas verdes e número de folhas senescentes. Para avaliar a altura da planta foi usada uma régua, medindo a plântula a partir da base até a parte apical.

4.3. Desenho experimental

A experiência obedeceu um delineamento inteiramente causalizado, em esquema factorial 3 (variedades) x 3 (concentrações de sacarose) x 2 (temperaturas), com 20 repetições, cada uma representada por uma planta cultivada num tubo de ensaio. Os factores avaliados foram a concentração de sacarose e a temperatura. Para avaliar a influência da sacarose, foram feitos 3 tratamentos, distribuídos em concentrações diferentes, nomeadamente, 30g (controle), 22,5g e 15g, para cada tratamento foram usados 20 tubos de ensaio. Para avaliar o efeito da influência da temperatura, cada tratamento com diferentes concentrações de sacarose foi duplicado e os tubos foram distribuídos em 2 salas de crescimento com temperaturas de 18°C e 24°C. As culturas foram armazenadas em 2 salas de crescimento sob as temperaturas de 18° C e 24°C e fotoperíodo de 16h luz e 8h escuro.

4.4. Análise de dados

Os dados obtidos nas diferentes colheitas foram organizados no *Software* Excel versão 2013, posteriormente analisados no pacote estatístico ASSISTAT 1.0. Para determinar a taxa de crescimento foram feitas comparações múltiplas com recurso ao teste de Tuckey a um nível de significância de 5% e a regressão linear para descrever a inter-relação funcional entre as variáveis, foi feita uma correlação para avaliar o grau da interacção entre as diferentes concentrações de sacarose e os parâmetros.

5. Resultados

5.1. Efeito da temperatura e de diferentes concentrações de sacarose sobre os parâmetros fisiológicos:

5.1.1. Número de folhas senescentes

Após um período de 90 dias do estabelecimento da experiência, as plântulas submetidas à temperatura de 18° C apresentaram um número de folhas senescentes menor em relação as plântulas submetidas à temperatura de 24° C. Foi notável a diferença significativa das médias do número de folhas senescentes entre as três variedades, no qual as variedades Ininda, Resisto e Palmira apresentaram as médias 0, 0 e 3 folhas senescentes, respectivamente.

Após um período de 180 dias do estabelecimento da experiência, as plântulas submetidas à temperatura de 18° C apresentaram um número de folhas senescentes menor em relação as plântulas submetidas à temperatura de 24° C. Aos 90 dias o número médio de folhas senescentes não apresentou diferenças significativas nas plântulas submetidas a ambas temperaturas (18° C e 24° C), excepto no tratamento 2. De igual forma as médias foram iguais para as diferentes concentrações de sacarose (Anexo 2).

5.1.2. Efeito de diferentes temperaturas e concentrações de sacarose na conservação de *Ipomea batatas*

As alturas médias das plântulas foram maiores na variedade Ininda no tratamento com 24°C e concentração de 30 g/L de sacarose, no entanto, aos 90 dias as variedades (Ininda, Resisto e Palmira) apresentaram valores similares em todos os tratamentos. Após 180 dias de estudo a altura média foi maior na variedade Ininda no tratamento com 24°C e concentração de 15 g/L de sacarose em relação as variedades (Palmira e Resisto). Após o primeiro período (90 dias), as plântulas submetidas à temperatura de 24°C apresentaram alturas médias maiores em relação as plântulas submetidas à temperatura de 18° C (Figura 2A). Foram verificadas diferenças significativas na altura das três variedades ($p < 0,001$). Quanto maior concentração de sacarose maior é altura das plantas, aos 90 dias com a concentração de 15g/L de sacarose as variedades Ininda, Resisto e Palmira apresentaram as seguintes alturas médias 0,6 cm, 1,0 cm e 2,3 cm respectivamente (Figura 2A).

Após um período de 180 dias do estabelecimento da experiência, as plântulas submetidas à temperatura de 24° C apresentaram alturas médias maiores em relação as plântulas submetidas à

temperatura de 18° C. Foi notável a diferença das médias da altura entre as três variedades, no entanto não houve diferenças significativas ($p>0.069$), a altura média a 18° C com 15g/L foi de 5,16 cm e a 24°C com 15g/L foi de 7,48 cm (Figura 2B).

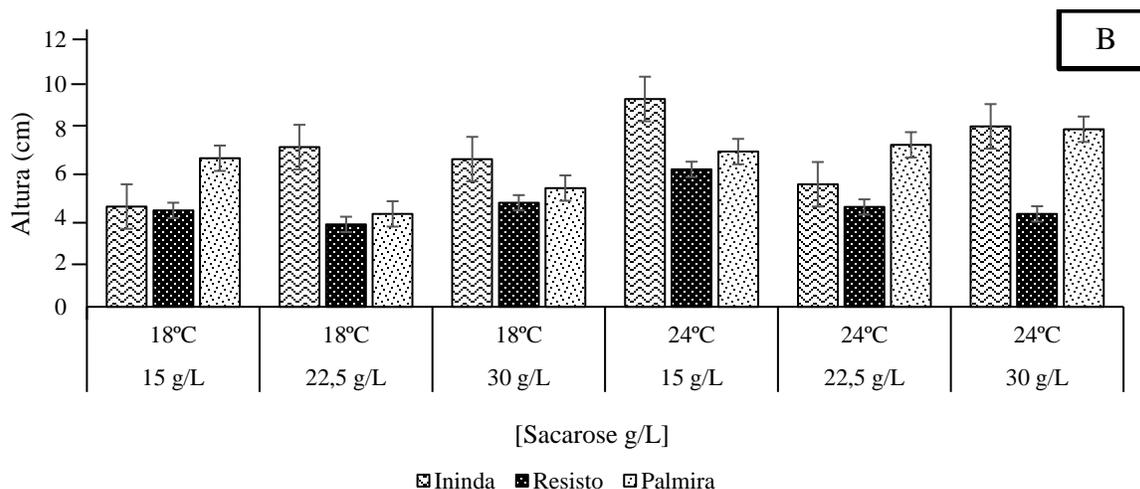
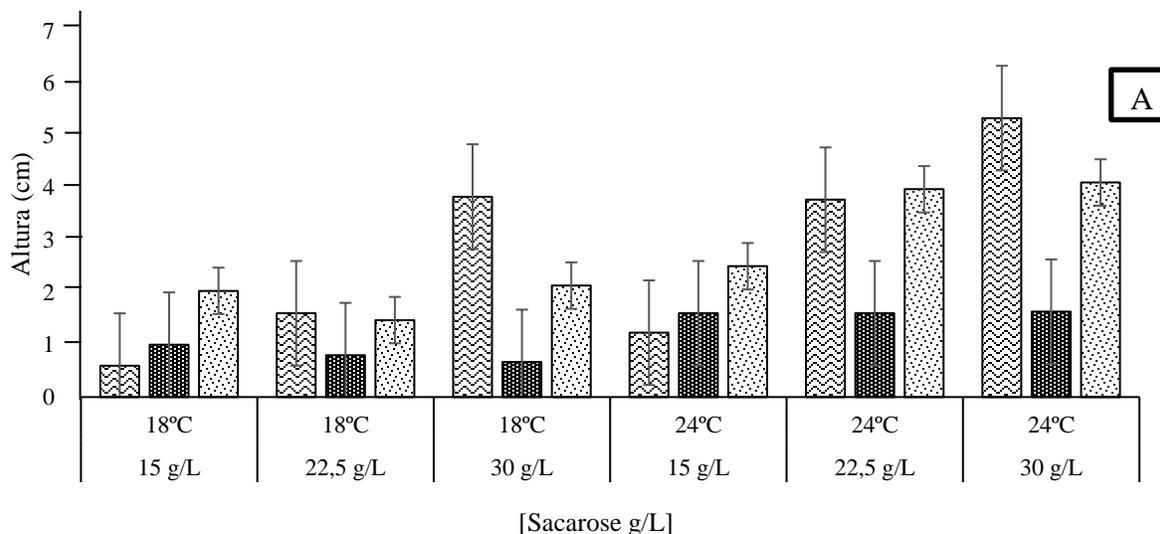


Figura 2: Efeito da temperatura (18°C e 24°C) e da concentração de sacarose (15,22,5 e 30 g/L) sobre a altura das plântulas após 90 dias (A) e 180 dias (B) de crescimento.

