

Micropropagação de Inhame da Costa sob concentrações de BAP em distintos meios de cultura

¹ Karine da Silva Simões, ² Lucymeire Souza Morais Lino, ² Antônio da Silva Souza, ¹ Sebastião de Oliveira e Silva, ² Carlos Alberto da Silva Ledo

¹ Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro, Rua Rui Barbosa, 710, CEP 44380-000, Cruz das Almas, BA, Brasil. E-mails: karinesimoes01@hotmail.com, ssilva3000@gmail.com

² Embrapa mandioca e Fruticultura, Rua da Embrapa, s/n, bairro da Chapadinha, CEP 44380-000, Cruz das Almas, BA, Brasil. E-mails: lsmorais@yahoo.com.br, antonio.silva-souza@embrapa.br, carlos.ledo@embrapa.br

Resumo: A brotação desuniforme do inhame tem acarretado perdas consideráveis aos produtores devido à morte dos túberas. A micropropagação apresenta várias vantagens sobre os métodos convencionais de propagação. Este trabalho teve como objetivo avaliar o desenvolvimento *in vitro* do inhame nos meios MS e MS com modificações, acrescido de diferentes concentrações de BAP. Gemas laterais retiradas de brotos originados de túberas semente foram desinfestadas e estabelecidas *in vitro* em meio de cultura contendo sais e vitaminas do MS, suplementado com 100 mg L⁻¹ de inositol, 20 mg L⁻¹ de cisteína, 0,20 mg L⁻¹ de ANA, 0,15 mg L⁻¹ de BAP, 0,08 mg L⁻¹ de GA₃, 30 g L⁻¹ de sacarose e 7,5 g L⁻¹ de ágar. Microestacas provenientes da fase de estabelecimento foram inoculadas nos meios de cultura: MS1 (sais e vitaminas do MS) e MS2 (MS1 acrescido com 100 mg L⁻¹ de inositol, 20 mg L⁻¹ de cisteína, 0,20 mg L⁻¹ de ANA, 0,08 mg L⁻¹ de GA₃), com diferentes concentrações de BAP (0; 0,05; 0,15; 0,45; 1,35 e 4,05 mg L⁻¹) suplementados com 30 g L⁻¹ de sacarose, solidificados com 7,5 g L⁻¹ de ágar. Os resultados obtidos demonstram ser viável a técnica da multiplicação *in vitro* da espécie em estudo em meio de cultura MS2 suplementado ou não com 0,05 mg L⁻¹ de BAP.

Palavras chave: *Dioscorea rotundata* Poir, Benzilaminopurina, Multiplicação *in vitro*.

Micropropagation yam coast under concentrations of BAP in different culture medium

Abstract: The uneven budding of yam has caused considerable losses to producers due to the death of the tubers. The micropropagation has many advantages over the conventional methods of propagation. This study aimed to evaluate the *in vitro* development of yam in the medium MS and MS with modifications in different concentrations of BAP. Lateral buds withdrawals of sprouts originated from tubers seed were established *in vitro* culture medium containing salts and vitamins of MS medium supplemented with 100 mg L⁻¹ of Inositol, 20 mg L⁻¹ of cysteine, 0.20 mg L⁻¹ NAA, 0.15 mg L⁻¹ BA, 0.08 mg L⁻¹ of GA₃, 30 g L⁻¹ sucrose and 7.5 g L⁻¹ of agar. Microcuttings establishment phase were inoculated in culture medium: MS1 (MS salts and vitamins) and MS2 (MS1 plus 100 mg L⁻¹ inositol, 20 mg L⁻¹ cysteine, 0.20 mg L⁻¹ NAA, 0.08 mg L⁻¹ GA₃) with different concentrations of BA (0, 0.05, 0.15, 0.45, 1.35 and 4.05 mg L⁻¹) supplemented 30 g L⁻¹ sucrose, solidified with 7.5 g L⁻¹ agar. The results show the technique is viable *in vitro* multiplication of the species under study in culture medium MS2 supplemented or not with 0.05 mg L⁻¹ of BAP.

Key Words: *Dioscorea rotundata* Poir, Benzylaminopurine, *In vitro* multiplication.

Introdução

O inhame é uma planta monocotiledônea da família *Dioscoreaceae*, herbácea, trepadeira, pertencente ao gênero *Dioscorea*, que produz túberas ricas em diversas vitaminas do complexo B, vitamina A, Vitamina C e carboidratos, além de apreciáveis teores de proteína e de gordura (Oliveira et al., 2007).

Na América, o Brasil é o segundo maior produtor, perdendo apenas para a Colômbia. A produção nacional do inhame, em 2014, foi de aproximadamente, 247 mil toneladas segundo a Food and Agriculture Organization [FAO] (2017), sendo que a maior contribuição concentra-se na Região Nordeste principalmente nos Estados da Paraíba, Pernambuco, Bahia, Alagoas, Piauí (Silva et al., 2012). A cultura do inhame alcança no Nordeste brasileiro grande importância socioeconômica, e suas túberas poderá contribuir na solução do problema da demanda reprimida de alimentos, como também na geração de emprego e renda aos pequenos produtores (Oliveira, 2007).

