

CARACTERIZAÇÃO, ESTABELECIMENTO *IN VITRO*
E CRIOPRESERVAÇÃO DE VARIEDADES LOCAIS
DE BATATA-DOCE (*Ipomoea batatas* L. Lam)

RENATO GOBBI VETTORAZZI

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO - UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
FEVEREIRO - 2016

CARACTERIZAÇÃO, ESTABELECIMENTO *IN VITRO*
E CRIOPRESERVAÇÃO DE VARIEDADES LOCAIS
DE BATATA-DOCE (*Ipomoea batatas* L. Lam)

RENATO GOBBI VETTORAZZI

“Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Genética e Melhoramento de Plantas.”

Orientadora: Prof^a. Virginia Silva Carvalho

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
FEVEREIRO – 2016

CARACTERIZAÇÃO, ESTABELECIMENTO *IN VITRO*
E CRIOPRESERVAÇÃO DE VARIEDADES LOCAIS
DE BATATA-DOCE (*Ipomoea batatas* L. Lam)

RENATO GOBBI VETTORAZZI

“Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Genética e Melhoramento de Plantas.”

Aprovada em 04 de fevereiro de 2016.

Comissão Examinadora:

Prof^a. Monique Moreira Moulin (D.Sc., Genética e Melhoramento de Plantas) –
IFES

Prof^a. Telma Nair Santana Pereira (Ph.D., Melhoramento de Plantas) – UENF

Prof^a. Rosana Rodrigues (D.Sc., Produção Vegetal) – UENF

Prof^a. Virginia Silva Carvalho (D.Sc., Fitotecnia) – UENF
(Orientadora)

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela proteção, graças e bênçãos concedidas;

À Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, pela oportunidade de qualificação;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo primeiro ano de bolsa de mestrado;

À Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), pela concessão da bolsa de mestrado nota 10;

À professora Virginia Silva Carvalho, pela orientação, amizade, apoio, incentivo e confiança;

Às professoras conselheiras, Rosana Rodrigues e Telma Nair Santana Pereira, pelos ensinamentos e valiosas sugestões;

À Cláudia Pombo, por todas as suas contribuições. À Monique Moreira Moulin, por ter iniciado os trabalhos com conservação de batata-doce, por todas as suas contribuições e pela disponibilidade de participação na banca;

Aos colegas de laboratório, em especial, Andressa, Carmen, Francielle, Kássila, Letícia, Mayara, Rafael Walter, Rafael Rhuan, Ramon e Roberto, pelo auxílio e por todos os momentos de descontração vividos durante a realização dos trabalhos.

À minha família, pelas orações e por me fazer uma pessoa digna. Em especial aos meus pais Jorge e Maria da Penha e minha irmã Rosana pela

paciência, incentivo, força, carinho, dedicação e por me permitirem chegar aonde cheguei;

À minha namorada Milena, por todo apoio, carinho, incentivo, amor, compreensão e por ter me tornado uma pessoa mais feliz ao fazer parte da minha vida;

Ao meu primo Julio Cesar, amigo, colega de curso e de república, pela amizade e paciência durante esses anos;

Aos amigos e colegas de mestrado, em especial Jéssica Morais Cunha e Renato Santa Catarina pelos momentos de descontração. Desejo todo sucesso a vocês;

Aos professores do curso, que contribuíram positivamente para a minha formação acadêmica, pela oportunidade de aprendizagem, confiança e incentivo;

A todos os funcionários da UENF, em especial ao Daniel, pela paciência e informações quanto aos prazos e datas;

Enfim, a todos que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Protocolo de criopreservação pelo método de vitrificação.....17
- Figura 2.** Mudas de batata-doce em câmara de crescimento após 30 dias de plantio. Campos dos Goytacazes - RJ, 2015.....33
- Figura 3.** Classes fenotípicas da parte aérea e frequências observadas para 30 acessos de batata-doce do Norte do Estado do Rio de Janeiro. Campos dos Goytacazes - RJ, 2015.....45
- Figura 4.** Dendrograma de dissimilaridade genética, obtido pelo método hierárquico de médias ponderadas, com base em descritores qualitativos da parte aérea, entre 30 acessos de batata-doce do Norte do Estado do Rio de Janeiro. Campos dos Goytacazes - RJ, 2016.....47
- Figura 5.** Variabilidade fenotípica das folhas dos acessos de batata-doce do Norte do Estado do Rio de Janeiro. Campos dos Goytacazes - RJ, 2016.....48
- Figura 6.** Classes fenotípicas dos descritores para raiz e frequências observadas para 28 acessos de batata-doce do Norte do Estado do Rio de Janeiro. Campos dos Goytacazes - RJ, 2016.....49

- Figura 7.** Dendrograma de dissimilaridade genética, obtido pelo método hierárquico de médias ponderadas, com base em descritores qualitativos de raiz, entre 28 acessos de batata-doce do Norte do Estado do Rio de Janeiro. Campos dos Goytacazes - RJ, 2016.....51
- Figura 8.** Variabilidade fenotípica das raízes dos acessos de batata-doce do Norte do Estado do Rio de Janeiro. Campos dos Goytacazes - RJ, 2016.....52
- Figura 9.** Perfil de um gel de ISSR utilizando o iniciador de sequência (GA)₈YT para os 30 acessos de batata-doce da Coleção de Germoplasma da UENF. Campos dos Goytacazes - RJ, 2016.....53
- Figura 10.** Dendrograma obtido pelo método UPGMA a partir da matriz de dissimilaridade expressa pelo complemento aritmético de Jaccard entre 30 acessos de batata-doce da Coleção de Germoplasma da UENF, com base em 68 fragmentos polimórficos amplificados por marcador ISSR. Campos dos Goytacazes - RJ, 2016.....54
- Figura 11.** Contaminação por fungos em explantes de batata-doce *in vitro*, em meio contendo sais minerais do meio MS e 0,06 mol L⁻¹ de sacarose. Campos dos Goytacazes - RJ, 2016.....56
- Figura 12.** Porcentagem de contaminação dos explantes de acessos de batata-doce *in vitro*, em meio contendo sais minerais do meio MS e 0,06 mol L⁻¹ de sacarose. Campos dos Goytacazes - RJ, 2016.....57
- Figura 13.** Gemas axilares de batata-doce do acesso UENF 1990 criopreservados no 1º ensaio de vitrificação em gotículas (Pennycooke e Towill, 2000, modificado) após oito semanas em meio de recuperação. **T1:** Pré-tratamento + Vitrificação + nitrogênio líquido (NL); **C1:** Vitrificação + NL; **C2:** Pré-tratamento +NL; **C3:** Pré-tratamento + Vitrificação; **C4:** Explante em meio de recuperação. Barra 65 mm. Campos dos Goytacazes - RJ, 2016.....58

- Figura 14.** Gemas axilares de batata-doce do acesso UENF 1937 criopreservados no 2º ensaio de vitrificação em gotículas (Pennycooke e Towill, 2000, modificado) após oito semanas em meio de recuperação. **T1:** Pré-tratamento + Vitrificação + nitrogênio líquido (NL); **C1:** Vitrificação + NL; **C2:** Pré-tratamento +NL; **C3:** Pré-tratamento + Vitrificação; **C4:** Explante em meio de recuperação. *Barra* 65 mm. Campos dos Goytacazes - RJ, 2016.....59
- Figura 15.** Gemas axilares de batata-doce do acesso UENF 1935 criopreservados no 3º ensaio de vitrificação em gotículas (Pennycooke e Towill, 2001) após oito semanas em meio de recuperação. **T1:** Pré-tratamento + Vitrificação + nitrogênio líquido (NL); **C1:** Vitrificação + NL; **C2:** Pré-tratamento +NL; **C3:** Pré-tratamento + Vitrificação; **C4:** Explante em meio de recuperação. *Barra* 65 mm. Campos dos Goytacazes - RJ, 2016.....60
- Figura 16.** Gemas axilares de batata-doce do acesso UENF 1917 criopreservados no 4º ensaio de encapsulamento-vitrificação (Hirai e Sakai, 2003) após oito semanas em meio de recuperação. **T1:** Encapsulamento + Pré-cultivo + Crioproteção + Vitrificação + nitrogênio líquido (NL); **C1:** Encapsulamento + Crioproteção + Vitrificação + NL; **C2:** Encapsulamento + Pré-cultivo + NL; **C3:** Encapsulamento + NL; **C4:** Explante em meio de recuperação. *Barra* 65 cm. Campos dos Goytacazes - RJ, 2016.....61
- Figura 17.** Gemas axilares de batata-doce do acesso UENF 1987 criopreservados no experimento de encapsulamento-vitrificação após oito semanas em meio de recuperação. **T1:** Encapsulamento + Crioproteção + PVS2 (30' a 27°C) + NL; **T2:** Encapsulamento + Crioproteção + PVS2 (30' a 0°C) + NL; **T3:** Encapsulamento + Crioproteção + PVS2 (60' a 27°C) + NL; **T4:** Encapsulamento + Crioproteção + PVS2 (60' a 0°C) + NL; **C1:** Explante em meio de recuperação; **C2:** Explante encapsulado em meio de recuperação; **C3:** Encapsulamento + NL; **C4:** Encapsulamento + Crioproteção + PVS2 (0') + NL; **C5:** Encapsulamento + Crioproteção + PVS2 (0'). *Barra* 65 mm. Campos dos Goytacazes - RJ, 2016.....62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Criopreservação de germoplasma de batata-doce.....	20
Tabela 2. Identificação dos acessos de batata-doce, com a respectiva identificação do acesso, nome comum, local de procedência, local de coleta e valores de latitude e longitude dos pontos de coleta (<i>Adaptado de Moulin, 2010</i>).....	24
Tabela 3. Iniciadores de ISSR utilizados e temperaturas de anelamento, no estudo da diversidade genética entre 30 acessos de batata-doce da Coleção de Germoplasma da UENF. Campos dos Goytacazes - RJ, 2016.....	30
Tabela 4. Marcadores ISSR na análise da diversidade genética entre 30 acessos de batata-doce da Coleção de Germoplasma da UENF. Campos dos Goytacazes - RJ, 2016.....	53
Tabela 5. Sobrevivência (%), altura (cm) e nº de folhas de gemas axilares de batata-doce do acesso UENF 1990 criopreservados no 1º ensaio de vitrificação em gotículas (Pennycooke e Towill, 2000, modificado) após oito semanas em meio de recuperação. NL = Nitrogênio Líquido. Campos dos Goytacazes - RJ, 2016.....	58

Tabela 6. Sobrevivência (%), altura (cm) e nº de folhas de gemas axilares de batata-doce do acesso UENF 1937 criopreservados no 2º ensaio de vitrificação em gotículas (Pennycooke e Towill, 2000, modificado) após oito semanas em meio de recuperação. NL = Nitrogênio Líquido. Campos dos Goytacazes - RJ, 2016.....	59
Tabela 7. Sobrevivência (%), altura (cm) e nº de folhas de gemas axilares de batata-doce do acesso UENF 1935 criopreservados no 3º ensaio de vitrificação em gotículas (Pennycooke e Towill, 2001) após oito semanas em meio de recuperação. NL = Nitrogênio Líquido. Campos dos Goytacazes - RJ, 2016.....	60
Tabela 8. Sobrevivência (%), altura (cm) e nº de folhas de gemas axilares de batata-doce do acesso UENF 1917 criopreservados no 4º ensaio de encapsulamento-vitrificação (Hirai e Sakai, 2003) após oito semanas em meio de recuperação. NL = Nitrogênio Líquido. Campos dos Goytacazes - RJ, 2016.....	61
Tabela 9. Sobrevivência (%), altura (cm) e nº de folhas de gemas axilares de batata-doce do acesso UENF 1987 criopreservados no experimento de encapsulamento-vitrificação após oito semanas em meio de recuperação. NL = Nitrogênio Líquido. Campos dos Goytacazes - RJ, 2016.....	63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIA - ácido indol-acético.

ANA - ácido naftaleno acético.

BA - benziladenina.

BOD - demanda bioquímica de oxigênio.

CCTA - Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias.

CGIAR - Conselho de Pesquisa Agrícola Internacional.

CTAB - brometo de cetil trimetil amônio.

CTCRI - *Central Tuber Crops Research Institute*.

DMSO - dimetilsulfóxido.

DNA - ácido desoxirribonucleico.

dNTP's - desoxirribonucleotídeos fosfatados.

EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária.

GA₃ - ácido giberélico.