Para o caso das folhas verdes na temperatura de 18°C com uma concentração de sacarose de 15 g/L as plântulas tiveram uma média de $4,33 \pm 1,33$ de folhas verdes por plântula, e com 22,5 g/L tiveram uma média de $5,67 \pm 2,2$ de folhas verdes por plântula e com 30 g/L de sacarose tiveram $8,11 \pm 2,07$ de folhas verdes por plântula.

No tratamento com temperatura de 24°C e uma concentração de sacarose de 15 g/L as plântulas tiveram uma média de $7,66 \pm 1,94$ de folhas verdes por plântula, e com 22,5 g/L tiveram uma média de $8,33 \pm 3,33$ de folhas verdes por plântula e com 30 g/L de Sacarose tiveram $9,77 \pm 1,81$ de folhas verdes por plântula (Figura 3A).

A variedade Palmira em relação a variedade Ininda apresentou uma média maior de número de folhas verdes nas três concentrações de sacarose (15, 22,5 e 30 g/L) e nas duas temperaturas (18 e 24°C); Enquanto aos 180 dias a variedade Resisto apresentou maior número de folhas verdes na temperatura 18°C com concentração de 30g/L de sacarose, (Anexo1, figura 3B), a variedade Ininda apresentou maior número de folhas verdes aos 90 e 180 dias nas concentrações de sacarose (22,5 e 30 g/L) e nas duas temperaturas (18 °C e 24°C). Após um período de 90 dias do estabelecimento da experiência, as plântulas submetidas à temperatura de 18° C apresentaram número de folhas verdes menores em relação as plântulas submetidas à temperatura de 24°C. Porém, não foram observadas diferenças significativas ($p>0,06$) entre as três variedades.

Após um período de 180 dias do estabelecimento da experiência, as plântulas submetidas à temperatura de 18° C apresentaram número maior de folhas verdes em relação as plântulas submetidas à temperatura de 24° C. Foi notável a diferença das médias do número de folhas verdes entre as três variedades, entretanto não houve diferenças significativas ($p>0,06$), no qual a 18° C com 30g/L foi de 11 folhas, e a 24°C com 30 g/L foi de 7 folhas.

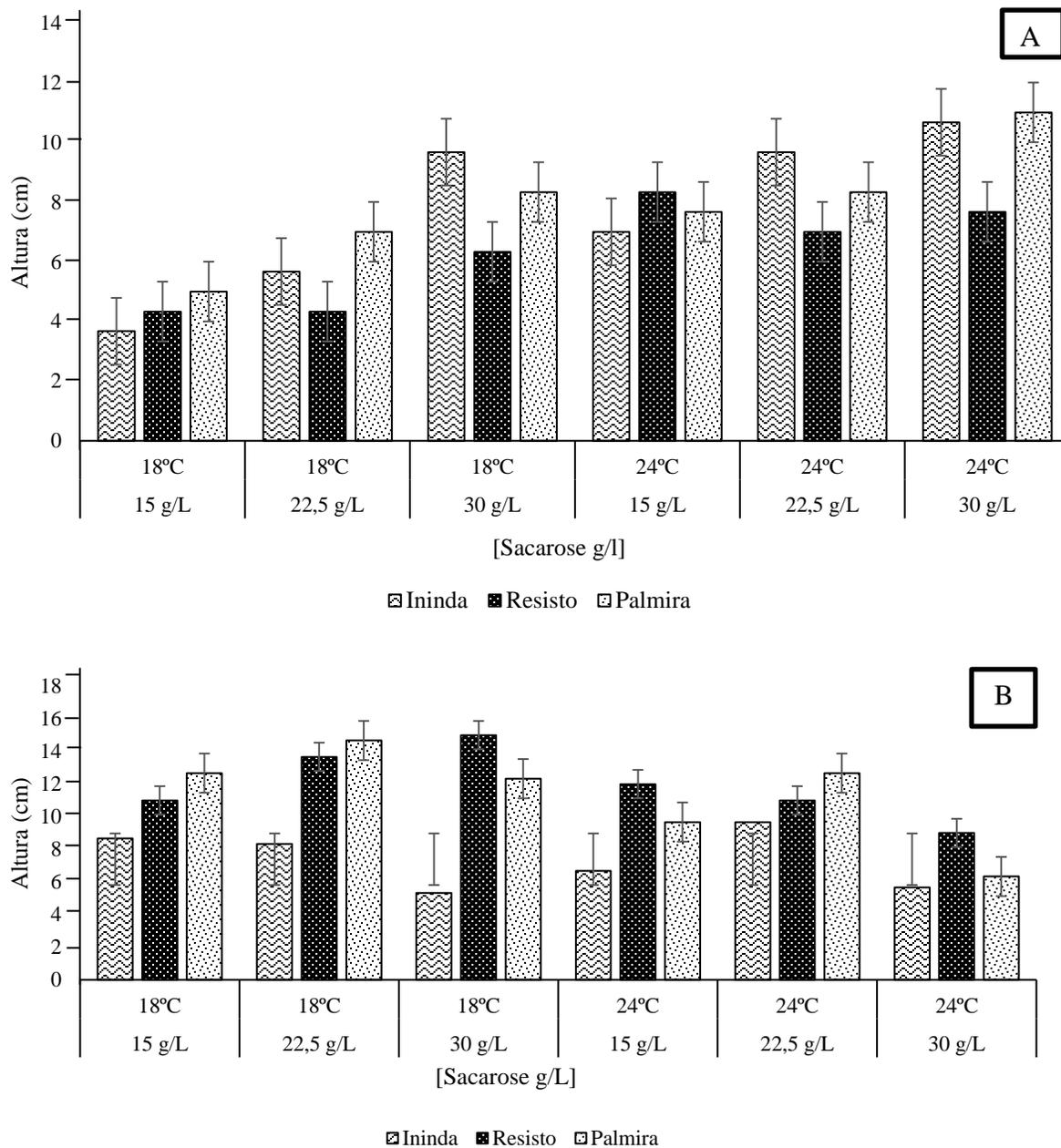


Figura 3: Efeito da temperatura (18°C e 24°C) e da concentração de sacarose (15,22,5 e 30 g/L) sobre folhas verdes das plântulas após 90 dias (A) e 180 dias (B) de crescimento.