Na multiplicação *in vitro*, os fatores concentração de citocinina e tipo de meio de cultura usado são extremamente importantes para obter bons resultados. Vários meios básicos têm sido utilizados na multiplicação de plantas, sendo que a maioria se baseia no meio MS (Murashige & Skoog, 1962).

Um dos principais fatores que interferem na propagação *in vitro* é a suplementação do meio de cultivo com reguladores de crescimento vegetal. As citocininas pertencem a uma classe de reguladores com capacidade marcante de induzir a divisão celular em tecidos vegetais, e atuam, conseqüentemente, no processo de morfogênese. Portanto, são importantes para formação de órgãos, principalmente aéreos. Das citocininas comercialmente disponíveis, o BAP é a que, em geral, apresenta melhores resultados, sendo a concentração um dos fatores que mais influenciam o processo de desenvolvimento *in vitro* (Mantovani et al., 2001). O uso de BAP tem revelado eficiência no processo de multiplicação, tanto de estruturas aéreas como na indução de gemas adventícias em diversas espécies (Leitzke et al., 2009).

Resultados de pesquisa sobre micropropagação do inhame, ainda são escassos, não satisfazendo as expectativas de clonagem da espécie em larga escala, sendo possível

desenvolver uma metodologia para produção de muda de inhame *in vitro* que possibilite obter grande quantidade de plantas de alta qualidade agrônômica, em qualquer época do ano, com o máximo aproveitamento do propágulo vegetal, e em curto espaço de tempo (Santos & Macêdo, 2002).

Protocolos desenvolvidos para a micropropagação de *D. cayenensis* e *D. rotundata* são caracterizados pela utilização de meios de crescimento semi-sólidos e frascos de cultura com tamanho convencional, o que limita as possibilidades de automatização da multiplicação (Ondo et al., 2007). Estas foram algumas das causas do lento crescimento e multiplicação de segmentos nodais, que limita o uso da micropropagação para produção comercial de sementes, devido aos elevados custos relacionados com a obtenção de propágulos (Balogun et al., 2006).

Diante desse contexto o presente trabalho teve por objetivo avaliar o desenvolvimento *in vitro* do inhame nos meios MS e MS com modificações e adição de diferentes concentrações de BAP

Material e métodos

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Mandioca e Fruticultura, em Cruz das Almas, BA. Túberas de Inhame da Costa (*Dioscorea rotundata* Poir) foram tratadas com os fungicidas Furadan (3 mL L⁻¹) e Ridomil (2 g L⁻¹) por 10 minutos, após esse tratamento as túberas foram colocadas em um ambiente fresco para secar por dois dias. Posteriormente, foram seccionadas em quatro partes e semeadas em bandejas de polietileno contendo areia lavada para germinação.

Depois de 70 dias do plantio, as plantas formadas foram cortadas em pedaços de 2 cm contendo gemas apicais ou laterais, e colocadas em recipiente com água destilada. Em condições assépticas os explantes foram desinfestados com álcool 70% por quatro minutos e hipoclorito de sódio 60% contendo 1% de cloro ativo com duas gotas de Tween-20, por oito minutos, seguido da tripla lavagem em água destilada autoclavada.

Para fase de estabelecimento, os explantes desinfestados em condições assépticas foram reduzidos e inoculados em tubos de ensaio contendo aproximadamente 10 mL do meio de

cultura constituído de sais e vitaminas do MS (Murashige & Skoog, 1962), acrescido de 100 mg L⁻¹ de inositol, 20 mg L⁻¹ de cisteína, 0,20 mg L⁻¹ de ácido naftalenoacético (ANA), 0,15 mg L⁻¹ de benzilaminopurina (BAP), 0,08 mg L⁻¹ de ácido giberélico (GA₃), 30 g L⁻¹ de sacarose, solidificado com 7,5 g L⁻¹ de ágar e pH ajustado em 5,8 antes da autoclavagem. O meio utilizado na fase de estabelecimento foi desenvolvido pelo International Institute of Tropical Agriculture [IITA] (1985). Os tubos foram mantidos em sala de crescimento, sob condições de temperatura de 27 ± 1 °C, densidade de fluxo de fótons de 30 μmol m⁻² s⁻¹ e fotoperíodo de 16 horas, durante 90 dias para servirem de fontes de explantes para o estabelecimento dos experimentos.

Microestacas provenientes da fase de estabelecimento com aproximadamente 1 cm de tamanho foram inoculadas em tubos de ensaio com dois tipos de meio de cultura: M1- sais e vitaminas do MS com diferentes concentrações de BAP (0; 0,05; 0,15; 0,45; 1,35 e 4,05); M2- sais e vitaminas do meio MS, acrescido de 100 mg L⁻¹ de inositol, 20 mg L⁻¹ de cisteína, 0,20 mg L⁻¹ de ácido naftalenoacético (ANA), 0,08 mg L⁻¹ de ácido giberélico (GA₃), com diferentes concentrações de BAP (mesmas doses do M1). Os meios de cultura foram suplementados com 30 g L⁻¹ de sacarose, solidificados com 7,5 g L⁻¹ de ágar e pH ajustados em 5,8 antes da autoclavagem. As culturas foram mantidas em sala de crescimento, sob as mesmas condições de cultivo da fase de estabelecimento.