ISSR - *Inter Single Sequence Repeats*.

KIN - cinetina.

LFIT - Laboratório de Fitotecnia.

LMGV - Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal.

MS - Murashige e Skoog.

NaClO - hipoclorito de sódio.

NH₄⁺ - amônio.

NL - nitrogênio líquido.

PCR - reação de polimerase em cadeia.

PVC - policloreto de vinila.

PVP - polivinilpirrolidona.

PVS2 - *Plant Vitrification Solution 2* (Sakai et al., 1990).

SSR - microssatélites (*Simple Sequence Repeats*)

UAP - Unidade de Apoio à Pesquisa.

UENF - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro.

UPGMA - agrupamento pareado não ponderado baseado na média aritmética.

UV - ultravioleta.

SUMÁRIO

RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	xv
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. OBJETIVOS.....	04
2.1. Geral.....	04
2.2. Específicos.....	04
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	05
3.1. Origem e aspectos botânicos da batata-doce.....	05
3.2. A importância econômica e nutricional da batata-doce.....	06
3.3. A importância da conservação do germoplasma de batata-doce.....	08
3.4. A caracterização do germoplasma de batata-doce.....	09
3.5. As formas de conservação de germoplasma vegetal.....	11
3.6. Os bancos de germoplasma de batata-doce no Brasil e no mundo.....	12
3.7. A conservação <i>in vitro</i> de germoplasma de batata-doce.....	12
3.8. A criopreservação de germoplasma vegetal.....	14
3.8.1. Encapsulamento-Desidratação.....	15
3.8.2. Vitrificação.....	16
3.8.3. Encapsulamento-Vitrificação.....	17
3.8.4. Desidratação.....	18
3.8.5. Pré-Crescimento.....	18
3.8.6. Pré-Crescimento-Desidratação.....	18

3.8.7. Vitrificação em gotículas.....	19
3.9. A criopreservação de germoplasma de batata-doce.....	19
3.9.1. Vitrificação em batata-doce.....	20
3.9.2. Vitrificação em gotículas em batata-doce.....	21
3.9.3. Encapsulamento-Desidratação em batata-doce.....	22
3.9.4. Encapsulamento-Vitrificação em batata-doce.....	22
4. MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1. Material vegetal.....	24
4.2. Caracterização morfológica dos acessos coletados.....	26
4.3. Caracterização molecular dos acessos coletados.....	28
4.3.1. Preparo das amostras.....	28
4.3.2. Extração do DNA.....	28
4.3.3. Quantificação do DNA.....	29
4.3.4. Condições de Amplificação.....	30
4.3.5. Os iniciadores.....	30
4.3.6. Análise dos fragmentos amplificados.....	31
4.3.7. Divergência Genética.....	31
4.4. Desinfestação e estabelecimento <i>in vitro</i> dos acessos coletados.....	32
4.5. Os ensaios e o experimento de criopreservação.....	34
4.5.1. 1º Ensaio: Vitrificação em gotículas.....	34
4.5.2. 2º Ensaio: Vitrificação em gotículas.....	36
4.5.3. 3º Ensaio: Vitrificação em gotículas.....	37
4.5.4. 4º Ensaio: Encapsulamento-Vitrificação.....	39
4.5.5. Experimento de Encapsulamento-Vitrificação.....	41
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
5.1. Caracterização morfológica dos acessos coletados.....	44
5.2. Caracterização molecular dos acessos coletados.....	52
5.3. Desinfestação e estabelecimento <i>in vitro</i> dos acessos coletados.....	55
5.4. Os ensaios e o experimento de criopreservação.....	57
6. CONCLUSÕES.....	69
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70

RESUMO

VETTORAZZI, Renato Gobbi; M.Sc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; Fevereiro, 2016; Caracterização, estabelecimento *in vitro* e criopreservação de variedades locais de batata-doce (*Ipomoea batatas* L. Lam); Orientadora: Prof^a. Virginia Silva Carvalho. Conselheiras: Prof^a. Rosana Rodrigues e Prof^a. Telma Nair Santana Pereira.

O êxodo rural, em consequência da modernização da agricultura, e as mudanças nos hábitos alimentares, provocada pelo surgimento de novas opções de consumo, têm contribuído para a perda da diversidade genética de genótipos de batata-doce (*Ipomoea batatas*) da região Norte do Estado do Rio de Janeiro, que tradicionalmente eram mantidos por agricultores. O presente trabalho objetivou caracterizar 30 acessos de batata-doce coletados no Norte do Estado do Rio de Janeiro, pertencentes à coleção de germoplasma de batata-doce da UENF, por meio de descritores morfológicos e marcadores moleculares; definir um protocolo de estabelecimento *in vitro* dos acessos para a implantação de uma coleção *in vitro*, com duplicatas de segurança e definir protocolos para criopreservação dos acessos. Para a caracterização morfológica foram utilizados sete descritores de parte aérea e seis de raiz, específicos para batata-doce. Na caracterização molecular foram utilizados 17 iniciadores do tipo ISSR. Para a desinfestação e estabelecimento *in vitro* dos acessos, foram utilizados segmentos nodais contendo gemas axilares de plantas mantidas em câmara de crescimento em substrato autoclavado. A fim de definir protocolos de criopreservação para os

acessos, foram montados quatro ensaios e um experimento de criopreservação, em que protocolos de criopreservação pré-existentes para batata-doce foram testados, utilizando as técnicas de vitrificação em gotículas e encapsulamento-vitrificação. A caracterização morfológica e molecular possibilitou constatar uma alta variabilidade dos genótipos de batata-doce que fazem parte da Coleção de Germoplasma da UENF, apontando boas perspectivas para o programa de melhoramento genético desta cultura. Apesar de alguns acessos apresentarem alta contaminação, todos foram estabelecidos *in vitro* e a coleção de germoplasma de batata-doce *in vitro* com duplicatas de segurança foi implantada na UENF. Os processos de criopreservação utilizando a vitrificação em gotículas e o encapsulamento-vitrificação, a partir de protocolos pré-existentes para a batata-doce, não foram eficientes para os diferentes genótipos estudados.

Palavras-chave: Coleção de Germoplasma; Coleção *in vitro*; Encapsulamento-Vitrificação; Manutenção da Diversidade; Primers ISSR; Vitrificação em Gotículas.

ABSTRACT

VETTORAZZI, Renato Gobbi; M.Sc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; February, 2016; Characterization, *in vitro* establishment and cryopreservation of sweet potato landraces (*Ipomoea batatas* L. Lam); Advisor: Virginia Silva Carvalho. Committee members: Rosana Rodrigues and Telma Nair Santana Pereira.

The rural exodus, as a result of the modernization of agriculture, and changes in eating habits, caused by the emergence of new consumption options, have contributed to the genetic diversity losses of genotypes of sweet potato (*Ipomoea batatas*) in the North of Rio de Janeiro State, which were traditionally kept by farmers. The present work aimed to characterize thirty sweet potato accessions collected in the North of the State of Rio de Janeiro, from the UENF sweet potato germplasm collection through morphological traits and molecular markers; to define a protocol of *in vitro* establishment of accessions for the *in vitro* collection implementation, with safety duplicates and to set protocols for the accessions cryopreservation. For the morphological characterization were used seven shoot descriptors and six root descriptors specific to sweet potatoes. For molecular characterization were used seventeen primers type ISSR. For disinfection and *in vitro* establishment of accessions were used nodal segments containing axillary buds from plants kept in a growth chamber in autoclaved substrate. In order to define cryopreservation protocols for the accessions, four tests and cryopreservation experiment were assembled, where pre-existing protocols for

cryopreservation of sweet potato were tested using droplet-vitrification and encapsulation-vitrification techniques. A high variability of sweet potato genotypes, that are part of the UENF sweet potato germplasm collection, was found, indicating good prospects for the breeding program of this crop. Although some accessions have high contamination, all accessions were established *in vitro* and the *in vitro* sweet potato germplasm collection was implemented in UENF with safety duplicates. The cryopreservation using droplet-vitrification and the encapsulation-vitrification techniques from pre-existing protocols for sweet potato were not efficient for these different genotypes.

Keywords: Germplasm Collection; In Vitro Collection; Encapsulation-Vitrification; Maintaining Diversity; Primers ISSR; Droplet Vitrification.

1. INTRODUÇÃO

A batata-doce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) é uma planta pertencente à família Convolvulaceae, que agrupa mais de mil espécies, sendo a principal espécie de valor comercial dessa família no Brasil (Thompson et al., 1997). Seu uso na alimentação humana, animal e industrial remonta há mais de dez mil anos (Hirosse et al., 2012).

O cultivo da batata-doce é amplamente difundido devido às suas vantagens 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 proteção do solo contra a erosão, além da função social, que contribui para manter o produtor rural no campo (Souza, 2000; Loebenstein, 2009; Zhang et al., 2009).

A produção mundial concentra-se principalmente na Ásia e na África, onde milhares de pessoas dependem da batata-doce para a segurança alimentar (Loebenstein, 2009). A China é o país que mais produz batata-doce (Zhang et al., 2009).

O Brasil é o principal país produtor de batata-doce no continente latino-americano e os estados que mais produzem são: Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Bahia e Paraná (Cavalcante et al., 2009).

O êxodo rural, em consequência da modernização da agricultura, e as mudanças nos hábitos alimentares, provocadas pelo surgimento de novas opções de consumo, têm contribuído para a perda da diversidade genética de genótipos

de batata-doce, que tradicionalmente eram mantidos por agricultores (Cardoso et al., 2011). Neste sentido, esforços estão sendo realizados por alguns programas nacionais e por instituições internacionais para coletar e conservar o germoplasma de batata-doce (Sá et al., 2011). Moulin et al. (2012) caracterizaram os riscos e a efetiva perda genética de genótipos de batata-doce, junto a pequenos agricultores da região do Norte do Estado do Rio de Janeiro.

Em consequência das limitações relacionadas aos métodos convencionais de conservação de germoplasma *ex situ* e *in situ*, tecnologias alternativas, como a conservação *in vitro*, têm sido desenvolvidas e aprimoradas. Tais alternativas são consideradas estratégias para a conservação de recursos genéticos vegetais (Radzan, 2003).

Vettorazzi (2013) determinou um protocolo para conservação *in vitro* de 30 acessos de batata-doce coletados na região Norte do Estado do Rio de Janeiro, visando aumentar o período entre os subcultivos para esta espécie. Foi avaliada a viabilidade das mudas de batata-doce aclimatizadas provenientes da conservação *in vitro* por cultivo mínimo e implantado um banco de germoplasma de batata-doce *in vitro* na UENF. Para o cultivo mínimo *in vitro* dos acessos implantados, recomendou-se a utilização de meio MS (Murashige e Skoog, 1962) com 100% da concentração de sais minerais e 0,06 mol L⁻¹ de sacarose, à temperatura de 27±2°C, com subcultivos a cada 180 dias. Todos os acessos apresentaram 100% de sobrevivência, após o cultivo mínimo *in vitro*, durante a aclimatização.

A conservação *in vitro* de espécies vegetais pode ser realizada, de maneira geral, a partir da técnica de cultivo mínimo para períodos curtos e intermediários, em que o metabolismo das plantas é reduzido por modificações do ambiente e das condições químicas do meio de cultivo, ou a partir da criopreservação, a única técnica disponível para a conservação em longo prazo de germoplasma de plantas que são propagadas vegetativamente (Santos e Salomão, 2010), como é o caso da batata-doce.

A criopreservação é um método baseado na manutenção do material vegetal em condição de ausência de divisão celular ou de metabolismo zero. Para isso, os explantes são submetidos a temperaturas ultrabaixas, em NL a -196°C, ou em sua fase de vapor a -150°C, na presença ou ausência de substâncias crioprotetoras (Engelmann, 2004).

A utilização do banco criogênico permite, ainda, o armazenamento do material biológico por tempo indefinido, com baixos riscos ao material conservado, uma vez que o metabolismo celular é tão reduzido que a deterioração biológica é praticamente paralisada. A estabilidade genética e as características fenotípicas do material são mantidas (Engelmann et al., 2008).

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Caracterizar o germoplasma, estabelecer *in vitro* e definir protocolos de criopreservação de acessos de batata-doce coletados na região do Norte do Estado do Rio de Janeiro.