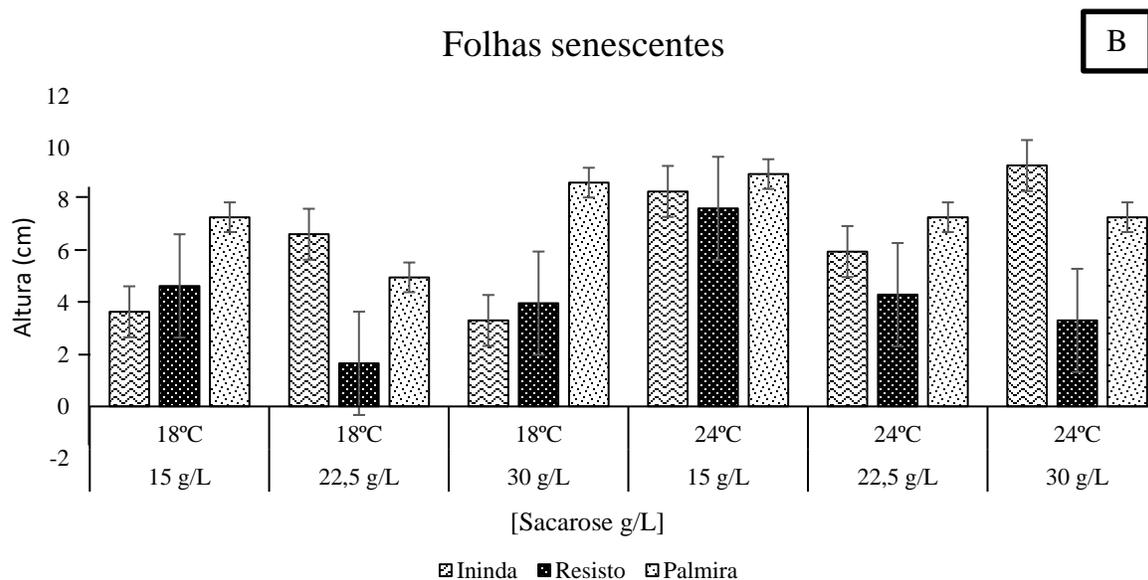
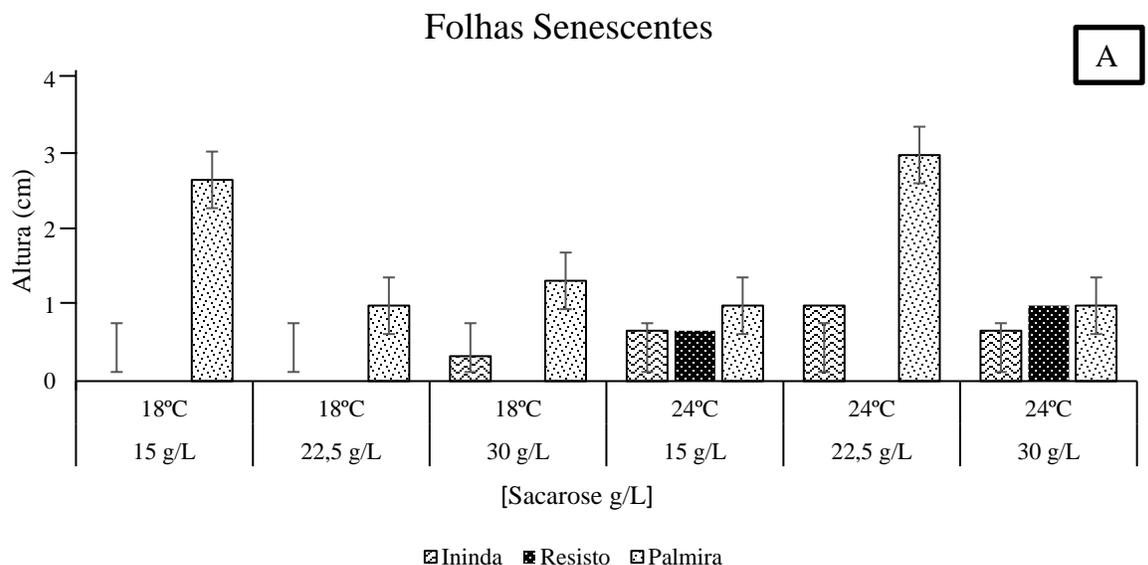


Figura 4: Efeito da temperatura (18°C e 24°C) e da concentração de sacarosa (15, 22,5 e 30 g/L) sobre a altura das plântulas após 90 dias (A) e 180 dias (B) de crescimento.

Para o caso das folhas verdes na temperatura de 18°C com uma concentração de sacarose de 15 g/L as plântulas tiveram uma média de $10,77 \pm 2,61$ de folhas verdes por plântula, e com 22,5 g/L

tiveram uma média de $12,22 \pm 3,82$ de folhas verdes por plântula e e com 30 g/L de Sacarose tiveram $10,88 \pm 4,77$ de folhas verdes por plântula.

Enquanto na temperatura de 24°C com uma concentração de sacarose de 15 g/L as plântulas tiveram uma média de $9,44 \pm 3,23$ de folhas verdes por plântula, e com 22,5 g/L tiveram uma média de $11,11 \pm 2,84$ de folhas verdes por plântula e com 30 g/L de Sacarose tiveram $7,0 \pm 3,49$ de folhas verdes por plântula (Figura 4B).

No tratamento com temperatura 18°C e concentração de sacarose de 15 g/L as plântulas tiveram uma média de $5,22 \pm 3,22$ folhas senescentes, com 22,5 g/L tiveram uma média de $4,44 \pm 2,21$ folhas senescentes e com 30 g/L tiveram uma média de $5,33 \pm 3,65$ folhas senescentes. Enquanto no tratamento com temperatura 24°C e concentração de sacarose de 15 g/L tiveram uma média de $8,33 \pm 3,36$ folhas senescentes, com 22,5 g/L tiveram uma média $5,88 \pm 4,35$ folhas senescentes e com 30 g/L tiveram uma média de $6,66 \pm 3,46$ folhas senescentes (Anexo 1).

5.2. Identificação da temperatura e concentrações de sacarose eficientes na conservação de *Ipomea batatas*;

Em relação à temperatura e concentração de sacarose eficientes para a conservação da batata, cada variedade mostrou-se diferente em relação a resposta do ideal para conservação, mas no geral a temperatura ideal foi de 18°C e com concentração de 22,5 g/L (Figura 5).

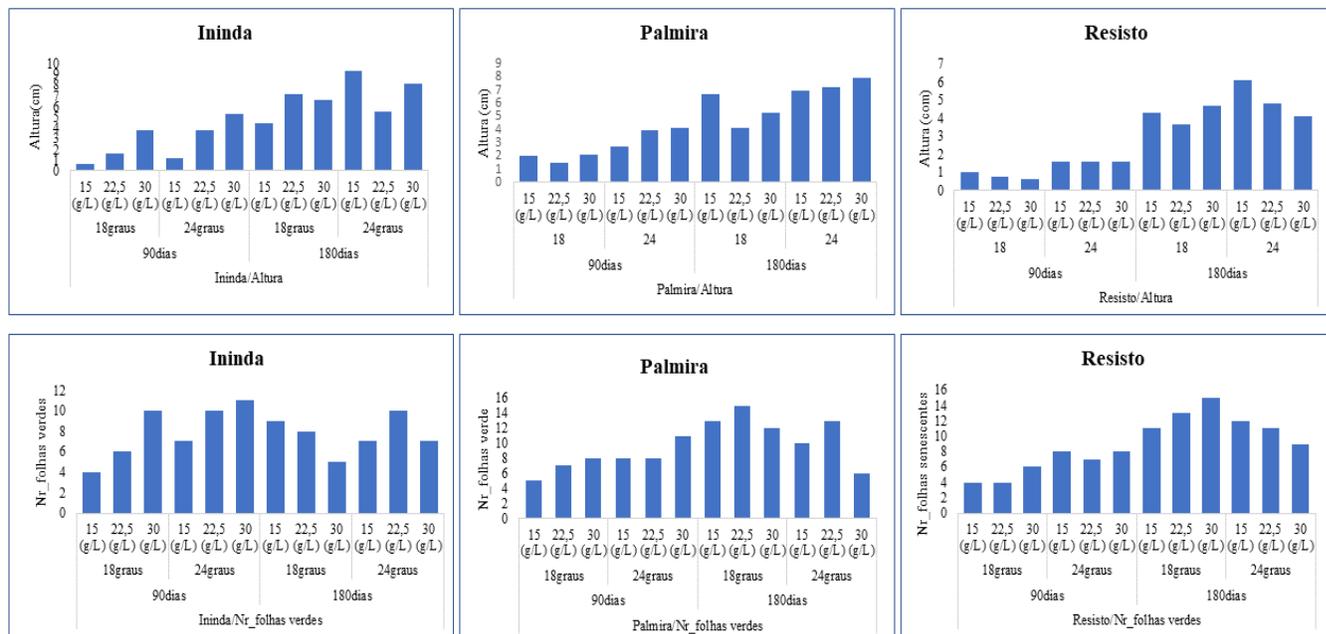


Figura 5: Temperatura e concentração ideal para a conservação em relação aos parâmetros (altura e número de folhas)

6. Discussão

6.1. Parâmetros fisiológicos

Uma maior altura nas plantas foi verificada na variedade Palmira com 24°C e concentração de 30 g/L isso deve-se ao facto desta temperatura ser favorável para o crescimento da batata, segundo (Cabrera *et al.*, 2019) a batata exige regiões quentes e húmidas, a planta brota o ano todo em processos mais rápidos, durante o dia e ela deve ficar em temperaturas de no mínimo de 24°C de modo a apresentar um óptimo desenvolvimento. Do mesmo modo Morales-Tejón *et al.* (2017) verificaram que o meio com 30 g/L foi o que proporcionou maior desenvolvimento de parte área. Os resultados mostraram no geral que as variedades responderam melhor para as baixas temperaturas e menor concentração de sacarose. Em termos de número de folhas verdes e senescentes foi verificado que as três formulações de sacarose mostraram maior número de folhas verdes no período de 90 dias e isso deve-se ao facto das plantas estarem ainda a adaptar-se ao meio (Tyagi *et al.*, 2009). Jarret (1997), estudando *Ipomoea batatas* verificou que nos primeiros 3 meses as plantas apresentavam maior número de folhas verdes, bem como apresentavam maior crescimento e a quantidade de folhas mostrou-se elevado, apresentando uma média de 8,5 folhas por plântula o que está de acordo com os resultados deste estudo.