Aos 30, 60, 90 e 120 dias após a inoculação, foram avaliadas as seguintes características: altura da planta (AP) em cm, número de folhas (NF), de raízes (NR), de broto (NB), de nó (NN) e de gemas por nó (NGN), e percentagem de plantas sobreviventes.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 2x6 (2 tipos de meio de cultura e 6 concentrações de BAP) do tipo parcela subdividida no tempo, com 16 repetições por tratamento e quatro períodos de avaliação.

A variável altura da planta foi submetida à análise de variância considerando o delineamento inteiramente casualizado em esquema de parcelas subdivididas no tempo, em que a parcela foi composta pelos tratamentos e a subparcela composta pelas épocas de avaliação e suas interações com os tratamentos da parcela. As médias das concentrações do meio MS foram

comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Para as médias das concentrações de BAP foram ajustados modelos de regressão polinomial. Já para as médias dos períodos de avaliação foram ajustados modelos de regressão linear.

Para as variáveis que não seguiram distribuição normal: números de folhas, de raízes, de brotos, de nós e número de gemas por nós, percentagem de plantas sobreviventes foram analisados pelo teste não-Paramétrico de igualdade de proporção de qui-quadrado (χ^2).

A análise de variância foi realizada com auxílio do programa estatístico Sisvar e o teste não paramétrico de qui-quadrado foi realizado com auxílio do programa Statistical Analysis System [SAS] (2004).

Resultados e discussão

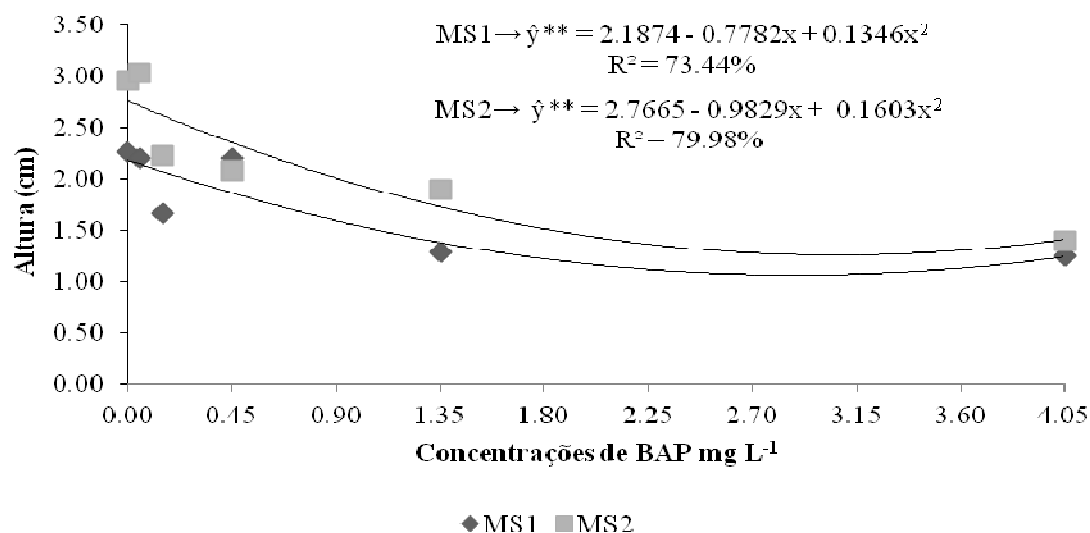
Ao comparar as concentrações de BAP em função dos meios de cultura, verificou-se que a ausência de BAP proporcionou os melhores resultados para a altura de plantas, com valores de 2,27 cm e 3,04 cm para os meios MS1 e MS2, respectivamente. A partir da concentração de 1,35 mg L⁻¹ de BAP as plantas de inhame não apresentaram uma boa resposta *in vitro* nos meios MS1 e MS2, com relação aos parâmetros de crescimento, altura de planta, número de raízes, folhas e microestacas. Os valores dos coeficientes de determinação (R²) mostraram que 73 e 79% da variação observada nas plantas em função das concentrações de BAP, respectivamente, para os meios MS1 e MS2, foram explicadas pelo modelo quadrático da regressão (Figura 1). Esse resultado contrasta com aquele observado por Malaurie et al. (1995), onde o meio MS com a combinação de 0,20 mg L⁻¹ BAP + ANA 1,0 mg L⁻¹, promoveu as maiores percentagens de enraizamento (81%) e desenvolvimento da parte aérea (73%) em *D. cayenensis*, complexo *D. rotundata* e *D. praeheensis*.

Antonio et al. (2012) estudando o cultivo *in vitro* de *D. remotiflora* (Kunth), constataram que a cinetina foi mais adequada que o BAP para a formação de brotos, número de nós, número de folhas e altura das plantas em meio de cultura MS. Behera et al. (2008) relataram que para *D. hispida* a combinação de 2,0 mg L⁻¹ BAP + 0,5 mg

L⁻¹ de ANA em meio MS, promoveu uma resposta ótima com comprimento da parte aérea de 5,0 ±

0,29 cm por explante.

Figura 1 - Efeito das concentrações de BAP em função dos meios de cultura MS1 e MS2 na altura de plantas de inhame da Costa (*Dioscorea rotundata* Poir) cultivadas *in vitro*.