2.2. Específicos

- Analisar a diversidade genética entre os acessos de batata-doce coletados no Norte do Estado do Rio de Janeiro, pertencentes à Coleção de Germoplasma da UENF, por meio de descritores morfológicos de parte aérea e de raiz e por meio de marcadores moleculares do tipo ISSR;
- Definir um protocolo de estabelecimento *in vitro* dos acessos de batata-doce para a implantação de uma coleção *in vitro* de germoplasma de batata-doce na UENF e para obtenção de explantes para os experimentos de criopreservação;
- Determinar protocolos para criopreservação de acessos de batata-doce coletados na região Norte Fluminense, por meio das técnicas de vitrificação em gotículas e encapsulamento-vitrificação.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Origem e aspectos botânicos da batata-doce

Os primeiros estudos sobre o cultivo da batata-doce são do período posterior à descoberta da América, reforçando a ideia de que a espécie, até então sem origem confirmada, possivelmente tenha surgido neste continente (Austin, 1988, Rossel et al., 2000, Srisuwan et al., 2006, Roullier et al., 2013).

A partir das análises de batatas-doces secas encontradas em cavernas localizadas em Chilca Canyon no Peru e de evidências em escritos arqueológicos na região Maia da América Central, sua utilização remonta há mais de dez mil anos (Hirosse et al., 2012).

A espécie *Ipomoea batatas* pertence à família Convolvulaceae, que agrupa cerca de 50 a 60 gêneros e entre 1600 e 1700 espécies. É uma planta da classe Magnoliopsida, herbácea, com crescimento geralmente rasteiro, podendo ainda ser ereto ou intermediário, sendo a principal espécie de valor comercial da família no Brasil. A espécie *I. aquatica* também é cultivada como alimento, principalmente na Malásia e na China, sendo as folhas e brotos consumidos como hortaliça (Thompson et al., 1997, Daros et al., 2002).

A batata-doce é hexaploide ($2n = 6x = 90$ cromossomos), alógama, autoincompatível e propagada vegetativamente, sendo que cada cultivar é um clone. O mecanismo de autoincompatibilidade presente na espécie conduz a polinização cruzada e, deste modo, a um alto grau de heterozigose. Isto favorece

a grande variabilidade genotípica nesta cultura. A polinização normalmente é feita por insetos e a autofecundação raramente ocorre (Oliveira et al., 2002).

A batata-doce possui dois tipos de sistema radicular: raízes tuberosas, que acumulam reservas e constituem a parte comercial da planta e as raízes absorventes, que cumprem a função de absorção de água e nutrientes. As tuberosas podem apresentar vários tipos de cores de película externa e polpa, formatos e tamanhos (Jones, 1967; Huamán, 1992).

O caule ou rama pode ser segmentado e utilizado na plantação e formação de lavouras. As ramas mais novas apresentam pouca lignina, enquanto que as mais velhas têm um tecido mais rígido, com paredes celulares lignificadas e menor número de células meristemáticas, sendo as ramas novas as mais indicadas para o enraizamento (Huáman, 1992).

3.2. A importância econômica e nutricional da batata-doce

A batata-doce é cultivada em 116 países, sendo que cerca de 80% da produção concentram-se na Ásia, 15% na África e 5% no restante do mundo. É considerada a sétima cultura mais importante do mundo e a quinta mais importante em países em desenvolvimento depois do arroz, trigo, milho e mandioca. A produção global de batata-doce foi de cerca de 103 milhões de toneladas no ano de 2012. No ano em destaque, a China colheu o maior volume mundial, cerca de 73 milhões de toneladas, seguida pela Nigéria com produção de 3,4 milhões de toneladas. Neste *ranking*, o Brasil ocupa a décima-nona posição (Anuário Brasileiro de Hortaliças, 2014).

No continente latino-americano, o Brasil é o principal produtor de batata-doce, com uma produção anual estimada de 505 mil toneladas, obtidas em uma área plantada de aproximadamente 40 mil hectares, ocupando o quarto lugar entre as hortaliças mais consumidas pela população brasileira, sendo uma das mais cultivadas no Nordeste e a oitava principal hortaliça exportada pelo país (Anuário Brasileiro de Hortaliças, 2014).

A batata-doce é cultivada em todas as regiões brasileiras, com maior presença nas regiões Sul, Sudeste e Nordeste. O Rio Grande do Sul é o maior produtor do país, contribuindo com cerca de 32% do total colhido no ano de 2012 (153,7 mil toneladas), seguido pelos estados Paraná (47,1 mil toneladas), São

Paulo (41,4 mil toneladas), Sergipe (40,6 mil toneladas) e Minas Gerais (37,5 mil toneladas) (Anuário Brasileiro de Hortaliças, 2014).

O cultivo da batata-doce é amplamente difundido devido as suas vantagens como o baixo custo de produção, a facilidade de cultivo, a rusticidade, a ampla adaptação, a colheita prolongada, o ciclo curto e a proteção do solo contra a erosão, além da função social, que contribui para manter o produtor rural no campo (Souza, 2000, Loebenstein, 2009, Zhang et al., 2009). Na África e na Ásia, milhares de pessoas dependem da batata-doce para a segurança alimentar (Loebenstein, 2009, Zhang et al., 2009).

A produção brasileira de batata-doce teve um forte declínio nos últimos 30 a 40 anos (passando de 1,5 milhão de toneladas em 1975 para apenas 505 mil toneladas em 2013), em função da diminuição das áreas de cultivo, devido principalmente ao êxodo rural (Anuário Brasileiro de Hortaliças, 2014). Por esta razão grande parte do consumo de batata-doce foi substituída por hortaliças mais atrativas e de preparo mais fácil, como tomate, alface, pimentão e pepino (Silva et al., 2004).

Além do sabor agradável, a batata-doce possui elevado valor nutritivo, participando do suprimento de calorias na alimentação humana. É uma excelente fonte de carotenoides, vitaminas A, B, C e E, além de potássio, ferro e cálcio. A batata-doce pode ser utilizada na culinária doméstica ou como matéria-prima em processos industriais, na obtenção de doces, farinhas, flocos e fécula (Roesler et al., 2008). A raiz pode ser consumida assada, cozida ou frita (Murilo, 1990).

Essa olerícola também possui potencial terapêutico, sendo utilizada em práticas de medicina tradicional para a diabetes mellitus tipo 2. Pesquisas em modelos animais e humanos sugerem um possível papel da batata-doce no controle glicêmico (Ooi e Loke, 2012). A variedade roxa possui elevado teor de betacaroteno, uma substância antiviral, anticancerígena e antioxidante, que é convertida pelo organismo em vitamina A, um antioxidante que ajuda a combater o câncer (Li et al., 2013). A batata-doce, também, apresenta alto teor de vitamina E, essencial para a pele. As fibras desse vegetal, que se concentram especialmente na casca, ajudam na digestão e na redução do colesterol (Guedes, 2004).

Além dos aspectos mencionados, o cultivo de batata-doce apresenta potencial para a produção de biomassa voltada para a fabricação de

biocombustível, o que pode levar ao fortalecimento da agricultura familiar. Comparada a outras culturas como arroz, banana, milho e sorgo, a batata-doce tem se mostrado mais eficiente em quantidade de energia líquida gerada, tanto por unidade de área como por unidade de tempo. Isso ocorre devido à grande produção de raízes em um ciclo relativamente curto, com baixo custo, durante todo o ano. Cerca de oito toneladas de batata-doce fresca podem produzir uma tonelada de bioetanol. A produção de etanol a partir da batata-doce não compete com os biocombustíveis derivados da cana-de-açúcar ou do milho, mas pode se complementar a eles (Silva, 2002, Qiu et al., 2010, Ferrari et al., 2013, Wang et al., 2013, Zhang et al., 2013). A primeira usina de biocombustível a partir da batata-doce foi implantada em Tangará da Serra, no Mato Grosso, no ano de 2013. Iniciativas visando à geração de etanol de batata-doce estão sendo desenvolvidas nos Estados do Rio Grande do Sul, do Paraná e do Tocantins (Anuário Brasileiro de Hortaliças, 2014).

3.3. A importância da conservação do germoplasma de batata-doce

O êxodo rural, em consequência da modernização da agricultura, e as mudanças nos hábitos alimentares, provocada pelo surgimento de novas opções de consumo, têm contribuído para a perda da diversidade genética de genótipos de batata-doce, que tradicionalmente eram mantidos por agricultores (Cardoso et al., 2011).

Vários são os motivos associados à erosão genética que vão desde o abandono das lavouras até a substituição da variedade tradicional por híbridos e outros genótipos comerciais. No caso do abandono das lavouras, as motivações incluem os baixos preços pagos pelo mercado, a falta de estradas adequadas para o escoamento da produção e também o fato de os produtores rurais não incentivarem seus filhos a continuarem na atividade rural, preferindo que eles deixem o campo e passem a morar nas cidades. Aliada à substituição das variedades locais, está ocorrendo a perda dos saberes associados (erosão cultural), comprometendo a agrobiodiversidade na região (Cardoso et al., 2011).

Os recursos genéticos vegetais constituem a base da cadeia alimentar do homem, além de atender inúmeras de suas necessidades como combustível, vestuário, medicamentos e habitação. Conservar estes recursos em condições

ideais, mantendo sua integridade física e genética, é garantir os genes para a sustentabilidade de trabalhos de melhoramento de plantas e assegurar o alimento das próximas gerações.

Para evitar a perda da diversidade é fundamental realizar a coleta de germoplasma para conservação *ex situ*, em condições apropriadas, de forma que estejam disponíveis para a utilização futura (Austin, 1988, Huamán e De La Puente, 1988, Sá et al., 2011). Neste sentido, esforços estão sendo realizados por alguns programas nacionais e por instituições internacionais para coletar e conservar o germoplasma de batata-doce (Huamán e De La Puente, 1988).

Moulin et al. (2012) caracterizaram os riscos e a efetiva perda de genótipos de batata-doce, nas comunidades, junto a pequenos agricultores da região do Norte do Estado do Rio de Janeiro. A pesquisa incluiu um levantamento sobre o perfil socioeconômico dos agricultores familiares, a coleta de cultivares tradicionais mantidas por essas famílias, a caracterização morfológica, agrônômica e molecular dos acessos coletados e a quantificação da divergência genética entre eles.

3.4. A caracterização do germoplasma de batata-doce

A caracterização morfológica de um banco de germoplasma é normalmente uma das formas mais acessíveis de quantificar sua diversidade genética e vem sendo bastante utilizada, devido a diversas vantagens, como a praticidade, o baixo custo e a facilidade no manejo dos dados, a depender do número de acessos a ser trabalhado e dos tipos das características avaliadas (Rabbani et al., 1998; Ritschel et al., 2002). A caracterização morfológica disponibiliza informações sobre o germoplasma conservado, dispondo-o de uma forma mais efetiva para utilização. O valor do germoplasma aumenta à medida que este se torna conhecido e documentado (Painting et al., 1995).

Para batata-doce (*Ipomoea batatas* L. Lam), uma espécie cultivada em todo território nacional, alguns estudos utilizando marcadores morfológicos estão disponíveis na literatura, tais como Moulin et al. (2012) que caracterizaram 46 acessos de batata-doce, coletados na região Norte do Estado do Rio de Janeiro, utilizando oito descritores de parte aérea e seis de raiz; Veasey et al. (2007) que caracterizaram 74 acessos de batata-doce, coletados na região do Vale do

Ribeira, utilizando 14 características morfológicas e agronômicas; Chávez et al. (2006) que avaliaram 52 variedades locais da Colômbia utilizando 18 descritores da parte aérea e raiz; e Daros et al. (2002) que avaliaram 14 acessos de batata-doce com base em um total de 20 descritores.

O estudo da diversidade genética entre acessos de uma cultura, além de possibilitar a identificação de materiais genéticos muito próximos ou duplicados, indica aqueles genótipos mais distantes geneticamente, os quais poderão ser recomendados para futuros programas de policruzamentos no desenvolvimento de novas cultivares (Scapim et al., 1999).

Na avaliação da diversidade genética, destacam-se ainda, os marcadores moleculares, pois, quando comparados com outros tipos de marcadores, apresentam maior número de locos polimórficos, o que permite a distinção entre acessos, mesmo com morfologia similar. Algumas complicações, como o efeito ambiental, tempo necessário para avaliações, herança poligênica, entre outras, podem ser evitadas pelo uso da análise direta do genótipo por meio de marcadores moleculares de DNA (Carvalho et al., 2008).