6.2. Efeito de diferentes temperaturas e concentrações de sacarose na conservação de *Ipomea batatas*;

A conservação *in vitro* por ser realizada em condições controladas evita que as plantas sejam sujeitas às intempéries e aos riscos que ocorrem no campo, reduz custos, garante a manutenção da fidelidade genética e facilita a troca de germoplasma. Vale ressaltar que, apesar de ser uma planta silvestre, a batata-doce é susceptível à muitas doenças causadas por fungos, vírus e nematóides e é vulnerável a pragas como insectos e ácaros, assim, o banco de germoplasma activo no campo é vulnerável à perda e, portanto, requer conservação *in vitro* (Wang *et al.*, 2013)

A temperatura é um factor ambiental crucial, que influencia a fisiologia e o metabolismo das plantas desde a germinação até a reprodução. As diferentes temperaturas combinadas com cada concentração de sacarose revelaram diferenças significativas na variável altura, que produziu uma média mais baixa na temperatura de 18°C. Independentemente do período de conservação, apenas duas variedades (Resisto e Palmira) apresentaram diferenças significativas nas diferentes concentrações de sacarose. As variedades Ininda, Resisto e Palmira apresentaram média inferior

da altura aos 90 dias e, na concentração de 22,5 g/L a 18°C, no qual apresentou menor altura da parte aérea em relação.

A análise do efeito combinado da sacarose e da temperatura a 18°C revelou que as concentrações resultaram em efeitos significativos em relação ao número de folhas e altura de plantas. Existem vários relatos na literatura destacando o impacto de baixas temperaturas na conservação *in vitro* de batata (Tyagi *et al.*, 2009)

Aos 180 dias, houve diferenças significativas entre as variedades Ininda, Resisto e Palmitra quanto às concentrações de sacarose testadas. Para a variedade Ininda, uma melhor taxa de sobrevivência foi obtida com 15 g/L (58,89%) de sacarose, mas esse efeito não diferiu significativamente da média obtida com 30 g/L de sacarose. Para a variedade resisto, maior sobrevivência foi observada no tratamento com 22,5 g/L de sacarose. Este facto deve se principalmente a maior actividade enzimática a essa concentração de sacarose o que possibilitou que as plantas pudessem ter uma taxa de sobrevivência maior.

Variações na concentração de sacarose foram testadas com sucesso para a conservação *in vitro* de várias espécies, como batata, batata-doce e mandioca. Na literatura, há relatos da conservação *in vitro* de *Ipomoea batatas* com variações em sais de MS e sacarose. Vettorazzi *et al.* (2011) testou quatro concentrações de sais MS (0, 10, 50 e 100%), quatro concentrações de sacarose (0, 10, 20 e 30 g/L) e duas temperaturas ($18 \pm 2^\circ\text{C}$ e $27 \pm 2^\circ\text{C}$). Aos 240 dias, as microplantas de batata-doce puderam ser conservadas com 100% de sais de MS e 20 g/L de sacarose a uma temperatura de 18°C (Arrigoni-Blank, *et al.*, 2014). Neste trabalho, foi possível manter as variedades por seis meses com a taxa média de sobrevivência de 74,44% e 66,67%, respectivamente, sendo que a temperatura de 18°C foi a melhor para conservar as plântulas por seis meses. Observou-se ainda que na ausência de sacarose, a percentagem de germinação foi baixa independentemente da variedade, porém houve uma melhoria à medida que a concentração de sacarose foi sendo aumentada até um determinado valor, mas a partir desse valor, a resposta foi negativa.

Considerando o efeito da sacarose isoladamente, observa-se que a concentração 22,5 g/L foi a que apresentou melhores médias para a conservação. Espinosa *et al.* (2003) observou a relação positiva entre a percentagem de germinação e a concentração de sacarose até 7,5%, a partir desta, a resposta foi diminuída e na concentração de sacarose a 20% não houve germinação.

Considerado o efeito da sacarose isoladamente a melhor concentração foi a de 22,5 g/L com uma média foi de $11,11 \pm 2,84$. De acordo com Arrigoni-Blank *et al.* (2014) o suprimento extra de

sacarose mantém a pressão osmótica e actua como um substrato para o metabolismo, por outro lado, o a sacarose está directamente envolta no crescimento das plantas. Alguns trabalhos realizados relataram que o uso de sacarose na concentração de 15 g/L pode ser utilizado para fornecer condições necessárias para a germinação e crescimento de explantes (Lata *et al.*, 2010). Outros estudos realizados na conservação definiram como óptimo um meio suplementado com 30 g/L de sacarose, o que de certa forma mostra a concentração de 22 g/L ter sido ideal para a conservação das variedades de batata.

O efeito da temperatura e sacarose na conservação de grãos de plantas em culturas *in vitro* tem sido avaliado e os resultados são variáveis. Em batata, a temperatura e a sacarose no meio não mostraram efeito positivo na conservação *in vitro* ((Jarret, 1997 e Wang *et al.*, 2013).

Franzon *et al.* (2007) avaliando o efeito da temperatura em relação ao meio de cultura padrão em duas populações de pitangueira observaram que 24°C não influenciam na média de conservação *in vitro* em nenhuma das populações.

Entretanto, o efeito da sacarose na conservação *in vitro* é dependente da concentração deste produto no meio de cultura considerando que há uma concentração ideal para promover a conservação; abaixo ou acima deste valor há um efeito negativo da sacarose. A interacção entre a sacarose e a temperatura promoveu os melhores percentuais de conservação *in vitro* de *Ipomea batatas*, entretanto esta resposta é dependente da concentração dos constituintes do meio de cultura; e o tratamento que melhor respondeu ao trabalho foi de 18°C e 15 g/L.

No presente trabalho, as concentrações mais baixas de sacarose (15 e 22,5 g/L) no meio de cultura limitaram o crescimento dos explantes, mas mantiveram as melhores viabilidades e as menores percentagens de oxidação dos meios, proporcionando, assim, maior longevidade dos explantes. Por outro lado, o tratamento com 30 g/L de sacarose apresentou alta percentagem de oxidação do meio de cultura e a manutenção da viabilidade dos explantes foi significativamente reduzida. Vettorazzi *et al* (2017) constataram que altas concentrações de sacarose induziram oxidação e problemas de excessivo potencial osmótico do meio, o que levou a uma deterioração das culturas.

Estudando o efeito de temperatura na conservação de batata-doce, verificou-se que a temperatura de 18°C foi a que melhor respondeu em termos de conservação, estudos feitos em mamoeiro

observaram que na faixa entre 20-25°C houve um maior percentual de germinação, o que está em concordância com os dados do (anexo 1) na qual na temperatura de 24°C houve maior crescimento das plantas. A temperatura influencia no crescimento das plantas, podendo acelerá-lo ou retardá-lo (Cabrera, *et al* 2019). O crescimento da batata foi afectado pela temperatura nas três variedades (Figura 2). Além de baixos índices de germinação, temperaturas baixas (15 a 20°C) propiciaram menor alongamento dos caules. Acréscimo no desenvolvimento dos caules foi observado em 25°C e plantas mais desenvolvidos foram encontrados na temperatura de 24 a 30°C.