Ao analisar os meios de cultura em função dos períodos de avaliação foi possível verificar que aos 30 dias de cultivo *in vitro* não houve diferença estatística entre os meios avaliados. Porém, a partir dos 60 dias de cultivo, o meio de cultura MS2 foi mais eficiente para promover

o aumento na altura das plantas de inhame (Tabela 1). Estes resultados são semelhantes aos obtidos por Ahanhango et al. (2010) que observaram aumentos na altura de plantas, cultivadas *in vitro*, do inhame da variedade Kounondakou, depois dos 30 dias de cultivo.

Tabela 1 - Valores médios de altura de plantas (cm), em função dos meios de cultura MS1 e MS2 e os períodos de avaliação nas plantas de inhame da Costa (*Dioscorea rotundata* Poir) cultivadas *in vitro*.

Meios de cultura	Períodos de Avaliação (dias)			
	30	60	90	120
MS1	1,31a	1,65b	2,02b	2,34b
MS2	1,51a	2,00a	2,52a	3,13a

Médias seguidas pelas mesmas letras minúscula nas colunas, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Para Chen et al. (2007), o meio MS contendo apenas o regulador de crescimento BAP promoveu uma maior taxa de indução de brotações e altura da parte aérea para *D. nipponica*, utilizando-se a concentração de até 2,0 mg L⁻¹. Nesse caso, ao aumentar essa concentração para 4,0 mg L⁻¹ de BAP, houve uma menor taxa de brotações. De acordo com os resultados apresentados no trabalho mencionado,

a menor concentração do BAP utilizada favoreceu o aumento da multiplicação, provavelmente por constituir um balanço hormonal mais adequado.

Observou-se que o meio MS2 + 0,05 mg L⁻¹ de BAP foi o que contribuiu de forma mais favorável para o número de folhas. Já o meio MS1 + 1,35 mg L⁻¹ BAP teve uma contribuição negativa no número de folhas das plantas de Inhame da Costa cultivadas *in vitro* (Tabela 2).

Ahanhanzo et al. (2010) observaram que 0,5 mg L⁻¹ de BAP no meio de cultura MS induziu um aumento significativo no número de folhas para os genótipos de Inhame Kounondakou e Gnonboya, essa diferença de concentração encontrada

para a citocinina em relação ao trabalho descrito pode estar relacionada ao estudo em função de diferentes genótipos para as espécies de Inhame.

Tabela 2 - Teste de qui-quadrado, frequência observada (fo), frequência esperada (fe) e contribuição para o valor de qui-quadrado (cq) do número de folhas em função do meio de cultura e das concentrações de BAP em plantas de inhame da Costa (*Dioscorea rotundata* Poir) cultivadas *in vitro*.

Meio de cultura	Concentrações de BAP (mg L ⁻¹)					
	0,00	0,05	0,15	0,45	1,35	4,05
MS1	346,00 ¹	284,00	271,00	309,00	100,00	60,00
	302,84 ²	340,42	262,94	259,74	159,60	49,87
	6,15 ³	9,35	0,25	9,34	22,26	2,06
MS2	413 ¹	569,00	388,00	342,00	300,00	65,00
	456,16 ²	512,78	396,06	391,26	240,40	75,13
	4,08 ³	6,21	0,16	6,20	14,76	1,37
Qui-quadrado (χ^2):	95,76		Probabilidade: 0,000			

¹ FO: frequência observada; ² FE: frequência esperada; ³ CQ: valor do qui-quadrado

As plantas que foram cultivadas no tratamento que continha MS2+ 0,05 mg L⁻¹ de BAP aos 120 dias do cultivo *in vitro* apresentaram as maiores médias de número de raízes quando comparadas às do meio MS1 sem adição de BAP (Tabela 3). Esses resultados corroboram com Sonibare e Adeniran (2014) que conseguiram identificar o maior número de raízes em *Dioscorea bulbifera* quando cultivadas em meio MS + 0,05 mg L⁻¹ de BAP. Ahanhanzo et al.

(2010) não observaram a formação de raízes na presença das citocininas (BAP ou zeatina), em genótipos de inhame (*Dioscorea* spp.). Em *D. alata* Royero et al. (2007) observaram ainda que, em meio de cultura MS, a formação das raízes não foi favorecida possivelmente devido a alta concentração de BAP (2 mg L⁻¹) usada. Já Fotso et al. (2013) conseguiram observar o maior número de plantas enraizadas de *D. alata* utilizando concentrações elevadas de BAP.

Tabela 3 - Teste de qui-quadrado, frequência observada (fo), frequência esperada (fe) e contribuição para o valor de qui-quadrado (cq) do número de raízes em função do meio de cultura e das concentrações de BAP em plantas de inhame da Costa (*Dioscorea rotundata* Poir) cultivadas *in vitro*.

Meio de cultura	Concentrações de BAP (mg L ⁻¹)					
	0,00	0,05	0,15	0,45	1,35	4,05
MS1	75,00 ¹	223,00	162,00	211,00	3,00	7,00
	152,27 ²	212,79	166,53	155,35	22,74	5,78
	39,21 ³	0,49	0,12	19,93	6,61	0,26
MS2	320,00 ¹	329,00	270,00	192,00	24,00	8,00
	242,73 ²	329,21	265,47	247,65	36,26	9,22
	24,60 ³	0,31	0,07	12,51	4,14	0,16
Qui-quadrado (χ^2):	114,78		Probabilidade: 0,000			

¹ FO: frequência observada; ² FE: frequência esperada; ³ CQ: valor do qui-quadrado

Mahesh et al. (2010) estudando a micropropagação em *D. wightii*, revelaram que a porcentagem de indução de raízes diminui com adição de citocininas no meio de cultura, enquanto que o número de gemas axilares anormais aumentou usando altos níveis desses reguladores de crescimento. Em contraste ao resultado anterior, a adição de ácido indolbutírico (AIB) tem mostrado melhores efeitos sobre a porcentagem de enraizamento e número de raízes por segmento em *D. oppositifolia* e *D. pentaphylla* (Poornima & Ravishankar, 2007).