Os estudos com marcadores moleculares fazem contribuições significativas para compreensão da diversidade genética (Spooner et al., 2005). Com o uso de marcadores moleculares, pode-se gerar uma grande quantidade de informações que, associada às características fenotípicas, permitem o agrupamento de genótipos e o planejamento de cruzamentos de forma rápida e muito eficiente (Ferreira e Grattapaglia, 1998).

Uma metodologia utilizada são os marcadores ISSR, desenvolvidos a partir dos SSR. Análises de ISSR envolvem amplificações do DNA genômico por PCR, utilizando sequências repetidas de di-nucleotídeo, tri-nucleotídeo, tetra-nucleotídeos ou pentanucleotídeos (Wolfe et al., 1998). O iniciador usado pode estar não ancorado ou ancorado, esta última corresponde à condição mais frequente, com uma a quatro bases ancoradas na posição 5' e 3' do iniciador, dentro de sequências flanqueadas (Reddy et al., 2002).

O ISSR utiliza iniciadores longos, geralmente de 16-25 pb, para amplificar principalmente entre sequências de SSR de diferentes tamanhos. Este marcador é composto por regiões entre dois microssatélites e não requer a informação da sequência do iniciador, e a sua segregação coincide com a herança mendeliana dominante, podendo esta ser considerada uma característica desvantajosa da

técnica. Entretanto, este método possui alta reprodutibilidade, grande flexibilidade, uso de pequenas quantidades de DNA e alto nível de polimorfismo (Joshi et al., 2000). O ISSR possibilita a determinação da diversidade inter e intra-específica, confecção de mapas genéticos, estudos filogenéticos, além de caracterização e avaliação do germoplasma (Zietkiewicz et al., 1994; Ratnaparkhe, 1998; Huang e Sun, 2000).

Poucos estudos com marcadores ISSR foram relatados até o momento com *I.batatas*. Moulin et al. (2012) utilizaram 19 marcadores ISSR para estimar a diversidade genética entre 82 acessos de *Ipomoea* coletados na região Norte do Estado do Rio de Janeiro (81 acessos de batata-doce e um acesso de *Ipomoea pescaprae*), gerando 135 marcas polimórficas. Considerando custos, viabilidade, estrutura de laboratório e disponibilidade de pessoal treinado, a técnica pode ser recomendada para a caracterização de recursos genéticos de batata-doce.

No estudo de Hu et al. (2003), oito iniciadores polimórficos foram selecionados para estimar a diversidade genética entre 34 acessos de *Ipomoea* (28 acessos de batata-doce e seis acessos de espécies silvestres), gerando 81 marcas polimórficas. Os acessos foram agrupados em três grupos maiores, com o objetivo de determinar a relação filogenética entre as espécies. Constatou-se que marcadores ISSR são eficientes para a obtenção de polimorfismo e posterior obtenção de mapas de ligação relacionando a batata-doce cultivada a espécies silvestres.

3.5. As formas de conservação de germoplasma vegetal

Há dois métodos básicos para a conservação de germoplasma: conservação *in situ* e *ex situ*. A conservação *in situ* é a manutenção e recuperação de populações viáveis de espécies em seu ambiente natural e, para espécies domesticadas ou cultivadas, nos ambientes onde tenham desenvolvido suas propriedades características. Os métodos de conservação *ex situ* consistem em manter as espécies em cultivo fora de seus habitats, em condições artificiais (Nick et al., 2010).

A principal forma de conservação praticada pelos bancos de germoplasma é a *ex situ*, uma vez que nestes locais normalmente concentram-se recursos de diversas partes do globo. Praticamente, todas as espécies podem

ser conservadas *ex situ*, desde que seja possível manter a frequência alélica, geração após geração. A principal crítica feita a este tipo de conservação é que desta forma a seleção natural fica impossibilitada de atuar, pois os genótipos não sofrem o processo de evolução normal em função das alterações das condições ambientais (Nick et al., 2010).

3.6. Os bancos de germoplasma de batata-doce no Brasil e no mundo

O número de bancos de germoplasma no mundo inteiro ultrapassa 1.750, com mais de 7,4 milhões de acessos armazenados em coleções mundiais *ex situ* (FAO, 2011). Cerca de 710 mil acessos de cereais, leguminosas, tubérculos, florestais e outras culturas são armazenados nas coleções internacionais do CGIAR (CGIAR, 2015).

O maior banco de germoplasma de batata-doce fica localizado no CTCRI, na Índia. Este banco possui 3073 acessos, sendo 70% variedades locais, mantidos em condições de campo. Já a Indonésia detém a segunda maior coleção, mantida por diferentes instituições, com 1155 acessos, sendo que 200 destes são mantidos *in vitro*, e os demais em campo. A China possui uma coleção com 700 acessos mantidos no campo, e o Sri Lanka mantém um banco de germoplasma com 135 acessos de batata-doce, também mantidos no campo (Fuglie et al., 1999).

No Brasil, a EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, tornou-se em 2008 o quarto maior banco de germoplasma do mundo (EMBRAPA, 2008), com cerca de 200 mil acessos de diferentes culturas, armazenados nos 138 bancos ativos de germoplasma (EMBRAPA, 2010). A Embrapa possui o maior banco ativo de germoplasma de batata-doce do Brasil, com cerca de 600 acessos na Embrapa Hortaliças e 50 acessos na Embrapa Clima Temperado, disponíveis para uso em programas de pesquisa (EMBRAPA, 2015).

3.7. A conservação *in vitro* de germoplasma de batata-doce

A manutenção de coleções *in vitro* é um método alternativo para conservação de germoplasma, indicado especialmente para espécies propagadas

vegetativamente, como é o caso da batata-doce (Roca et al., 1991). A conservação de plantas *in vitro* é baseada no cultivo das coleções em laboratórios, a partir da técnica de cultura de tecidos (George e De Klerk, 2008).

A conservação *in vitro* apresenta diversas vantagens sobre o processo de conservação de germoplasma no campo, dentre elas destacam-se: a manutenção de um grande número de acessos num pequeno espaço físico, material vegetal asséptico, livre de patógenos e, portanto, mais produtivo; material livre das intempéries e riscos que existem no campo, como ataque de pragas e doenças, enchentes, secas ou perda de identificação, além da redução dos custos financeiros, entre outros (Dorion et al., 1991, Withers e Williams, 1998, Cid, 2001).

Assim, o banco de germoplasma *in vitro* é um meio bastante atrativo, desde que se tenha uma estrutura física adequada e mão de obra qualificada (Withers, 1991). Uma das possíveis limitações desta conservação é a variação somaclonal. Esta variação genética ocorre entre indivíduos regenerados da cultura de tecidos como resultado do processo de cultivo *in vitro*. Entre outras limitações da conservação *in vitro* estão: a quantidade de material disponível para o uso, o risco de contaminações (tanto na introdução do material *in vitro*, como nos subcultivos) e a periodicidade entre os subcultivos das plantas (Borém e Miranda, 2009).

A aplicação de técnicas biotecnológicas de cultura de tecidos tem permitido a formação e a conservação por longos períodos de tempo de coleções de germoplasma de várias espécies de plantas, como a oliveira (*Olea europaea* L.) e a bananeira (*Musa* spp.), possibilitando, assim, que o material vegetal de interesse se torne disponível para recuperação e possível utilização no futuro (Lambardi et al., 2002, INIBAP, 2006).

A conservação *in vitro* de espécies vegetais pode ser realizada, de maneira geral, a partir de dois sistemas: o sistema de crescimento lento ou cultivo mínimo e o sistema de criopreservação. Na técnica de cultivo mínimo, o metabolismo das plantas pode ser reduzido pela modificação nas condições químicas do meio de cultivo (sem afetar sua viabilidade), pela indução de estresse osmótico, redução da intensidade de luz ou temperatura, acréscimo de reguladores de crescimento ou diminuindo a concentração dos componentes salinos e orgânicos do meio de cultura (Roca et al., 1991, Withers e Williams, 1998, Fortes e Pereira, 2001, Faria et al., 2006, Sá et al., 2011).

O cultivo mínimo tem sido utilizado com sucesso, principalmente para a conservação de ápices meristemáticos de muitas espécies. O objetivo é desacelerar o crescimento e aumentar ao máximo o intervalo entre os subcultivos ou estendê-los indefinidamente, pois desta forma se reduz a mão de obra e o espaço necessário, além de proporcionar ao melhorista acesso imediato a todo o germoplasma da coleção (Roca et al., 1991, George, 1993, Tahtamouni et al., 2001, Lemos et al., 2002, Hao e Deng, 2003, Islam et al., 2003, Sarwar e Siddiqui, 2004, Amaral, 2005, Kovalchuk et al., 2009, Santos et al., 2011).

Para a batata-doce, o subcultivo é feito, em média, a cada 90 dias, sendo este um dos aspectos que mais consomem tempo e capital na manutenção da coleção *in vitro* (Teixeira e Nascimento, 1999).

Vettorazzi (2013) determinou um protocolo para conservação *in vitro* de 30 acessos de batata-doce coletados na região Norte do Estado do Rio de Janeiro, visando aumentar o período entre os subcultivos para esta espécie. Foi avaliada a viabilidade das mudas de batata-doce aclimatizadas provenientes da conservação *in vitro* por cultivo mínimo e implantado um banco de germoplasma de batata-doce *in vitro* na UENF. Para o cultivo mínimo *in vitro* dos acessos implantados recomendou-se a utilização de meio MS (Murashige e Skoog, 1962) com 100% da concentração de sais minerais e 0,06 mol L⁻¹ de sacarose, à temperatura de 27±2°C, com subcultivos a cada 180 dias. Todos os acessos apresentaram 100% de sobrevivência, após o cultivo mínimo *in vitro*, durante a aclimatização.

Já a criopreservação é a única técnica disponível para a conservação de germoplasma por longos períodos de tempo de plantas que são propagadas vegetativamente (Santos e Salomão, 2010), como é o caso da batata-doce.

3.8. A Criopreservação de germoplasma vegetal

A criopreservação é um método baseado na manutenção do material vegetal em condição de redução da divisão celular ou de metabolismo zero. Para isso, os materiais vegetais dos mais variados tipos (sementes, gemas apicais, embriões somáticos ou zigóticos, e pólen) são submetidos a temperaturas ultrabaixas, geralmente em NL a -196°C, ou em sua fase de vapor a -150°C, na presença ou ausência de substâncias crioprotetoras (Engelmann, 2004).

A criopreservação foi desenvolvida para evitar as alterações genéticas que podem ocorrer durante a estocagem de culturas *in vitro* por longos períodos (Engelmann, 2004).

A conservação de germoplasma em um banco criogênico é mais barata que os outros sistemas disponíveis *in vitro*, como a conservação *in vitro* por cultivo mínimo. Nele, o material criopreservado necessita de pequeno espaço para armazenamento, requer pouca manutenção, dispensando subcultivos e a variação somaclonal é reduzida (Santos, 2004). A utilização do banco criogênico permite o armazenamento do material biológico por tempo indefinido, com baixo risco ao material conservado, uma vez que o metabolismo celular é tão reduzido que a deterioração biológica é praticamente paralisada. A estabilidade genética e as características fenotípicas do material são mantidas (Engelmann et al., 2008).

A criopreservação pode ser utilizada com sucesso na conservação de germoplasma de um amplo número de culturas comercialmente importantes, como a mandioca, o arroz, a cana-de-açúcar, a banana e o morango (Razdan, 2003).

Independente da técnica utilizada, de modo geral, o processo de criopreservação é constituído basicamente de cinco fases distintas: a) congelamento; b) armazenamento; c) descongelamento; d) restabelecimento dos explantes criopreservados; e) determinação da viabilidade.

Os métodos de criopreservação são diferentes e incluem os métodos convencionais ou clássicos baseados na desidratação induzida pelo congelamento das células (mais dispendiosos em equipamentos), como também, métodos baseados na vitrificação (Sakai et al., 2008).

As novas técnicas de criopreservação incluem: encapsulamento-desidratação, vitrificação, encapsulamento-vitrificação, desidratação, pré-crescimento, pré-crescimento-desidratação e vitrificação em gotículas (Engelmann e Dussert, 2013).

3.8.1. Encapsulamento-Desidratação

Encapsulamento-desidratação é baseada na tecnologia desenvolvida para a produção de sementes sintéticas. Os explantes são encapsulados em gotas de alginato de cálcio, pré-cultivados em meio líquido suplementado com

sacarose durante 1-7 dias, parcialmente dessecados no fluxo laminar de ar ou em sílica gel até um teor de água de cerca de 20% (base da massa da matéria fresca), em seguida, as amostras são arrefecidas rapidamente em NL. Os explantes criopreservados são descongelados em temperatura ambiente (descongelamento lento) ou em banho-maria (descongelamento rápido) e, em seguida, são colocados em meio de recuperação (Gonzalez-Arno e Engelmann, 2006, Engelmann et al., 2008).