Trabalhos anteriores realizados em diferentes culturas (Banana, papaeira) mostraram resultados similares ao nosso estudo. Gopal *et al* (2004), avaliando o efeito da de sete temperaturas constantes encontraram que as temperaturas acima de 20°C eram mais propicias ao crescimento em detrimento de baixas temperaturas. Variações de temperatura fora do limite de tolerância suportado pela espécie podem comprometer a conservação das plantas. Embora determinada faixa de temperatura possa ser adequada para a conservação, é importante se conhecer as temperaturas cardinais para uma determinada característica medida em uma determinada espécie. As temperaturas mínimas e máximas encontradas permitem inferir a faixa de tolerância em que as plantas de batata-doce mantêm sua capacidade de conservação.

A influência da temperatura na conservação de seis genótipos foi estudada por Arrigoni-Blank, *et al* (2014), e estes observaram que 30°C forneceu os melhores índices de germinação para a maioria dos genótipos estudados. Entretanto, as temperaturas baixas, que variam entre 15-20°C as plantas não tiveram um crescimento acentuado, permitindo assim a redução da germinação *in vitro* na cerejeira. Isso vai de acordo com os resultados encontrados nesse trabalho no qual a temperatura de 18°C teve maior índice de sobrevivência por um período maior.

As variações encontradas entre os resultados descritos neste trabalho e nas demais literaturas podem ser explicadas pelo fato do efeito da temperatura na conservação *in vitro* de batata-doce ser variável entre as espécies e entre os genótipos da mesma espécie. O percentual de germinação foi bem reduzido em temperatura baixa (15°C) e aumentou gradativamente atingindo o maior valor a 30°C.

O uso de temperaturas mais baixas no cultivo *in vitro* reduz a acção de enzimas e do metabolismo geral das plantas. Neste estudo, a redução da temperatura de 24°C para 18°C provocou crescimento mais lento dos explantes sem, contudo, provocar-lhes danos fisiológicos. (Lata *et al.*, 2002) sugere

a redução da temperatura de crescimento como primeiro factor limitante a ser testado. Todavia, para cada espécie estudada existe um limite que reduz o crescimento sem provocar danos. No presente trabalho, a temperatura de 18°C reduziu o crescimento e a viabilidade das plântulas significativamente. Nuns outros estudos relataram que a temperatura de 5°C causou morte nos ápices de banana conservados *in vitro*. No entanto, quando a temperatura foi aumentada para 17°C, foi possível conservar os explantes durante 13 a 17 meses.

Açúcares são fonte de carbono disponível para as plantas cultivadas *in vitro*, especialmente nos primeiros estádios, onde há necessidade de alta energia e esqueleto carbónico 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 aclimação) pode aumentar a fotossíntese e maior tempo de conservação.

Os tratamentos nos quais se combinou temperatura de 24°C com 15 g/L ou 30 g/L de sacarose resultaram em notas mais baixas que os demais. Assim, os melhores resultados foram obtidos nas temperaturas mais baixas quando estas foram combinadas com níveis mais baixos de sacarose. O aumento conjunto da temperatura e da concentração de sacarose prejudicou a sobrevivência das plântulas, o que demonstra que, sob temperatura mais alta (25°C), a sacarose foi rapidamente absorvida, traduzindo-se em rápido aumento da massa foliar e conseqüente senescência das microplantas.

Em condições-padrões de cultivo (24°C e 30 g/L de sacarose), os explantes sobrevivem por, no máximo, três meses, sem a necessidade de subcultivo. Os resultados mostraram que foi possível prolongar este prazo para seis meses, utilizando o tratamento no qual se combinou 15°C com 20 g/L de sacarose, mantendo a viabilidade das microplantas para a retomada do crescimento e início de um novo ciclo de micropropagação.

Neste experimento, observou-se uma redução no metabolismo normal das plantas cultivadas *in vitro*, a qual foi medida pela paralisação do crescimento e morte dos explantes. Em condições padrões de cultivo as plantas crescem rapidamente e consomem a maior parte dos nutrientes do meio em cerca de quatro semanas, e é necessária uma repicagem dos explantes com a renovação do meio. Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que o período de conservação foi ampliado para 12 meses. Após este período os explantes se apresentaram viáveis e disponíveis para retornar às condições normais de multiplicação *in vitro* ou ser aclimatados *in vivo*.

Estudos realizados por Arrigoni-Blank *et al.* (2014) analisaram o efeito de diferentes níveis de sacarose no crescimento mínimo de batata-doce no qual constaram que as concentrações de sacarose de 25-30 g/L resultaram em maiores taxas de crescimento, corroborando os resultados observados no presente estudo. No entanto, esses autores avaliaram o desenvolvimento de plantas por 90 dias, ao contrário do período avaliado no presente estudo (180 dias). Embora a literatura cite concentrações de sacarose de 30 g/L como sendo eficaz para o mínimo crescimento de outras culturas como a batata (Gopal *et al.*, 2004).

O efeito positivo da diminuição da temperatura não foi observado para a maioria das variedades de batata-doce neste estudo após 180 dias de crescimento *in vitro*. A temperatura de 18°C foi mais eficiente comparada com a temperatura de 24°C, desde 90 dias após o subcultivo onde a 24°C apresentaram 45% de folhas verdes, enquanto aquelas mantidas a 18°C apresentou 75% de folhas verdes. Embora Gopal *et al.* (2004), que estudaram o efeito de diferentes temperaturas no crescimento mínimo de doce batata, tenham relatado uma diminuição de 50% no crescimento da planta com uma queda de temperatura de 21,1°C para 15,6°C, o período avaliado foi de apenas 90 dias, e nenhum subcultivo foi realizado. No presente estudo, a avaliação final foi feita em 180 dias. Os regimes de temperatura recomendados diferem de cultura para cultura, com alguns mais tolerante frio do que outros. Algumas plantas podem suportar bem uma diminuição da temperatura. A batata-doce se desenvolve melhor em regiões ou em épocas em que a média temperatura for superior a 24°C (Silva *et al.*, 2004), e no seu ambiente natural (ex: condições *in vitro*), mantendo essa característica quando cultivada *in vitro*. O que foi verificado nesse estudo onde as plantas a 24°C apresentaram um crescimento maior em relação aos 18°C temperatura favorável para a conservação.

A principal diferença entre este e outros estudos (Jarret, 1997 e Wang *et al.*, 2013), (Tyagi *et al.*, 2009) foi que a conservação *in vitro* da batata-doce germoplasma foi avaliado por um período curto (180 dias). Além disso, a taxa de sobrevivência após o primeiro subcultivo de plantas foi mantida a 18±2°C e 27±2°C. Embora todas plantulas sobreviveram em ambas as temperaturas, após o subcultivo, a sobrevivência dos explantes a 18±2°C foi de apenas 10%. Assim, uma diminuição da temperatura não é recomendada para os acessos de batata-doce aqui estudados.

7. Conclusão

A temperatura de 18°C e a concentração de 15g/L de sacarose favorecem a redução no crescimento das três variedades conservadas *in vitro*.

Os parâmetros fisiológicos foram significativamente diferentes nos dois tipos de tratamentos, a variedade Ininda com 24°C e concentração de 30g/L de sacarose apresentou alturas médias maiores em relação as outras variedade.

A temperatura ideal para a conservação da batata-doce foi de 18°C enquanto a concentração de sacarose que melhor respondeu ao estudo foi de 22,5 g/L.

A variedade Ininda apresentou valores médios menores para as 3 concentrações e ambas temperaturas.

8. Limitações

Durante a segunda fase da experiência houve uma flutuação da temperatura numa das salas de crescimento (18°C) devido a uma avaria do ar condicionado, causando um ligeiro aumento no crescimento das plântulas.

9. Recomendações

É recomendável que se faça um estudo de viabilidade mais profundo e no campo de modo a aferir o grau de êxito da experiência.

Que seja realizado outro estudo em que se avalie outras variedades locais.

Que sejam testadas modificações na temperatura, concentração de sacarose e de outros nutrientes.