Segundo Souza e Pereira (2007), o desenvolvimento do sistema radicular a partir da formação de raízes adventícias em plantas propagadas vegetativamente sob condições *in vitro* ou *in vivo*, é um processo de grande complexidade e envolve fatores endógenos e exógenos tais como, os níveis de auxina endógena, as condições inerentes à planta matriz como juvenilidade e genótipo, o meio de cultura, a presença de reguladores de crescimento e carboidratos, a nutrição mineral, a presença de poliaminas e substâncias como carvão ativado e compostos fenólicos, as condições ambientais de crescimento das plântulas *in vitro*, dentre outros.

No intervalo de 0,00 – 0,15 mg L⁻¹ de BAP houve um efeito satisfatório na formação de brotos para o cultivo das plantas de inhame *in vitro*, e à medida que foi aumentando a concentração de BAP a frequência de brotos foi decrescendo (Tabela 4). Manoharan et al. (2016) conseguiram verificar maior número de brotações para *D. rotundata* quando cultivada em meio MS suplementado com 0,4 mg L⁻¹. Estudos desenvolvidos por Fotso et al. (2013) comprovam maior número de brotações em *Dioscorea alata* L. em meio MS suplementado com 0,5 mg L⁻¹ de BAP, esses resultados estão de acordo com Royero et al. (2007) que também encontraram maior média de brotos em meio MS suplementado com 0,5 mg L⁻¹ de BAP em *D. alata* L. Geralmente, o número de brotações é inibido com o aumento da concentração de BAP no meio de cultura. Isso ocorre porque, em alguns casos, o aumento da concentração da citocinina induz a um aumento do número de brotações formadas por explante, as quais competem entre si pela absorção de sais minerais e vitaminas do meio de cultura (Rocha et al., 2007).

Tabela 4 - Teste de qui-quadrado para número de brotos em função das concentrações de BAP em plantas de inhame da Costa (*Dioscorea rotundata* Poir) cultivadas *in vitro*.

Concentrações de BAP (mg L ⁻¹)	Frequência
0,00	156
0,05	158
0,15	160
0,45	148
1,35	147
4,05	116
Qui-quadrado (χ^2): 155,86	Probabilidade: 0,000

Em trabalho realizado com segmentos nodais de *D. oppositifolia*, Behera et al. (2009) notaram uma alta taxa de proliferação de brotos utilizando duas citocininas de uma só vez (cinetina e BAP), combinadas com ANA em meio de cultura MS.

Shin et al. (2004) relataram que a combinação entre BAP e ANA desempenha importante papel para a propagação *in vitro* de explante nodal para indução de brotações múltiplas, em *D. opposita* sendo que o meio MS suplementado com 1,0 mg L⁻¹ de ANA e 0,5 mg L⁻¹ -1,0 mg L⁻¹ de BAP foi o melhor para a indução

de brotações múltiplas. Ribeiro et al. (2008) encontraram o maior número de brotos (3,5) em meio MS na presença de 5 mg L⁻¹ de BAP em copo-de-leite (*Zantedeschia aethiopica* L. Spreng).

Adeniyi et al. (2008) relataram a regeneração de plantas a partir de gemas e ápices caulinares de *D. rotundata* e *D. alata* em meio MS + 0,01 mg L⁻¹ de ANA + 0,045 mg L⁻¹ de BAP com 75% de indução das brotações. Malaurie et al. (1995) já haviam relatado diferenças entre as auxinas e níveis de citocininas em *D. praehensilis*, e no complexo *D. cayenensis*

- *D. rotundata*. É provável que os diferentes gêneros e espécies tenham diferente exigência de hormônios para regeneração ótima.

Em estudos desenvolvidos por Souza et al. (2011) foi possível verificar que a maior percentagem de explantes brotados (80%) foi obtida em meio MS + 0,1 mg L⁻¹ de BAP. Concentrações de BAP superiores a 1,0 mg L⁻¹ podem ter causado um efeito fitotóxico nos explantes, e por isso, a percentagem de brotações foi significativamente menor quando comparada ao resultado obtido em 0,1 mg L⁻¹ de BAP. Thankappan e Abraham (2012) também conseguiram verificar resultados satisfatórios no desenvolvimento de brotos em estudos com *Dioscorea wallichii* utilizando o meio MS + 0,45 mg L⁻¹ de BAP.

O BAP, por ter um efeito mais expressivo na multiplicação *in vitro* quando comparado às outras citocininas, pode apresentar fitotoxicidade em algumas espécies quando utilizado em concentrações relativamente altas, acarretando um efeito negativo quando o objetivo é a indução de múltiplos brotos (Souza et al., 2007). Concentrações excessivas de BAP podem promover o desbalanceamento endógeno dos fitormônios, inibição da multiplicação celular, redução do crescimento das brotações e aumento da vitrificação.