A sobrevivência é alta e a recuperação do crescimento das amostras criopreservadas é geralmente rápida e direta, sem a formação de calos. Esta técnica é de fácil manuseio, podendo ser utilizada para o tratamento simultâneo de um grande número de amostras. Nenhum equipamento especial é necessário e o procedimento de descongelamento é simples. O único agente crioprotetor utilizado é a sacarose, evitando, assim, o efeito tóxico de outros agentes crioprotetores, tais como o PVS2 (Engelmann et al., 2008).

A técnica de encapsulamento-desidratação já foi aplicada com sucesso para mais de 70 espécies diferentes de plantas, dentre elas, espécies de clima temperado, incluindo brotos de eucalipto e uva e embriões somáticos de cenoura e espécies de clima tropical, como ápices meristemáticos de mandioca, cana de açúcar e café. A desvantagem da técnica é o tempo extenso envolvido na etapa da desidratação, além disso, algumas espécies não toleram altas concentrações de sacarose (Engelmann et al., 2008).

3.8.2. Vitrificação

O método preferível para a criopreservação é a vitrificação, por ser de fácil condução, apresentar alta porcentagem de restabelecimento do material vegetal, não requerer o uso de equipamentos programáveis ou ultrafreezers (-80°C) considerados caros. O uso de soluções crioprotetoras altamente concentradas permite a solidificação das estruturas de forma que se mantenham viscosas e estáveis e evita a formação de cristais de gelo (Engelmann, 2004). Além disso, a criopreservação por vitrificação tem provado ser uma eficiente técnica para a eliminação de patógenos de plantas (Ding et al., 2008, Wang e Valkonen, 2009).

De modo geral, este procedimento consiste nos seguintes passos (Figura 1):

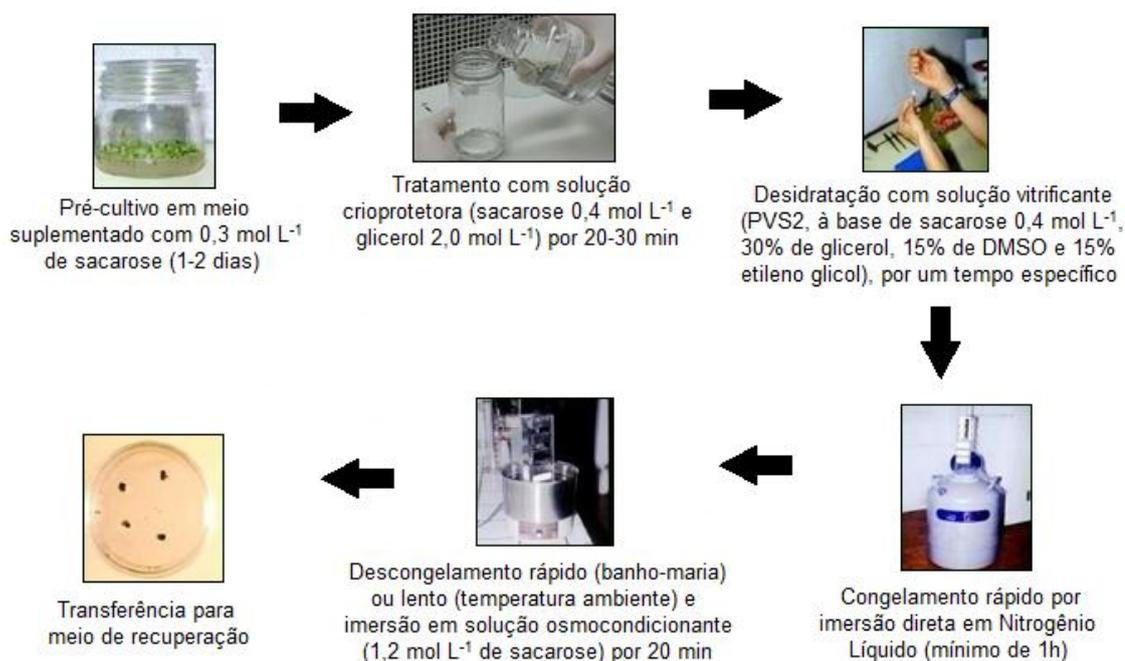


Figura 1. Protocolo de criopreservação pelo método de vitrificação.

Essa técnica já foi utilizada com sucesso para armazenamento em NL de mais de 200 espécies e variedades, dentre elas: abacaxi, álamo, alho, ameixa, amendoim, amora, arroz, aspargo, banana, batata-doce, batata, beterraba, caqui, cenoura, centeio, cravo, crisântemo, ginseng, groselha, hortelã, inhame, jaca, maçã, mandioca, uva, e outros (Sakai et al., 2008).

3.8.3. Encapsulamento-Vitrificação

Encapsulamento-vitrificação é uma combinação de encapsulamento-desidratação e de vitrificação. As amostras são encapsuladas em gotas de alginato (contendo 2-3% de alginato de cálcio, 2 mol L^{-1} de glicerol e $0,4 \text{ mol L}^{-1}$ de sacarose em meio de cultura sem cálcio), e em seguida, tratado seguindo um protocolo padrão de vitrificação, como descrito anteriormente. O principal interesse desta técnica é que os explantes encapsulados não estão em contato direto com as soluções de vitrificação altamente concentradas, diminuindo assim a sua toxicidade, além disso, o tempo necessário para a desidratação é reduzido. A técnica de encapsulamento-vitrificação é, ainda, de fácil manuseio e pode ser

utilizada para o tratamento simultâneo de um grande número de amostras (Sakai e Engelmann, 2007, Sakai et al., 2008).

Este método foi aplicado com sucesso em ápices meristemáticos de algumas espécies como: abacaxi, ameixa, batata-inglesa, batata-doce, caqui, cenoura, cravo, framboesa, hortelã, laranja-azedada, lírio, maçã, mandioca, morango, violeta e embriões somáticos de cenoura e oliveira (Sakai et al., 2008).

3.8.4. Desidratação

A desidratação é o processo mais simples de criopreservação. Ele consiste em desidratar explantes (em cabine de fluxo laminar de ar, sílica gel ou soluções salinas saturadas), em seguida, arrefecê-los rapidamente por imersão direta em NL. Esta técnica é usada principalmente em sementes, embriões zigóticos ou eixos embrionários extraídos de sementes. Em geral, boa sobrevivência é obtida quando as amostras são criopreservadas entre 10% e 20% de teor de água (Engelmann, 1997).

3.8.5. Pré-Crescimento

A técnica de pré-crescimento consiste em cultivar as amostras em meio com crioprotetores (geralmente sacarose, podendo ser substituída por frutose ou glicose), seguida de arrefecimento rápido por imersão direta em NL. A técnica de pré-crescimento já foi testada em ápices meristemáticos de pelo menos 36 acessos de banana, de oito diferentes grupos genômicos, podendo ser aplicada na maioria dos acessos (Panis et al., 2002).

3.8.6. Pré-Crescimento-Desidratação

No protocolo de pré-crescimento-desidratação, os explantes pré-cultivados na presença de crioprotetores, são desidratados em gabinete de fluxo laminar de ar ou com sílica gel e em seguida rapidamente criopreservados. Este método pode ser aplicado para vários explantes de diferentes espécies, incluindo os segmentos de caule de aspargos (Uragami et al., 1990), os embriões somáticos de óleo de palma (Dumet et al., 1993), embriões zigóticos de coco

(Assy-Bah e Engelmann, 1992) e embriões somáticos de coentro (Popova et al., 2010).

3.8.7. Vitrificação em gotículas

A vitrificação em gotículas é uma modificação do método de vitrificação. O termo 'gotículas' refere-se às microgotas do crioprotetor (cerca de 5 a 10 μL de PVS2) que são colocadas em uma faixa de folha de alumínio, na qual os explantes são congelados em NL. As folhas de alumínio tornam-se um local para fácil alocação de grande quantidade de material, devido ao pequeno volume de meio crioprotetor que é utilizado. Posteriormente, os explantes são descongelados em meio líquido contendo $1,2 \text{ mol L}^{-1}$ de sacarose. A folha de alumínio é um bom condutor de calor e muito importante para o reaquecimento das amostras, etapa que deverá ser rápida a fim de evitar o efeito danoso da formação de cristais de gelo que pode ocorrer durante esta fase (Sakai, 2007, Engelmann, 2011).

Esta técnica é a mais recente, no entanto o número de espécies com resultados promissores é crescente, dentre elas: ápices meristemáticos de alho, banana, batata-doce, batata, chicória, crisântemo, inhame, morango, tomilho, tâmara e embriões somáticos de cana-de-açúcar (Sakai, 2007).

3.9. A criopreservação de germoplasma de batata-doce

Em relação a outras raízes e tubérculos, a batata-doce, é uma planta mais difícil de criopreservar, por ser uma cultura tropical sensível à desidratação por PVS2 e não possuir nenhuma adaptação ao frio (Takagi et al., 1998). Os primeiros resultados nesta espécie foram publicados por Towill e Jarret (1992) (Tabela 1).

As técnicas Desidratação, Pré-Crescimento e Pré-Crescimento-Desidratação ainda não foram relatadas na criopreservação de germoplasma de batata-doce.

Tabela 1. Criopreservação de germoplasma de batata-doce.

Técnica Utilizada	Tamanho dos Explantes	Taxa de Sobrevivência	Referência
Vitrificação	1 mm	23%	Schnabel-Preikstas et al. (1992)
	-	47%	Plessis e Steponkus (1996)
	0,5-0,7 mm	26%	Golmirzaie et al. (2000)
Vitrificação em gotículas	0,5-0,7 mm	64%	Towill e Jarrett (1992)
	0,5-1 mm	66%	Pennycooke e Towill (2000)
	0,5-1 mm	93%	Pennycooke e Towill (2001)
Encapsulamento-Desidratação	0,5-1 mm	67%	Pennycooke e Towill (2001)
Encapsulamento-Vitrificação	1 mm	94%	Hirai e Sakai (2003)
	1-1,5 mm	85%	Wang e Valkonen (2008)

3.9.1. Vitrificação em batata-doce

Schnabel-Preikstas et al. (1992) foram os primeiros a utilizar a técnica de vitrificação para a criopreservação de batata-doce. Utilizando um meio de recuperação dos explantes composto pelos sais minerais do MS (Murashige e Skoog, 1962) contendo AIA e KIN, os autores conseguiram apenas 23% de sobrevivência dos explantes.

Ao modificarem o meio de recuperação dos explantes por um meio composto por sais minerais do meio MS suplementado com KIN e GA₃, Plessis e Steponkus (1996) obtiveram 47% de sobrevivência.

Utilizando um meio de recuperação modificado composto de sais minerais do MS contendo 2 mg L⁻¹ pantotenato de cálcio, 100 mg L⁻¹ de arginina, 200 mg L⁻¹ de ácido ascórbico, 20 mg L⁻¹ de putrescina, 20 mg L⁻¹ de GA₃, 5 mL L⁻¹ de água de coco e 0,09 mol L⁻¹ de sacarose, Golmirzaie et al. (2000) obtiveram 26% de sobrevivência.

Até o momento, poucos trabalhos foram publicados sobre criopreservação de batata-doce, utilizando a técnica de vitrificação. Duas desvantagens principais estão envolvidas na técnica de vitrificação: a manipulação de pequenos explantes não encapsulados é problemática e a desidratação com solução de vitrificação requer período de tempo muito preciso e curto, o que é difícil de controlar. Nesta técnica é difícil tratar simultaneamente um grande número de amostras (Feng et al., 2011).

3.9.2. Vitrificação em gotículas em batata-doce

A criopreservação de batata-doce pela técnica de vitrificação por gotículas foi primeiramente relatada por Towill e Jarret (1992). Ápices meristemáticos com 0,5-0,7 mm de comprimento foram excisados de gemas axilares de plantas matrizes em cultivo *in vitro*, com 8 a 12 semanas de idade e, em seguida, submetidos à criopreservação. No entanto, os resultados foram pouco reprodutíveis, pois houve grande variação nas porcentagens de sobrevivência entre as repetições dos tratamentos (0-64%).