10. Referências bibliográficas

1. AJAP (2017). Manual Boas Práticas para Culturas Emergentes A Cultura da Batata-Doce. Portugal. ISBN: 978-989-8319-23-4
2. Andrade, S. R. M. (2002). Princípios de Cultura de Tecidos Vegetais. 1 ed, 14pp. Planaltina, Embrapa
3. Arrigoni-Blank, M.F., F.F. Tavares, A. F. Blank, M. C. Santos, T. S. A. Menezes e A. D.D. Santana (2014). *In Vitro* Conservation of Sweet Potato Genotypes. *Scientific World Journal*. 10.1155/2014/208506 208, 7 pp
4. Cabrera, Y. R., J. L. Torres, V. R. Medero, M. B. P. Vega, S. P. Arletys e G. S. Yenis (2019). Conservación *in vitro* de cultivares de *Ipomoea batatas* (L.) Lam por crecimiento mínimo con el uso de manitol. *Biología Vegetal*. Vol. 19, No. 1: 43 – 51.
5. Carvalho, J. M. F. C., M. M. A. Silva e M. J. L. Medeiros. (2006). Factores inerentes à Micropropagação, 1ed, 28pp. Campina grande, Embrapa
6. CID, L. P. B. A. (2001). Propagação *in vitro* de planta. *Biología Ciencia e Desenvolvimento*, n.19, p16-21.
7. Dumet, D., F. Engelmann, N. Chabrilange, Y. Duval e J. Dereuddre. (1993). Importance of Source for the Acquisition of Tolerance to Desiccation and Cryopreservation of Oil Palm Somatic Embryos. *Cryo-Letters*, n. 14, 243-250
8. Eira, M.T.S. (2001). Conservação de germoplasma na forma de sementes, *in vitro* e criopreservação. In: SIRGEALC – Simpósio de Recursos Genéticos para América Latina y el Caribe. Vol 3. 30-32 pp. Londrina, IAPAR.
9. Embrapa (2006). Cultura de Tecidos: A Importância desta Técnica para a Biotecnologia e o Agronegócio. Brasília
10. Embrapa (2021). Sistema de Produção de Batata-doce. Brasília.
11. Engelmann, F. (2011). Uso de Biotecnologias para a Conservação da Biodiversidade Vegetal. *Biologia Celular In Vitro e Biologia do Desenvolvimento*, v.47, p.5-16,. DOI: 10.1007 / s11627-010-9327-2.
12. Espinosa, A., O. González e J. J. Silva (2003). Conservación *in vitro* de clones de boniato en condiciones de crecimiento mínimo, *Biología Vegetal* 3(1): 37-41
13. Faleiro, F. G. (2008). Preservação da variabilidade genética de plantas: um grande desafio. [<http://www.boletimpecuario.com.br>]. Consultado 28 de Julho de 2023.

14. FAOSTAT (2020). Countries by commodity: sweet potatoes. Disponível em: http://www.fao.org/faostat/en/#rankings/countries_by_commodity. Acesso em: 11 de Agosto de 2023.
15. Ferrao, J. L e G. C. Viegas (2021) Projecto de avaliação e multiplicação de rama de batata-doce de polpa alaranjada e roxa. 15pp. CIP.
16. Franzon, R.C., M. C.B. Raseira e Jr. A. Wagner (2007). Testes de germinação *in vitro* e armazenamento de pólen de pitangueira (*Eugenia uniflora* L.). *Acta Scientiarum*, 29:251-255.
17. Giminese, M. A e R. L. Barbieri (2010). Manual de Curadores de Germoplasma Vegetal: Conservacao em BAGs. 1 ed. 13p. Embrapa
18. Gonçalves, S., e A. Romano (2007). *In vitro* minimum growth for conservation of *Drosophyllum lusitanicum*, *Biologia Plantarum*, 51(4): 795-798.
19. Gopal, J., A. Chamail e D. Sarkar (2004). *In vitro* production of microtubers for conservation of potato germplasm: effect of genotype, abscisic acid, and sucrose, *In Vitro Cellular and Developmental Biology*, 40(5): 485-490.
20. Grace, M.H., G.G. Yousef, S.J. Gustafson, V. D. Truong, G.C. Yencho e M.A. Lila. (2014). Phytochemical Changes in Phenolics, Anthocynins, Ascarboric Acid, and Carotenoids Associated with Sweet Potato Storage and Impacts on Bioactive Properties. *Food Chemistry*, v.145,717-724, 9pp
21. Guerra, M. P., H. P. F. Fraga, R. O. Nodari, L. N. Vieira e Y. Fritsche (2016). *Biotecnologia*, 44pp. Brasil, Universidade Federal De Santa Catarina
22. Jarret, R. L. (1997). Effects of chemical growth retardants on growth and development of sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) *in vitro*. *Journal of Plant Growth Regulation*, 16(4), 227-231.
23. Kalkmann, D. C. (2011). Produtividade, qualidade da raiz, resistência aos insectos de solo e aos nematóides-das-galhas e estimativas de parâmetros genéticos em clones de batata-doce, cultivados no Distrito Federal. Dissertação de Mestrado. 144p. Brasília. Universidade de Brasília.
24. Lata, H., R. M. Moraes, B. Bertoni e M. A. S. Pereira (2010). *In vitro* germplasm conservation of *Podophyllum peltatum* L. under slow growth conditions. *In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 46: 22-27; doi: 10.1007/ s11627-009-9243-5

25. Lebot, V., A. Champagne, R. Malapa e D. Shiley (2009). NIR determination of major constituents in Tropical Root and Tuber Crops flours. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 10539 -10547p.
26. Lemos, E. E.P., M. S. Ferreira, L M. C. Alencar, C. E. R. Neto e M. M. Albuquerque. (2002). Conservação *in vitro* de Germoplasma de Cana-de-açúcar. *Revista Agropecuaria Brasileira*, 37:1-6pp
27. Loebenstein, G. (2009). Origin, Distribution and Economic Importance. In:Loebenstein, G e Thottappilly, G. (Eds.), The sweet potato. 10.1007/978-1-4020-9475-0.(p. 9-12). Springer Netherlands.
28. Londe, L. N., K. A. Alves e E. B. Ribeiro (2012). Efeito de concentrações de sacarose e de meio de cultura sobre a taxa de crescimento de Mandioca variedade BGM, 0116 conservadas *in vitro*. *Revista Trópica*, 6(2), 67-78.
29. Matsumoto, K., L.D. Cardoso e I.R.I. Santos (2010). Manual de Curadores de Germoplasma- Vegetal: Conservação *in vitro*.1 ed, 11pp. Brasília, Embrapa
30. MITADER (2015). Estratégia e Plano de Acção para a Conservação da Diversidade Biológica em Moçambique. Maputo. Moçambique.
31. Morales-Tejón., A. L, D. Rodríguez-de Sol, A. Morales-Rodríguez, S. J. Rodríguez-Morales, N. J. Masa-Estrada e M. A. Lima-Díaz (2017). INIVIT BM-90, nuevo cultivar de boniato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) con alto contenido de antocianina, *Cultivos Tropicales* 38(2): 80pp.
32. Moulin, M.M. (2010) Colecta, Caracterização e Conservação de Variedades Locais de Batata-doce (*Ipomoea batatas* L. Lam) do Norte do estado do Rio de Janeiro. Dissertação de Mestrado.137pp.Rio de Janeiro. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro.
33. Mroginski, L. A e W. M. Roca (1991). Crioconservacion del germoplasma. In: Roca, W. M e L. A. Mroginski (eds) cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones. 715-730 p. CIAT.
34. Oliveira, A.C.B., M. A. N. Sedyama, T. Sedyama, F. L. Finger e C.D. Cruz (2002). Variabilidade genética em batata-doce com base em marcadores isoenzimáticos. *Horticultura Brasileira*, Brasília, 20:576-582.
35. Paiva, R., R. D. O, Paiva (2001). Cultura de Tecido, 94pp. Minas Gerais, UFLA;