Em estudos realizados por Kadota e Niimi (2004) e Poornima e Ravishankar (2007), sobre o

efeito do BAP na multiplicação *in vitro* de *D. japonica*, *D. oppositifolia* e *D. pentaphylla*, respectivamente, os autores observaram que melhores respostas, quanto à multiplicação *in vitro*, também ocorreram quando menores concentrações dessa citocinina foram adicionadas ao meio de cultura, corroborando com os resultados obtidos neste trabalho.

A determinação de uma concentração máxima vem sendo relatada em vários trabalhos, a partir da qual se observa um decréscimo no número de brotações, como o que foi observado nesse trabalho utilizando-se a concentração de 1,35 mg L⁻¹ de BAP. (Poornima, Ravishankar, 2007 & Royero et al., 2007).

Para a variável número de nós, explantes cultivados por 120 dias no meio de cultura MS2 + 0,05 mg L⁻¹ de BAP apresentaram resultados superiores em relação aos demais tratamentos estudados, para formação de nós em plantas de inhame cultivadas *in vitro*. Já o meio de cultura MS1 na concentração de 0,05 mg L⁻¹ de BAP não contribuiu de forma positiva na formação do número de nós nas plantas (Tabela 5). Em estudos com *Dioscorea bulbifera* Sonibare e Adeniran (2014) obtiveram resultados satisfatórios utilizando meio MS suplementado com 1,00 mg L⁻¹ de BAP na formação do número de nós.

Tabela 5 - Teste de qui-quadrado, frequência observada (fo), frequência esperada (fe) e contribuição para o valor de qui-quadrado (cq) do número de nós em função do meio de cultura e das concentrações de BAP em plantas de inhame da Costa (*Dioscorea rotundata* Poir) cultivadas *in vitro*.

Meio de cultura	Concentrações de BAP (mg L ⁻¹)					
	0,00	0,05	0,15	0,45	1,35	4,05
MS1	138,00 ¹	115,00	85,00	119,00	37,00	25,00
	129,56 ²	139,50	81,71	93,86	50,06	16,56
	0,55 ³	4,30	0,13	2,76	3,41	4,30
MS2	214,00 ¹	264,00	137,00	145,00	99,00	20,00
	222,44 ²	239,50	140,29	161,10	85,94	28,44
	0,32 ³	2,51	0,07	1,62	1,98	2,50
Qui-quadrado (χ ²):	27,90		Probabilidade: 0,000			

¹ FO: frequência observada; ² FE: frequência esperada; ³ CQ: valor do qui-quadrado

No que se refere ao tipo de meio nutritivo, Antonio et al. (2012) relataram, ao estudarem o efeito dos meios de cultura: MS, B5 e WPM em *D.*

remotiflora, que o meio MS formou o maior número médio de brotos (2,0), número de nós (2,9) e número de folhas por segmento (5,2), bem

como o maior comprimento da parte aérea das plantas (2,4 cm).

O meio MS2 + 0,05 mg L⁻¹ de BAP proporcionou resultados significativos na formação de gemas por nó, já o meio MS2 suplementado com 0,45 mg L⁻¹ de BAP não respondeu de forma favorável a essa característica (Tabela 6). Já Thankappan e Abraham (2012) conseguiram verificar resultados satisfatórios no desenvolvimento de gemas por nó

em estudos com *Dioscorea wallichii* utilizando o meio MS + 0,45 mg L⁻¹ de BAP. Em pesquisa desenvolvida por Souza et al. (2011), quando adicionaram 3,0 mg L⁻¹ de BAP ao meio de multiplicação MS não observaram desenvolvimento de gemas *in vitro* para *D. multiflora*, ou seja, a concentração de 3,0 mg L⁻¹ de BAP parece ter se tornado um fator limitante no desenvolvimento das gemas.

Tabela 6 - Teste de qui-quadrado, frequência observada (fo), frequência esperada (fe) e contribuição para o valor de qui-quadrado (cq) do número de gemas/nó em função do meio de cultura e das concentrações de BAP em plantas de inhame da Costa (*Dioscorea rotundata* Poir) cultivadas *in vitro*.

Meio de cultura	Concentrações de BAP (mg L ⁻¹)					
	0,00	0,05	0,15	0,45	1,35	4,05
MS1	96,00 ¹	83,00	58,00	77,00	32,00	20,00
	88,89 ²	89,28	65,21	67,93	40,76	15,14
	0,57 ³	0,44	0,80	1,21	1,88	1,56
MS2	133,00 ¹	147,00	110,00	98,00	73,00	19,00
	140,11 ²	140,72	102,78	107,07	64,24	23,86
	0,36 ³	0,28	0,51	0,77	1,19	0,99
Qui-quadrado (χ^2):13,71			Probabilidade: 0,033			

¹ FO: frequência observada; ² FE: frequência esperada; ³ CQ: valor do qui-quadrado

Em relação ao tipo de citocinina, alguns estudos no gênero *Dioscorea* têm mostrado que o BAP é melhor que a cinetina na indução de um maior número de gemas (Poornima, Ravishankar, 2007 & Yan et al., 2011). Ao comparar a frequência do número de gemas/nó em função dos períodos de avaliação foi possível verificar os maiores valores aos 120 dias do cultivo *in vitro*.