Com base no protocolo proposto por Towill e Jarret (1992), Pennycooke e Towill (2000) desenvolveram um processo de vitrificação em gotículas modificado. Os ápices meristemáticos com 0,5-1,0 mm de comprimento foram excisados de plantas em cultivo *in vitro*, com 4 a 8 semanas de idade. Os ápices foram pré-cultivados em 0,3 mol L⁻¹ de sacarose por 24 horas. Em seguida, foram colocados em uma solução que consiste em 2 mol L⁻¹ de glicerol e 0,4 mol L⁻¹ de sacarose no meio de cultura contendo os sais minerais do MS por uma hora e desidratados por exposição ao PVS2 por 16 minutos. Após a desidratação, gotículas de 10 µL de PVS2 foram colocadas sobre os explantes em tiras finas (40 × 2 mm) de papel alumínio estéril e imersas no NL. O descongelamento foi realizado em meio líquido MS contendo sacarose 1,2 mol L⁻¹ durante 20 min e, em seguida, os explantes foram pós-cultivados num meio MS de recuperação contendo 0,2 mg L⁻¹ de ANA, 1,1 mg L⁻¹ de BA e 0,2 mg L⁻¹ de KIN. Com alguns parâmetros otimizados, a sobrevivência após a criopreservação foi de aproximadamente 66%, a formação de calos foi pequena e os resultados foram reprodutíveis.

Pennycooke e Towill (2001) demonstraram que a técnica de vitrificação por gotículas ainda poderia ser melhorada, quando os explantes descongelados são colocados em meio sem NH₄⁺ nos primeiros cinco dias após a criopreservação e, em seguida, transferidos para meio de recuperação contendo NH₄⁺. A taxa de sobrevivência aumentou para 93%. O NH₄⁺ é tóxico para as células congeladas e a sobrevivência dos explantes pode ser melhorada pela exclusão do NH₄⁺ do meio nos primeiros dias.

A técnica de vitrificação por gotículas pode ser empregada para preservação em longo prazo de germoplasma de batata, a exemplo do que é realizado com 446 acessos no Centro Internacional da Batata (CIP), no Peru

(Panta et al., 2006) e banana (306 acessos) na Universidade Katholieke, Leuven, Bélgica (Panis et al., 2005). Esta técnica pode ser considerada promissora no armazenamento em longo prazo de batata-doce, porém estudos adicionais ainda são necessários para testar suas aplicações nos diferentes genótipos de batata-doce.

3.9.3. Encapsulamento-Desidratação em batata-doce

Pennycooke e Towill (2001) relataram a criopreservação de batata-doce por encapsulamento-desidratação. Ápices meristemáticos com 0,5-1,0 mm de comprimento foram excisados de plantas com 4-8 semanas sob cultivo *in vitro* e encapsulados em gotas de 4-5 mm de diâmetro. Os encapsulados foram pré-cultivados em meio MS líquido contendo concentrações crescentes de sacarose: 0,25 mol L⁻¹, 0,5 mol L⁻¹ e 0,75 mol L⁻¹, permanecendo 24 horas em cada concentração. Após a desidratação por secagem em fluxo laminar de ar para reduzir o teor de água para cerca de 18%, os encapsulados foram mergulhados diretamente em NL. Após o tempo de imersão em NL os encapsulados foram descongelados rapidamente em meio líquido contendo os sais minerais do MS, 0,06 mol L⁻¹ de sacarose e, em seguida, cultivadas em meio MS sólido sem NH₄⁺, contendo 0,2 mg L⁻¹ de ANA, 0,1 mg L⁻¹ de BA, 0,2 mg L⁻¹ de KINe 0,09 mol L⁻¹ de sacarose. Após dois dias de incubação no escuro, os ápices meristemáticos foram desencapsulados e cultivados à luz no mesmo meio durante três dias. Por fim, os explantes foram transferidos para meio MS normal para a recuperação. Com este protocolo, os autores conseguiram uma taxa de sobrevivência de 67% dos explantes.

Para a batata-doce, o encapsulamento-desidratação como técnica de criopreservação foi relatado apenas por Pennycooke e Towill (2001). Portanto, são necessários mais estudos sobre essa técnica nesta cultura (Feng et al., 2011).

3.9.4. Encapsulamento-Vitrificação em batata-doce

Hirai e Sakai (2003) foram os primeiros a descrever um protocolo de encapsulamento-vitrificação para criopreservação de batata-doce. Segmentos

nodais com cerca de 8 mm de comprimento contendo gemas foram removidos a partir de plantas mantidas *in vitro* e mantidos em meio contendo os sais minerais do MS, 0,09 mol L⁻¹ de sacarose, 1 g L⁻¹ de caseína hidrolizada e 0,5 mg L⁻¹ de BA. Após 10 a 14 dias de incubação, os ápices caulinares com um milímetro de comprimento foram retirados das gemas e encapsulados em gotas com 4 mm de diâmetro. Os encapsulados foram pré-incubados em meio líquido MS suplementado com 0,09 mol L⁻¹ de sacarose e 1 g L⁻¹ de caseína hidrolizada durante 24 horas num agitador rotativo (90 rpm), em seguida, transferidos para meio líquido MS contendo sacarose 0,3 mol L⁻¹ e pré-cultivados durante 16 h. Os encapsulados pré-cultivados foram colocados em meio MS líquido suplementado com 2 mol L⁻¹ de glicerol e 1,6 mol L⁻¹ de sacarose durante 3 horas num agitador rotativo (60 rpm), desidratados por exposição a PVS2 durante 60 min num agitador rotativo (60 rpm), seguido por imersão direta em NL. Os encapsulados criopreservados foram rapidamente aquecidos a 38 °C por 2 min, colocados em solução com 1,2 mol L⁻¹ de sacarose durante 20 min, colocados em meio de recuperação contendo os sais minerais do MS, 0,5 mg L⁻¹ de BA e 1 mg L⁻¹ de GA₃ por 7 dias e, em seguida, transferidos para um novo meio MS contendo 0,5 mg L⁻¹ de GA₃ sem o BA. Não houve a formação de calos e a sobrevivência foi superior a 80%.

O procedimento descrito por Sakai e Hirai (2003) foi testado para cultivares de batata-doce chinesas por Wang e Valkonen (2008) com algumas modificações no meio de recuperação. Resumidamente, foram utilizados ápices meristemáticos com 1,0-1,5 mm excisados de gemas axilares. Após o descongelamento, os explantes foram colocados em meio de recuperação, contendo os sais minerais do MS sem NH₄⁺ suplementado com 0,5 mg L⁻¹ de BA. Depois de 5-7 dias de cultivo, os explantes foram transferidos para meio MS suplementado com 5-10 mg L⁻¹ de GA₃. Com este protocolo modificado, os autores conseguiram uma sobrevivência de 85%.

Essa técnica já foi aplicada com sucesso para pelo menos nove genótipos de batata-doce, sendo considerada promissora para a criopreservação dessa cultura (Feng et al., 2011).

4. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Setor de Horticultura, do LFIT, do CCTA da UENF.

4.1. Material vegetal

O material vegetal utilizado para obtenção dos explantes e posterior formação da coleção de germoplasma foi obtido de plantas coletadas na região Norte do Estado do Rio de Janeiro por Moulin (2010) e cultivadas por 18 meses em vasos de 1,5 L em casa de vegetação na UAP da UENF (Tabela 2).

Tabela 2. Identificação dos acessos de batata-doce, com a respectiva identificação do acesso, nome comum, local de procedência, local de coleta e valores de latitude e longitude dos pontos de coleta (*Adaptado de Moulin, 2010*).

Identificação do Acesso	Nome comum	Local de Procedência	Local de coleta	Latitude	Longitude
UENF 1917	Três meses	Campos dos Goytacazes	Bajuru	21°54'27.3"	41°02'30.2"
UENF 1920	Comum	Campos dos Goytacazes	Baixa Grande	21°57'08.5"	41°08'19.2"
UENF 1922	Branca	Campos dos Goytacazes	Assentamento Zumbi IV	21°37'21.4"	41°13'12.2"
UENF 1923	Marron	Campos dos Goytacazes	Assentamento Zumbi IV	21°37'21.4"	41°13'12.2"
UENF 1925	Banha de Galinha	Campos dos Goytacazes	Campelo	21°39'01.7"	41°11'20.2"

Cont. Tabela 2

Identificação do Acesso	Nome comum	Local de Procedência	Local de coleta	Latitude	Longitude
UENF 1927	Comum	Espírito Santo	Rive	Desconhecida	Desconhecida
UENF 1928	Comum	Espírito Santo	Pedra Lisa	Desconhecida	Desconhecida
UENF 1931	Comum	Campos dos Goytacazes	Feira da roça da Record	21°46'30.8"	41°18'35.2"
UENF 1932	Comum	São João da Barra	Feira da roça da UENF	21°45'41.2"	41°17'26.7"
UENF 1935	Comum	São João da Barra	Mercado Municipal	21°45'29.3"	41°19'33.6"
UENF 1937	Comum	São João da Barra	Hortifruti João e Maria	21°46'31.6"	41°19'11.1"
UENF 1939	Comum	Cabo Frio	Supermercado Esperança	21°45'38.8"	41°19'41.5"
UENF 1940	Comum	Espírito Santo	Hortifruti Campos	21°44'23.6"	41°21'04.4"
UENF 1941	Comum	São João da Barra	Hortifruti das Palmeiras	21°44'56.7"	41°19'34.3"
UENF 1942	Comum	Espírito Santo	Supermercado Super Romão	21°43'25.5"	41°19'15.8"
UENF 1944	Comum	Espírito Santo	Supermercado Top de Linha	21°42'58.4"	41°19'26.9"
UENF 1945	Comum	Espírito Santo	Supermercado Super Líder	21°35'59.4"	41°19'01.2"
UENF 1947	Comum	Espírito Santo	Feira da roça da Rodoviária	21°45'43.2"	41°19'34.3"
UENF 1949	Vermelha	Campos dos Goytacazes	Projeto de Assentamento Che Guevara Barra do Açu	21°57'05.1"	41°03'45.7"
UENF 1953	Três meses	São João da Barra	Barra do Açu	21°56'03.2"	40°59'28.0"
UENF 1960	Rainha	Campos dos Goytacazes	Matutu	21°36'33.6"	41°18'59.2"
UENF 1962	Comum	Campos dos Goytacazes	Caixeta	21°38'08.6"	41°16'32.3"
UENF 1965	Penquinha	Campos dos Goytacazes	Projeto de Assentamento Zumbi IV	21°37'07.4"	41°13'23.4"
UENF 1969	Costa	São João da Barra	Rua Nova	21°43'48.1"	41°07'48.8"
UENF 1970	Penquinha	São João da Barra	Campo de Areia	21°54'28.8"	41°05'46.6"
UENF 1987	Rosada	Campos dos Goytacazes	Dores de Macabu	21°58'43.6"	41°29'42.2"
UENF 1988	Comum	Campos dos Goytacazes	Dores de Macabu	21°58'43.6"	41°29'42.2"
UENF 1990	Comum	Campos dos Goytacazes	Dores de Macabu	21°58'28.8"	41°29'19.0"
UENF 1994	'Princesa'	Brasília	Cultivar desenvolvida pela Embrapa	-	-
UENF 1997	'Brazlândia Rosada'	Brasília	Cultivar desenvolvida pela Embrapa	-	-

4.2. Caracterização morfológica dos acessos coletados

A caracterização morfológica foi realizada por meio de descritores de parte aérea e de raiz na UAP do CCTA da UENF.

Para a caracterização por descritores de parte aérea, foram analisados 30 acessos de batata-doce em pleno desenvolvimento, com 18 meses de idade, coletados na região Norte do Estado do Rio de Janeiro e pertencentes à coleção de germoplasma de batata-doce da UENF (Tabela 2). Os dados referentes às características de folhas e de pecíolos foram obtidos da parte central das ramas (folhas maduras), utilizando-se três folhas por planta e três plantas de cada acesso.