36. Ramalho, M.A.P., J.B. Santos e C.A.B Pinto (2008) Genética na Agropecuária. UFLA, 4º ed, 24-25
37. Rossel, G., C. Espinoza, M. Javier e D. Tay D (2008). Regeneration guidelines: sweet potato. In: Dullo, M.E., I. Thormann, M. A. Jorge and J. Hason (eds). Crop Specific Regeneration Guidelines [CD-ROM], 6pp. Roma. CGIAR-SGRP.
38. Roullier, C., Duputie, A., Wennekes, P., Benoit, L., Fernandez Bringas, V.M. (2013) Disentangling the origins of cultivated sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.). PLoS One, 8(5):e62707.
39. Sampaio, E. S., Sá, J. F, Souza, A. S, Santos, K.C. F, Alves, A. A C, Ledo, C. A. S (2018). Influência da Sacarose na Conservação *in vitro* de espécies silvestres do gênero Manihot. 1p. Cruz das Almas. Embrapa
40. Santos, E. K. (2003). Totipotência vegetal e cultura de tecidos vegetais. In: Freitas, L.B. de; Bered, F. Genética e evolução vegetal. 978-8-5702-5718-5. 415-444p. Porto Alegre. Editora da UFRGS
41. Santos, I. R. I (2001). Criopreservação de germoplasma vegetal: A alternativa para a conservação a longo prazo. *Biotecnologia Clínica & Desenvolvimento*, 20: 60-65
42. Santos, I.R.I e Salomão, A.N (2010). Manual de Curadores de Germoplasma - vegetal: criopreservação. 1 ed, 17p. Brasília: Embrapa
43. Silva, J. B. C., C. A. Lopes e J. S. Magalhães (2004). Cultura da batata-doce (Sistema de produção). Vol 6. 9 p. Ponte Alta-Gama, Embrapa Hortaliças.
44. Silva, J.B.C., C. A. Lopes e J. S. Magalhães (2002). Cultura da batata-doce. In: Cereda, M. P. Agriculturas, Tuberosas Amiláceas Latino Americanas. Vol 2. 449-503 p. São Paulo, Cargill.
45. Silveira, D. M. S (2017). Multiplicação e Conservação *in vitro* de Espécies Silvestres de manihot. Tese de Mestrado. 70pp. Bahia, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
46. Souza, A.S., F.V. D. Souza, J. A. S. Serejo, T.G. Junghans, O.P. Paz, A.V.V. Montarroyos e V.S. Santos, L.S. Morais (2009). Preservação de Germoplasma Vegetal, Com Ênfase na Conservação *in vitro* de Variedades de Mandioca. 24pp. Rio de Janeiro
47. Souza, J.A., M.W. Schuch, L.C. F. Silva e G. C. Soares (2007). Solidificante no Meio de Cultura e Tamanho do Explante no Estabelecimento na Propagação *in vitro* de Pitangueira (*Eugenia uniflora* L.). *Revista Brasileira de Agrociência*, 13:115-118

48. Srisuwan, S., Sihachakr, D., Yakovlev, S.S. (2006) The origin and evolution of sweet potato (*Ipomoea batatas* Lam.) and its wild relatives through the cytogenetic approaches. *Plant Science*, Elsevier, Paris, 171:424-433.
49. Stathers, T., J. Low, R. Mwanga, T. Carey, J. Malinga, M. Benjamin, H. Katcher, M. Andrade e S. Tumwegamire (2013). Tudo o Que Sempre Quis Saber Sobre a Batata-doce: Manual de Capacitação CdF - Alcançando Agentes de Mudança, vol 1, 436 p, Nairobi. Quênia. CIP
50. Tavares, A.R., P. Giampaoli, S. Kanashiro, F.F.A. Aguiar e E.P. Chu. (2008). Efeito da adubação foliar com KNO₃ na aclimatização de bromélia cultivada *in vitro*. *Horticultura Brasileira*. 26:175-179.
51. Tyagi, R. K., R. Goswami, R. Sanayaima, R. Singh, R. Tandon, and A. Agrawal (2009),, “Micropropagation and slow growth conservation of cardamom (*Elettaria cardamomum* Maton),” *In Vitro Cellular and Developmental Biology*, vol. 45, no. 6, pp. 721–729.
52. Vettorazzi, R. G. V. S. Carvalho, R. Rodrigues, C. P. Sudr´e, G. d. A. Gravina, and E. d. F. Lucas, (2011). “Conservação de batata-doce (*Ipomoea batatas*) por cultivo mínimo *in vitro*,” in *Congresso Brasileiro de Cultura de Tecidos de Plantas, 5. Anais*, ABCPT, Joinville, Brazil,
53. Vettorazzi, R. G., V. Silva, C. Pombo e R. Rodrigues (2017). Developing an *in vitro* optimized protocol to sweet potato landraces conservation, *Acta Scientiarum* 39(3): 359-367.
54. Vettorazzi, R.G (2016). Caracterização, Estabelecimento *in vitro* e criopreservação de variedades locais de batata-doce (*Ipomea batatas* L.Lam). Tese de Mestrado.101pp.Rio de Janeiro. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro.
55. Wang, M., Shi, Y., Xia, X., Li, D., & Chen, Q. (2013). Lifecycle energy efficiency and environmental impacts of bioethanol production from sweet potato. *Bioresource Technology*, 133(1), 285-92.
56. Withers, L. A e Williams, J. T. (1998). Conservação *in vitro* de recursos genéticos de plantas. In: C. A. Torres, L. S. Caldas, e J. A. Buso. Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. 1 ed, 297-329. Brasília, Embrapa-SPI/Embrapa-CNPB.

57. Zhang, L. M., Q. M.Wang, Q. C. Liu e Q. C .Wang.(2009). Sweetpotato in China. In: Loebenstein, G e G. Thottappilly. The sweet potato. 1 ed 325-358 p. Dordrecht, Springer Netherlands.

Anexos

Tabela 2: Media e desvio padrão do estudo **FS**. Folhas senescentes, **FV**. Folhas verdes

Periodo	Temperatura	[sacarose]	Parametros	Ininda	Desvio_P	Resisto	Desvio_P	Palmira	Desvio_P
90 dias	18 graus	15 g/L	Altura	0,6	± 0,14	1	± 0,41	2,03	± 1,20
			FV	3,67	± 0,94	4,33	± 0,94	5	± 1,63
			FS	0,00	± 0	0	± 0	2,67	± 0,47
		22,5 g	Altura	1,60	± 0,29	0,8	± 0,42	1,47	± 0,68
			FV	5,67	± 1,25	4,33	± 0,94	7	± 2,94
			FS	0,00	± 0	0	± 0	1	± 0,82
		30 gramas	Altura	3,83	± 1,18	0,67	± 0,24	2,13	± 0,19
			FV	9,67	± 0,47	6,33	± 2,05	8,33	± 1,7
			FS	0,33	± 0,47	0	± 0	1,33	± 1,25
	24 graus	15 gramas	Altura	1,23	± 0,17	1,6	± 0,54	2,5	± 0,36
			FV	7,00	± 2,16	8,33	± 2,05	7,67	± 1,25
			FS	0,67	± 0,94	0,67	± 0,94	1	± 0,82
		22,5 gramas	Altura	3,77	± 1,04	1,6	± 0,65	3,97	± 1,86
			FV	9,67	± 2,49	7	± 4,55	8,33	± 1,7
			FS	1,00	± 0,82	0	± 0	3	± 0,82
		30 gramas	Altura	5,33	± 0,62	1,63	± 0,26	4,1	± 0,62
			FV	10,67	± 0,94	7,67	± 0,47	11	± 1,41
			FS	0,67	± 0,94	1	± 0,82	1	± 1,41
180 dias	18 graus	15 gramas	Altura	4,5	± 1,08	4,33	± 1,06	6,67	± 1,84

	22,5 gramas	FV	8,67	± 0,94	11	± 2,16	12,67	± 2,62	
		FS	3,67	± 2,49	4,67	± 3,09	7,33	± 2,87	
		Altura	7,17	± 0,85	3,7	± 1,20	4,17	± 0,85	
		FV	8,33	± 0,47	13,67	± 4,03	14,67	± 2,05	
		FS	6,67	± 0,94	1,67	± 0,47	5	± 0,82	
		Altura	6,63	± 0,90	4,67	± 0,85	5,33	± 1,25	
	30 gramas	FV	5,33	± 0,47	15	± 3,56	12,33	± 2,36	
		FS	3,33	± 0,47	4	± 2,45	8,67	± 4,11	
		Altura	9,33	± 0,47	6,17	± 0,94	6,97	± 1,81	
	24 graus	15 gramas	FV	6,67	± 2,87	12	± 2,94	9,67	± 0,47
			FS	8,33	± 4,03	7,67	± 3,30	9	± 2,45
			Altura	5,50	± 2,55	4,48	± 1,55	7,27	± 2,87
22,5 gramas		FV	9,67	± 3,68	11	± 2,16	12,67	± 1,25	
		FS	6,00	± 6,38	4,33	± 3,30	7,33	± 0,94	
		Altura	8,10	± 1,37	4,17	± 0,85	7,97	± 2,71	
30 gramas		FV	5,67	± 2,87	9	± 2,16	6,33	± 4,19	
		FS	9,33	± 3,09	3,33	± 0,94	7,33	± 2,62	