Silveira et al. (2001) obtiveram as melhores respostas para o número de gemas no estudo de porta-enxertos do gênero *Prunus* no meio de cultura MS + 0,34 mg L⁻¹ BAP. Esses autores destacam que os meios ricos em sais dificultam a proliferação de gemas e este fato se agrava ainda mais quando maiores concentrações de BAP forem adicionadas aos meios de cultura.

O meio MS2 suplementado ou não de 0,15 mg L⁻¹ de BAP apresentaram 100% de plantas sobreviventes. Estudos têm mostrado que a presença de BAP afeta a sobrevivência do explante para espécies de *Dioscorea* e também

pode diminuir a produção de microtúberas (Islam et al., 2008).

Sabe-se que citocininas desempenham papel importante em vários processos durante o crescimento e desenvolvimento das plantas, tais como estímulo à divisão celular, inibição da senescência, quebra da dominância apical e transmissão de sinais nutricionais. No entanto, as respostas do tecido vegetal cultivado *in vitro* dependem da espécie da planta, bem como da fase de desenvolvimento da estrutura considerada (Sakakibara, 2010).

Conclusão

De acordo com os resultados obtidos nas condições experimentais em que esse trabalho foi estabelecido, pode-se concluir que: o meio de cultura MS com modificações, sem adição ou adicionando 0,05 mg L⁻¹ de BAP, proporciona o

melhor desenvolvimento das plantas de inhame *in vitro* com maior número de nós.

Referências

- Adeniyi, O. J., Adetimirin, V. O., Ingelbrecht, I., & Asiedeu, R. (2008). Shoot and plantlet regeneration from meristems of *Dioscorea rotundata* Poir and *Dioscorea alata* L. *African Journal of Biotechnology*, Nairobi, 7 (8), 1003-1008.
- Ahanhanzo, C., Gandonou, C.H.B., Agbidinokoun, A., Dansi, A., Agbangla, C. (2010). Effect of two cytokinins in combination with acetic acid α -naphthalene on yams (*Dioscorea* spp.) genotypes' response to *in vitro* morphogenesis. *African Journal of Biotechnology*, Nairobi, 9 (5), 8837-8843.
- Antonio, A. B., Ruvalcaba, F. S. C., & Sosa, F. C. (2012). Effect of plant growth regulators on plant regeneration of *Dioscorea remotiflora* (Kunth) through nodal explants. *Plant Growth Regul*, New York, 68, 293-301.
- Balogun, M.O., Fawole, I., NG, S. Y. C., NG, Q., Shiwachi, H., & Kikuno, H. (2006). Interaction among cultural factors in microtuberization of white yam (*Dioscorea rotundata* Poir.). *Tropical Science*, Nova York, 46 (1), 55-59.
- Behera, K. K., Sahoo, & S., Prusti, A. B. (2008) Effect of plant growth regulator on *in vitro* micropropagation of Bitter Yam (*Dioscorea hispida* Dennst.). *International Journal of Integrative Biology*, Naples, 4 (1), 50-54.
- Behera, K. K., Sahoo, & S., Prusti, A. B. (2009). Regeneration of Plantlet of Water Yam (*Dioscorea oppositifolia* L.) through *In vitro* Culture from Nodal Segments. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici*, Clu-Napocaj, 37 (1), 94-102.
- Chen, F. Q., FU, Y., Wang, D. L., Gao, X., & Wang, L. (2007). The effect of plant growth regulators and sucrose on the micropropagation and microtuberization of *Dioscorea nipponica* Makino. *Journal of plant growth regulation*, Netherlands, 26, 38-45.
- Food and agriculture organization of the United Nations. (2017). Recuperado em 08 julho, 2017, de <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID>.
- Fotso, N. N., Sandrine, M. F., Mbouobda, H. D., Dcjcogue, P. F., & Omokolo, N. D. (2013). Micropropagation of *Dioscorea alata* L. from microtubers induced *in vitro*. *African Journal of Biotechnology*, 12 (10), 1057-1067.
- Islam, M. T., Keller, E. R. J., & Dembele, D. P. (2008). Effects of growth regulators on *in vitro* propagation and tuberization of four *Dioscorea* species. *Plant Tissue Culture and Biotechnology*, Bangladesh, 18, 25-35.
- International Institute of Tropical Agriculture. (1985). Root and tuber improvement program. *Research Highlights*, Nigeria, 1981-1984.
- Kadota, M., & Niimi, Y. (2004). Improvement of micropropagation of Japanese yam using liquid and gelled medium culture. *Scientia Horticulturae*, Amsterdam, 102, 461-466.
- Leitzke, L.N., Damiani, C. R., & Schuch, M. W. (2009). Meio de cultura, concentração de AIB e tempo de cultivo no enraizamento *in vitro* de amora-preta e framboeseira. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, 31 (2), 582-587.
- Mahesh, R., Muthuchelian, K., Maridass, M., & Raju, G. (2010). *In vitro* propagation of wild yam, *Dioscorea wightii* through nodal cultures. *International Journal of Biological Technology*, Switzerland, 1, 111-113.
- Malaurie, B., Pungu, O., Trouslot, M. (1995). Effect of growth regulators concentrations on morphological development of meristem-tips in *Dioscorea cayenensis-D. rotundata* complex and *D. praehensilis*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, London, 4, 229-235.
- Manoharan, R., Tripathi, J. N., & Tripathi, L. (2016). Plant regeneration from axillary bud derived callus in white yam (*Dioscorea rotundata*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 126, 481-497.
- Mantovani, N.C., Franco, E.T.H., & Vestena, S. (2001). Regeneração *in vitro* de louro-pardo (*Cordia trichotoma* (Vellozo) Arrabida ex Steudel). *Ciência Florestal*, Santa Maria, 11 (2), 93-101.
- Murashige, T., & Skoog F. A. (1962). A revised medium for a rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, 15, 473-479.
- Ondo, P., Kevers, C., & Dommès, J. (2007).