Os acessos foram caracterizados por descritores morfoagronômicos específicos para batata-doce, que estão disponíveis em *Bioversity International (Descriptors for sweet potato)*, propostos por Huamán (1991). Foram utilizados sete descritores qualitativos de parte aérea:

- a) Perfil geral da folha: 1 – redonda; 2 – reniforme; 3 – cordada; 4 – triangular; 5 – lanceolada; 6 – lobulada; 7 – quase dividida;
- b) Tipo de lóbulo da folha: 0 – ausência de lóbulos; 1 – muito superficiais; 3 – superficiais; 5 – moderados; 7 – profundos; 9 – muito profundos;
- c) Número de lóbulos da folha: obtido pela contagem dos lóbulos de cada folha;
- d) Forma do lóbulo central de cada folha: 1 – dentada; 2 – triangular; 3 – semicircular; 4 – semi-elíptica; 5 – elíptica; 6 – lanceolada; 7 – oblongo-lanceolada; 8 – linear, ou ausente;
- e) Cor da folha imatura - descrita pela coloração geral da folha, pela escala: 1 – verde amarelado; 2 – verde; 3 – verde com bordas roxas; 4 – verde cinzento; 5 – verde com nervuras roxas na face; 6 – ligeiramente roxa; 7 – muito roxa; 8 – verde na face superior e roxa na inferior; 9 – roxa em ambas as superfícies;
- f) Tamanho da folha - medida pelo tamanho das três folhas localizadas na seção mediana da planta, e classificada como: 3 – pequena (< 8 cm); 5 – média (8-15 cm); 7 – grande (16-25 cm); 9 – muito grande (> 25 cm);
- g) Pigmentação do pecíolo - descrita pela coloração geral do pecíolo, pela escala: 1 – verde; 2 – verde com segmentos roxos na extensão do pecíolo; 3 – verde com segmentos roxos próximos às folhas; 4 – verde com nervuras roxas nas duas extremidades; 5 – verde com manchas roxas ao longo do pecíolo; 6 – verde com

estrias roxas; 7 – roxa com segmentos verdes próximos às folhas; 8 – alguns pecíolos verdes, outros roxos; 9 – totalmente ou maioria roxo.

Para a caracterização por descritores de raiz, foram caracterizados e analisados 28 acessos. Os dados referentes às características das raízes foram obtidos de plantas com 18 meses de idade, sob cultivo em vasos de 1,5 L em casa de vegetação, utilizando-se três raízes de cada acesso. Para facilitar a caracterização das raízes, elas foram colhidas, etiquetadas e lavadas. Os acessos UENF 1969 e UENF 1988 não foram analisados, pois os mesmos não apresentaram raízes em casa de vegetação.

Os acessos foram caracterizados por descritores morfoagronômicos específicos para batata-doce, que estão disponíveis em *Bioversity International (Descriptors for sweet potato)*, propostos por Huamán (1991). Foram utilizados seis descritores qualitativos de raiz:

- a) Formato das raízes - determinado por meio de uma escala de notas: 1 – redonda; 2 – redonda elíptica; 3 – elíptica; 4 – oval; 5 – oboval; 6 – oblonga; 7 – oblonga longa; 8 – longa elíptica; e, 9 – longa irregular ou com curvaturas;
- b) Defeitos de superfície - determinado por meio de uma escala de notas: 0 – ausente; 1 – pele semelhante a jacaré; 2 – veias; 3 – constrições horizontais superficiais; 4 – constrições horizontais profundas; 5 – fendas horizontais superficiais; 6 – fendas horizontais profundas; e, 7 – constrições e fendas profundas;
- c) Cor da pele – determinado por meio de uma escala de notas: 1 – branca; 2 – creme; 3 – amarela; 4 – laranja; 5 – marrom alaranjado; 6 – rosa; 7 – vermelha; 8 – vermelha arroxeada; e, 9 – roxa escura;
- d) Intensidade da cor da pele – determinado por meio de uma escala de notas: 1 – pálida; 2 – intermediária; e, 3 – escura;
- e) Cor da polpa – determinado por meio de uma escala de notas: 1 – branca; 2 – creme; 3 – creme escura; 4 – amarelo pálida 5 – amarelo-escura 6 – laranja pálida; 7 – laranja intermediária; 8 – laranja escura; e, 9 – pigmentado fortemente com antocianinas;
- f) Cor secundária da polpa – determinado por meio de uma escala de notas: 0 – ausente; 1 – branca; 2 – creme; 3 – amarelo; 4 – laranja; 5 – rosa; 6 – vermelha; 7 – vermelha arroxeada; 8 – roxa; e, 9 – roxa escura;

As características foram observadas, e suas notas, registradas em uma planilha. Os dados qualitativos de parte aérea e de raiz foram analisados com auxílio do programa Genes (Cruz, 2013) para obtenção das matrizes de dissimilaridade, e pelo programa R (<http://www.rproject.org>) para obtenção dos dendrogramas. Para análise das características qualitativas de parte aérea e de raiz, utilizou-se a distância de Cole-Rodgers (1997) e os dendrogramas foram obtidos com o método UPGMA.

4.3. Caracterização molecular dos acessos coletados

As análises moleculares foram realizadas no Setor de Melhoramento de Plantas, do LMGV do CCTA da UENF. Foram analisados 30 acessos de batata-doce do Norte do Estado do Rio de Janeiro, pertencentes à coleção de germoplasma da UENF (Tabela 2).

4.3.1. Preparo das amostras

Plantas provenientes de conservação *in vitro* mantidas em tubo de ensaio (25x150 mm) com 10 mL de meio de cultura, contendo sais minerais do meio MS (Murashige e Skoog, 1962) na concentração de 100% e sacarose 0,06 mol L⁻¹, incubadas em sala de cultivo à temperatura de 27±2°C, irradiância de 25 µmol m⁻² s⁻¹ e fotoperíodo de 16h durante 180 dias, foram coletadas nas primeiras horas da manhã. As plantas mantidas no escuro acumulam menos polifenóis (Sharma et al., 2008, Borges et al., 2009). As plantas correspondentes a cada acesso foram enroladas em papel alumínio, identificadas e imediatamente mergulhadas em NL para que não ocorresse a degradação do DNA. Em seguida, este material foi macerado em NL até formar um pó bastante fino.

4.3.2. Extração do DNA

Cerca de 100 mg de tecido macerado foram transferidos para tubos de 1,5 mL e imersos em NL para a extração de DNA, de acordo com o protocolo de Sharma et al. (2008), com modificações descritas a seguir. Foram adicionados aos tubos contendo as amostras 1 mL do tampão de extração pré-aquecido

contendo 2% de CTAB, 1,4% NaCl, 20 mmol L⁻¹ de EDTA, 100 mmol L⁻¹ Tris-HCl (pH 8,0), 1% de PVP e 2% β- mercaptoetanol, estes dois últimos necessários para remoção dos compostos fenólicos. Em seguida, foram adicionados 10 µL de proteinase K (10 mg mL⁻¹) em cada uma das amostras. Este material foi incubado a 37°C por 30 minutos e agitado suavemente a cada 10 minutos e, posteriormente, incubado a 65°C por mais 40 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm durante 5 minutos. O sobrenadante (cerca de 700 µL) foi transferido para um novo tubo devidamente identificado e adicionado igual volume de clorofórmio - álcool isoamílico (24:1), para efetuar-se a desproteinização. Este material sofreu suaves inversões durante aproximadamente 10 minutos até ficar turvo. A fase orgânica foi separada por centrifugação, a 14.000 rpm por 5 minutos.

Os ácidos nucleicos foram precipitados pela adição de 2/3 do volume de isopropanol gelado, e incubados por 30 minutos a -70 °C. O precipitado foi sedimentado por centrifugação, a 14.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 200 µL etanol 70% gelado, para retirada de sal presente. O material foi centrifugado a 14.000 rpm durante 5 minutos. Mais uma vez, o sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 200 µL etanol 95%. O material foi centrifugado a 14.000 rpm durante 5 minutos. Após o descarte do último sobrenadante, o material foi seco em condições naturais, até que o etanol fosse removido. Em seguida, o material foi ressuscitado em 100 mL de solução TE (Tris-EDTA - 10 mmol L⁻¹ Tris-HCl, 1 mmol L⁻¹ EDTA, pH 8,0) com RNase em uma concentração final de 40 µg mL⁻¹ e incubado em banho-maria a 37 °C por 40 minutos. Logo após, o material foi armazenado a - 20 °C até o uso.

4.3.3. Quantificação do DNA

A quantificação do DNA foi realizada em geis de agarose 1%, sendo a concentração das bandas determinada pelo Programa *Image*, utilizando-se como padrão um marcador de 250 pb. Posteriormente, o DNA foi diluído (5 ng mL⁻¹) para as PCRs.

4.3.4. Condições de Amplificação

As reações de amplificação foram completadas para um volume final de 13 μL , contendo os seguintes reagentes: 10 mmol L^{-1} Tris HCl, pH 8,3; 50 mmol L^{-1} KCl; 2,4 mmol L^{-1} MgCl_2 ; 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de cada um dos dNTP's; 0,4 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de oligonucleotídeos iniciadores; 5 ng de DNA genômico e 0,75 unidade de Taq DNA polimerase. Foram aplicadas 2 μL de DNA e, posteriormente, adicionado o mix (11 μL) descrito acima.

As reações de PCR (*Veriti™ 96 Well Thermal Cycler - Applied Biosystems*) foram conduzidas da seguinte forma: 3 min a 94 °C para desnaturação inicial, seguindo-se 40 ciclos, cada um consistiu de 94 °C por 1 min, 40-55 °C por 1 min (dependendo do iniciador utilizado), 72 °C por 3 min, e uma extensão final a 72 °C por 7 min. Os fragmentos amplificados foram então separados em gel de agarose 1,5%, corados com GelRed™, e submetidos à luz UV para visualização dos resultados (Fotodocumentador MF-*ChemiBIS 3.2 - Bio-imaging System*). As imagens dos géis foram capturadas para posterior análise.

4.3.5. Os iniciadores

Foram utilizados 17 iniciadores (UCB - Columbia, Canadá), propostos por Hu et al. (2003). Os iniciadores foram validados e a temperatura de anelamento foi otimizada por Moulin et al. (2012) (Tabela 3).

Tabela 3. Iniciadores de ISSR utilizados e temperaturas de anelamento, no estudo da diversidade genética entre 30 acessos de batata-doce da Coleção de Germoplasma da UENF. Campos dos Goytacazes - RJ, 2016.

Sequência 5' - 3'	Temperatura de anelamento
(GAGA) ₃ CC	40°C
(GT) ₆ CC	45°C
(CAC) ₃ GC	45°C
(AG) ₈ YT	42°C
(AC) ₈ CG	55°C
(AC) ₈ CT	47°C
(CT) ₈ RG	42°C
(GGAT) ₃ GA	41°C
(GAA) ₆ AA	48°C
(AG) ₈ C	45°C
(CT) ₈ G	44°C

Cont. Tabela 3

Sequência 5' - 3'	Temperatura de anelamento
(AC) ₈ T	50°C
(AG) ₈ YA	47°C
(GA) ₈ YT	47°C
(GT) ₈ YC	47°C
(AC) ₈ YC	52°C
(ATG) ₆	50°C

R= A,G; Y=C,T

4.3.6. Análise dos fragmentos amplificados

Os dados foram obtidos pela avaliação visual das bandas mais consistentes e evidentes nos 30 acessos estudados. Estes foram utilizados para elaboração de uma matriz de dados binários, utilizada para calcular a matriz de dissimilaridade, em que o número 1 correspondeu à presença de banda, o zero, à ausência de banda, e quando não foi possível determinar se a banda estava presente ou não em função da não amplificação de um dado acesso para um determinado iniciador, foi computado como número 2.

A análise de todos os dados foi feita pelo programa Genes (Cruz, 2013), com exceção dos dendrogramas que foram obtidos pelo método UPGMA, e gerados com o auxílio do programa R (www.r-project.org). Posteriormente, foi realizada a correlação cofenética entre a matriz de agrupamento e a matriz de distância.

4.3.7. Divergência Genética

Após a exclusão dos marcadores monomórficos, estimou-se a dissimilaridade genética entre os acessos de batata-doce. Para obtenção da matriz de dissimilaridade foi utilizado o complemento aritmético do Índice de Jaccard. Esse coeficiente consiste na comparação do número de presenças de bandas comuns e o número total de bandas envolvidas, excluindo o número de ausências conjuntas. Este coeficiente é definido pela expressão:

$$D_{ij} = 1 - S_{ij}$$

Onde:

$$S_{ij} = \frac{a}{a + b + c}$$

a = número de bandas presentes nos acessos i, j;

b = número de bandas presentes no acesso i e ausentes no acesso j;

c = número de bandas presentes no acesso j e ausentes no acesso i.