3 MESES

Anexo 1: Análise factorial da variedade Ininda após 90 dias

Variáveis	DF	ss	MS	F	P
Intercept	1	712.134	712.134	425.154	0.000
Temperatura	1	35.689	35.689	21.307	0.000
sacarose]	2	75.117	37.559	22.423	0.000
Parâmetros	2	498.745	249.372	148.879	0.000
Temperatura * sacarose	2	4.739	2.370	1.415	0.256
Temperatura * parâmetros	2	10.278	5.139	3.068	0.059
sacarose * parâmetros	4	35.456	8.864	5.292	0.002
Temperatura * sacarose *	4	4.812	1.203	.718	0.585
Parâmetros					
Error	36	60.300	1.675		
Total	54	1437.270			
Corrected Total	53	725.136			

Anexo 1A: Teste de comparação de Medias (Tukey 5%) da variedade Ininda para parâmetros de crescimento

parâmetros	Medias	Grupos homogêneos
Folhas senescentes	0,4444	A
Altura	2,7278	B
Folhas verdes	7,7222	C

Anexo 1B: Teste de comparação de Medias (Tukey 5%) da variedade Ininda para [sacarose]

sacarose	Media	Grupos Homogêneos
30gramas	2,1944	A
15gramas	3,6167	AB
22,5gramas	5,0833	B

Anexo 1C : Teste de comparação de Medias (Tukey 5%) da variedade Ininda para Temperatura

Temperatura	Mean	Grupos Homogenios
18 graus	2,8185	A
24graus	4,4444	B

Anexo 2: Análise factorial da variedade Resisto após 90 dias.

Source	DF	ss	MS	F	P
Intercept	1	367.645	367.645	130.353	0.000
Temperatura	1	24.134	24.134	8.557	0.006
sacarose	2	3.238	1.619	.574	0.568
parâmetros	2	382.389	191.195	67.791	0.000
Temperatura * sacarose	2	1.189	.595	.211	0.811
Temperatura * parâmetros	2	12.056	6.028	2.137	0.133
sacarose * parâmetros	4	2.943	.736	.261	0.901
Temperatura * sacarose * parâmetros	4	5.023	1.256	.445	0.775
Error	36	101.533	2.820		
Total	54	900.150			
Corrected Total	53	532.505			

Anexo 2A: Teste de comparação de Medias (Tukey 5%) da variedade Resisto para parâmetros de crescimento

parâmetros	Media	Grupos homogêneos
Folhas senescentes	0,2778	A
Altura	1,2167	A
Folhas verdes	6,3333	B

Anexo 3: Análise factorial da variedade Palmira após 90 dias.

Source	DF	ss	MS	F	P
Intercept	1	901.192	901.192	334.325	0.000
Temperatura	1	22.427	22.427	8.320	0.007
sacarose	2	12.416	6.208	2.303	0.115
parâmetros	2	400.250	200.125	74.243	0.000
Temperatura * sacarose	2	4.908	2.454	.910	0.411
Temperatura * parâmetros	2	11.964	5.982	2.219	0.123
sacarose * parâmetros	4	25.865	6.466	2.399	0.068
Temperatura * sacarose * parâmetros	4	10.538	2.634	.977	0.432
Error	36	97.040	2.696		
Total	54	1486.600			
Corrected Total	53	585.408			

Anexo 3A: Teste de comparação de Médias (Tukey 5% da variedade Ininda para parâmetros de crescimento)

parâmetros	Media	Grupos homogêneos
Folhas senescentes	1,6667	A
Altura	2,7000	A
Folhas verdes	7,8889	B

Anexo 4: Análise factorial da variedade Ininda após 180 dias .

Source	DF	ss	MS	F	P
Intercept	1	2517.402	2517.402	259.501	0.000
Temperatura	1	34.082	34.082	3.513	0.069
sacarose	2	6.114	3.057	.315	0.732
parâmetros	2	12.303	6.152	.634	0.536
Temperatura * sacarose	2	24.963	12.482	1.287	0.289
Temperatura * parâmetros	2	26.708	13.354	1.377	0.265
sacarose * parâmetros	4	34.996	8.749	.902	0.473

Temperatura * sacarose * parâmetros	4	52.849	13.212	1.362	0.266
Error	36	349.233	9.701		
Total	54	3058.650			
Corrected Total	53	541.248			

Anexo 5: Análise factorial da variedade Resisto após 180 dias .

Source	DF	ss	MS	F	P
Intercept	1	2612.507	2612.507	322.208	.000
Temperatura	1	.007	.007	.001	.977
sacarose	2	12.841	6.421	.792	.461
parâmetros	2	673.213	336.607	41.515	.000
Temperatura * sacarose	2	43.330	21.665	2.672	.083
Temperatura * parâmetros	2	44.924	22.462	2.770	.076
sacarose * parâmetros	4	26.082	6.521	.804	.531
Temperatura * sacarose * parâmetros	4	10.082	2.521	.311	.869
Error	36	291.893	8.108		
Total	54	3714.880			
Corrected Total	53	1102.373			

Anexo 5A: Teste de comparação de Médias (Tukey 5%) da variedade Resisto para parâmetros de crescimento

parâmetros	Media	Grupos homogêneos
Folhas senescentes	4,2778	A
Altura	4,6444	A
Folhas verdes	11,9444	B

Anexo 6: Análise factorial da variedade Palmira após 180 dias.

Source	DF	ss	MS	F	P
Intercept	1	3818.645	3818.645	457.769	.000
Temperatura	1	.882	.882	.106	.747
sacarose	2	5.006	2.503	.300	.743

parâmetros	2	249.634	124.817	14.963	.000
Temperatura * sacarose	2	16.591	8.296	.994	.380
Temperatura * parâmetros	2	81.374	40.687	4.877	.013
sacarose * parâmetros	4	70.767	17.692	2.121	.098
Temperatura * sacarose * parâmetros	4	14.604	3.651	.438	.780
Error	36	300.307	8.342		
Total	54	4557.810			
Corrected Total	53	739.165			

Anexo 6A: Teste de comparação de Médias (Tukey 5%) da variedade Palmira para parâmetros de crescimento

parâmetros	Media	Grupos Homogêneos
Folhas senescentes	6,3944	A
Altura	7,4444	A
Folhas verdes	11,3889	B

Tabela 2: Análise de variância das variedades de batata-doce após 90 e 180 dias *in vitro* sob diferentes temperaturas e concentração de sacarose sob efeito da altura

Período	Temperatura	Variedades	[sacarose]		
			15	22,5	30
90 dias	18	Ininda	1,4 Cb	2,4 Cb	4,6 Aa
		Resisto	1,7Ab	1,7 Ab	2,3 Aa
		Palmira	3,2 Bb	3,1 Bb	3,9 Bb
	24	Ininda	2,9 Ca	4,8 Bb	5,5 Ca
		Resisto	3,5 Ba	2,8 Aa	3,4 Ba
		Palmira	3,7 Aa	5,1 Ba	5,3 Ca
180 dias	18	Ininda	5,6 Ca	7,3Cb	5,1 Ca
		Resisto	6,6 Ca	6,34 Ba	7,88 Bb
		Palmira	8,88Cb	7,94 Bb	8,87 Bb

		Ininda	8,1 Cb	7,05 Ba	7,7 Ca
	24	Resisto	8,6 Cb	6,7 Ba	5,5 Ca
		Palmira	8,54 Cb	9,08 Cb	7,2 Ca

*Médias da Alturas seguidas pela mesma letra maiúscula nas linhas e minúscula nas colunas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.