- Axillary proliferation and tuberization of *Dioscorea cayenensis*-*D. rotundata* complex. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, The Hague, 91, 107-109.
- Poornima, G.N., & Ravishankar RAI, V. (2007). *In vitro* propagation of wild yams, *Dioscorea oppositifolia* (Linn) and *Dioscorea pentaphylla* (Linn). *African Journal of Biotechnology*, Pretoria, 6 (20), 2348-2352.
- Oliveira, A. P., Barbosa, L. J. N., Pereira, W. E., Silva, J. E. L., & Oliveira, A. N. P. (2007). Produção de túberas comerciais de inhame em função de doses de nitrogênio. *Horticultura Brasileira*, Brasília, 25, 73-76.
- Ribeiro, M. N., PasquaL, M., Bortolotti, A. S., Rodrigues, V. A. (2008). Diferentes concentrações de sais do meio MS e de sacarose na multiplicação *in vitro* de *Zantedeschia aethiopica* L. Spreng. (copo-de-leite). *Revista Ciência Agronômica*, Fortaleza, 39 (1), 101-106.
- Rocha, P. S. G., Schuch, M. W., Bianchi, V. J., Fachinello, J. C. (2007). Qualidade da luz na micropropagação do porta-enxerto de *Prunus* cv. Mr. S. 2/5. *Bioscience Journal*, Uberlândia, 23 (3), 32-40.
- Royero, M., Vargas, T. E., & Oropeza, M. (2007). Micropropagación y organogénesis de *Dioscorea alata* (ÑAME). *Interciência*, Caracas, 32, 247-252.
- Sakakibara, H. (2010). Cytokinin biosynthesis and metabolism. In: Davies, P.J. *Plant hormones* (pp. 95-114). New York: Cornell University.
- Santos, E. S., & Macêdo, L. S. (2002). Tendências e perspectivas da cultura do inhame (*Dioscorea* sp.) no Nordeste do Brasil. *Anais do Simpósio Nacional Sobre as Culturas do Inhame e do Taro* (pp. 21-31). João Pessoa: EMEPA-PB, 2.
- Shin, J. H., Kim, S. K., Kwon, J. B., Lee, B. H., & Shon, J. K. (2004). Factors affecting the production of invitro plants from the Nodal Pieces of Chinese Yam (*Dioscorea opposita* Thunb). *Journal of Plant Biotechnology*, Coréia do Sul, 6 (2), 97-102.
- Silva, O. S., Carvalho, P. C. L., Moreira, R. F. C., & Carneiro, J. L. S. (2012). *Orientações técnicas para o cultivo do inhame* (40p). Cruz das Almas, BA: Embrapa Mandioca e Fruticultura.
- Silveira, C. A. P., Fachinello, J. C., Luces, G. R., Citadin, I., Rodrigues, A. C., Quezeda, A. C., & Silva, J. B. (2001). Multiplicação *in vitro* de porta-enxertos do gênero *Prunus* sob diferentes concentrações de BAP em dois meios de cultura. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, 23 (3), 488-492.
- Sonibare, M. A., & Adeniran, A. A. (2014). Comparative micromorphological study of wild and micropropagated *Dioscorea bulbifera* Linn. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 4 (3), 176-183.
- Souza, A. V., Pereira, A. M. S. (2007). Enraizamento de plantas cultivadas *in vitro*. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, Botucatu, 9 (4), 103-117.
- Souza, A. V., Pinto, J. E. B., Bertolucci, S. (2007). *In vitro* Propagation of *Lychnophora pinaster* (Asteraceae): a threatened endemic medicinal plant. *Hortscience*, Amsterdam, 42 (7), 1665-1669.
- Souza, A. V., Bertoni, B. W., França, S. C., & Pereira, A. M. S. (2011). Micropropagação de *Dioscorea multiflora* Griseb. *Revista Ciência e agrotecnologia*, Lavras, 35 (1), 92-98.
- Statistical Analysis System. (2004). *SAS user's guide: statistic*. (Version 9.1.3). [Software]. Cary: SAS Institute.
- Thankappan, S., & Abraham, K. (2012). Micropropagation and Microtuber Induction in *Dioscorea wallichii* Hook.f. *Journal of Root Crops*, 38 (2), 109-115.
- Yan, H., Yang, L., & Li, Y. (2011). Axillary shoot proliferation and tuberization of *Dioscorea fordii* Prain et Burk. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, Londonn, 104, 193-198.

Recebido em:13 /03/2015
Aceito em: 31/08/2017