O agrupamento foi realizado a partir dos dados dessa matriz. Para esta análise foi utilizado o método hierárquico de UPGMA. Segundo Cruz e Regazzi (2004), este método permite ao pesquisador verificar o grau de similaridade entre genitores, genitores e grupos similares, ou entre grupos distintos.

No método UPGMA, a distribuição dos indivíduos no dendrograma não segue um critério de formação de grupos, uma vez que o principal aspecto deste método consiste nas ramificações que são obtidas. Os indivíduos são agrupados aos pares, utilizando-se médias aritméticas da dissimilaridade. O dendrograma prioriza os genótipos com maior similaridade, e as distâncias entre um indivíduo e um grupo formado pelos indivíduos i e j são calculadas por:

$$d(ij)k = \text{média } \{dik + dj k\} = \frac{(dik + dj k)}{2}$$

$d(ij)k$ = distância média entre o grupo ij e o indivíduo k;

dik = distância entre os indivíduos i e k;

djk = distância entre os indivíduos j e k.

4.4. Desinfestação e estabelecimento *in vitro* dos acessos coletados

Com o objetivo de reduzir a taxa de contaminação *in vitro* ocasionada pelas condições dos explantes oriundos da casa de vegetação, foram feitas mudas a partir desse material, que foram mantidas em câmara de crescimento (Tabela 2). As ramas dos acessos utilizados, foram coletadas em casa de vegetação e desinfestadas em solução de NaClO na concentração de 0,1% por 5 minutos. Em seguida, foram retiradas estacas com 3-4 entre-nós e 6-8 cm de comprimento e colocadas para enraizar em substrato comercial Basaplant Hortaliças[®]. O substrato utilizado, foi previamente autoclavado durante 30 minutos, a 121°C e 105 kPa por três vezes com intervalo de 24 horas entre as autoclavagens. Após o plantio em copos descartáveis transparentes de 200 mL, as estacas foram levadas para câmara de crescimento com fotoperíodo de 16:8 horas luz: escuro e irradiância de 25 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fornecidas por lâmpadas fluorescentes luz do dia (OSRAM[®]). A temperatura da câmara de crescimento foi

mantida em $27\pm 2^{\circ}\text{C}$ e as plantas foram irrigadas diariamente. Foram feitas três mudas para cada acesso (Figura 2).



Figura 2. Mudanças de batata-doce em câmara de crescimento após 30 dias de plantio. Campos dos Goytacazes - RJ, 2016.

Após 30 dias do plantio das estacas, foram coletados segmentos nodais das mudas de batata-doce, contendo gemas axilares formadas nesta nova condição de cultivo. Os segmentos nodais foram desinfetados em álcool 70% por 1 minuto, seguido por 15 minutos em solução de NaClO 0,5% e três enxágues em água desionizada estéril. Em seguida, as gemas axilares foram retiradas e então colocadas *in vitro* no meio de cultura. Os explantes foram colocados em meio autoclavado composto por sais minerais do meio MS (Murashige e Skoog, 1962), $0,06 \text{ mol L}^{-1}$ de sacarose e 0,8% de ágar bacteriológico Vetec[®] com pH ajustado para 5,7, com 15 repetições para cada um dos 30 acessos. Cada repetição consistiu de um tubo de ensaio (25x150 mm) com 10 mL de meio contendo uma gema axilar. Após a incubação, os tubos de ensaio foram fechados com filme de PVC e mantidos em sala de cultivo com fotoperíodo de 16:8 horas luz: escuro, irradiância de $25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ fornecida por lâmpadas fluorescentes luz do dia (OSRAM[®]) e temperatura de $27\pm 2^{\circ}\text{C}$.

Aos 30 dias foi avaliada a porcentagem de contaminação dos explantes de cada acesso e aqueles não contaminados foram subcultivados em um novo meio de cultura nas mesmas condições anteriores, onde ficaram por mais 90 dias para o crescimento das plantas e multiplicação dos explantes para os experimentos de criopreservação.

4.5. Os ensaios e o experimento de criopreservação

Quatro ensaios e um experimento para o procedimento de criopreservação da batata-doce foram conduzidos no Setor de Horticultura, do LFIT, CCTA, UENF.

4.5.1. 1º Ensaio: Vitrificação em gotículas

O primeiro ensaio foi conduzido utilizando o procedimento para criopreservação de batata-doce descrito por Pennycooke e Towill (2000), com modificação apenas no meio de recuperação dos explantes, onde foram suprimidos os fitoreguladores. Neste ensaio foram utilizadas gemas axilares de batata-doce do acesso UENF 1990, escolhido ao acaso, dentre os 30 acessos pertencentes à coleção de germoplasma de batata-doce da UENF, provenientes de plantas multiplicadas em meio sólido contendo os sais minerais do MS, 0,06 mol L⁻¹ de sacarose e 0,8% de ágar bacteriológico Vetec[®], com pH 5,7 e incubadas na sala de cultivo a 27±2°C com fotoperíodo de 16:8 horas luz/escuro e irradiância de 25 μmol m⁻² s⁻¹ fornecidas por lâmpadas fluorescentes luz do dia (OSRAM[®]).

As gemas axilares passaram por um pré-cultivo, onde foram cultivadas em frascos (65 x 125 mm) contendo meio líquido com os sais minerais do MS e 0,3 mol L⁻¹ de sacarose, com pH 5,7 e incubadas na sala de cultivo a 27±2°C por cerca de 48h nas mesmas condições de fotoperíodo e irradiância descritas anteriormente.

O procedimento de vitrificação consistiu na imersão dos explantes em solução aquosa de meio MS com 2 mol L⁻¹ de glicerol e 0,4 mol L⁻¹ de sacarose (Solução Crioprotetora), por 1h a 27°C. O excesso desta solução foi removido e em seguida os explantes foram submetidos a uma desidratação por exposição ao

PVS2 (Solução de Vitrificação, que consiste em $0,4 \text{ mol L}^{-1}$ de sacarose, $3,26 \text{ mol L}^{-1}$ de glicerol, $1,92 \text{ mol L}^{-1}$ de DMSO e $2,42 \text{ mol L}^{-1}$ de etileno glicol em meio contendo os sais minerais do MS, pH 5,7) por 16 min a 27°C . O excesso desta solução foi removido e em seguida as gemas axilares foram colocadas em conjunto com uma pequena quantidade (cerca $25 \mu\text{L}$) da solução de vitrificação PVS2, em tiras finas de folha de alumínio estéril. As tiras de alumínio foram dobradas, fechadas e, então, imersas em NL por 1 h. Após esse tempo, as tiras de folhas de alumínio contendo as gemas axilares foram aquecidas rapidamente por imersão em $3,0 \text{ mL}$ de meio MS com $1,2 \text{ mol L}^{-1}$ de sacarose (Solução Osmocondicionante) durante 20 min a 27°C . Em seguida, as gemas axilares foram retiradas da folha de alumínio e transferidas para frascos de cultivo ($65 \times 125 \text{ mm}$) contendo meio de recuperação composto de meio MS sólido contendo $0,09 \text{ mol L}^{-1}$ de sacarose, onde foram incubadas no escuro por dois dias, seguida por mais três dias sob luz fraca (irradiância de $15 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) e finalmente incubadas na luz usual (irradiância de $25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) fornecidas por lâmpadas fluorescentes luz do dia (OSRAM[®]), em câmara de crescimento tipo BOD (ELETROlab[®] - Modelo EL 202/4).

Os tratamentos do ensaio foram os seguintes:

TRATAMENTO 1 - Pré-tratamento dos explantes, seguido pelo procedimento de vitrificação e imersão em NL;

CONTROLE 1 - Procedimento de vitrificação, seguido pela imersão em NL;

CONTROLE 2 - Pré-tratamento dos explantes e imersão direta em NL;

CONTROLE 3 - Pré-tratamento dos explantes, seguido pelo procedimento de vitrificação e não imersão em NL;

CONTROLE 4 - Gemas axilares em meio de recuperação.

Foram feitas quatro repetições para cada tratamento, sendo que cada repetição consistiu de um frasco de cultivo ($65 \times 125 \text{ mm}$) contendo cinco gemas axilares.

Após oito semanas a altura, o número de folhas e a taxa de sobrevivência dos explantes foram avaliados.

4.5.2. 2° Ensaio: Vitrificação em gotículas

O segundo ensaio foi conduzido utilizando o procedimento para criopreservação de batata-doce descrito por Pennycooke e Towill (2000), com modificação apenas no meio de pré-tratamento que foi sólido ao invés de líquido. Neste segundo ensaio foi utilizado o meio de recuperação original do protocolo descrito por Pennycooke e Towill (2000).

Neste ensaio foram utilizadas gemas axilares de batata-doce do acesso UENF 1937, escolhido ao acaso, dentre os 30 acessos pertencentes à coleção de germoplasma de batata-doce da UENF, provenientes de plantas multiplicadas em meio sólido contendo os sais minerais do MS, 0,06 mol L⁻¹ de sacarose e 0,8% de ágar bacteriológico Vetec[®], com pH 5,7 e incubadas na sala de cultivo a 27±2°C com fotoperíodo de 16:8 horas luz/escuro e irradiância de 25 μmol m⁻² s⁻¹ fornecidas por lâmpadas fluorescentes luz do dia (OSRAM[®]).

As gemas axilares passaram por um pré-cultivo, onde foram cultivadas em frascos (65 x 125 mm) contendo meio sólido com os sais minerais do MS, 0,3 mol L⁻¹ de sacarose e 0,8% de ágar bacteriológico Vetec[®], com pH 5,7 e incubados na sala de cultivo a 27±2°C por cerca de 48h nas mesmas condições de fotoperíodo e irradiância descritas anteriormente.

O procedimento de vitrificação consistiu na imersão dos explantes em solução aquosa de meio MS com 2 mol L⁻¹ de glicerol e 0,4 mol L⁻¹ de sacarose (Solução Crioprotetora), por 1h a 27°C. O excesso desta solução foi removido e em seguida os explantes submetidos a uma desidratação por exposição a PVS2 (Solução de Vitrificação, que consiste em 0,4 mol L⁻¹ de sacarose, 30% de glicerol, 15% de DMSO e 15% de etileno glicol em meio contendo os sais minerais do MS, pH 5,7) por 16 min a 27°C. O excesso desta solução foi removido e em seguida as gemas axilares foram colocadas em conjunto com uma pequena quantidade (cerca 25 μL) da solução de vitrificação PVS2, em tiras finas de folha de alumínio estéril. As tiras de alumínio foram dobradas, fechadas e, então imersas em NL por 1 h. Após esse tempo, as tiras de folhas de alumínio contendo as gemas axilares foram aquecidas rapidamente por imersão em 3,0 mL de meio MS com 1,2 mol L⁻¹ de sacarose (Solução Osmocondicionante) durante 20 min a 27°C. Em seguida, as gemas axilares foram retiradas da folha de alumínio e transferidas para frascos de cultivo (65 x 125 mm) contendo meio de recuperação

composto de meio MS sólido contendo $0,09 \text{ mol L}^{-1}$ de sacarose e suplementado com $1,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de ANA, $0,5 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de BA e $0,1 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de KIN, onde foram incubadas no escuro por dois dias, seguida por mais três dias sob luz fraca (irradiância de $15 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) e finalmente incubadas na luz usual (irradiância de $25 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) fornecidas por lâmpadas fluorescentes luz do dia (OSRAM®), em câmara de crescimento tipo BOD (ELETROlab® - Modelo EL 202/4).

Os tratamentos do ensaio foram os seguintes:

TRATAMENTO 1 - Pré-tratamento dos explantes, seguido pelo procedimento de vitrificação e imersão em NL;

CONTROLE 1 - Procedimento de vitrificação, seguido pela imersão em NL;

CONTROLE 2 - Pré-tratamento dos explantes e imersão direta em NL;

CONTROLE 3 - Pré-tratamento dos explantes, seguido pelo procedimento de vitrificação e não imersão em NL;

CONTROLE 4 - Gemas axilares em meio de recuperação.

Foram feitas quatro repetições para cada tratamento, sendo que cada repetição consistiu de um frasco de cultivo (65 x 125 mm) contendo cinco gemas axilares.

Após oito semanas a altura, o número de folhas e a taxa de sobrevivência dos explantes foram avaliados.

4.5.3. 3º Ensaio: Vitrificação em gotículas

O terceiro ensaio foi conduzido utilizando o procedimento para criopreservação de batata-doce descrito por Pennycooke e Towill (2001), com modificação apenas no meio de pré-tratamento dos explantes, que foi sólido ao invés de líquido. O meio de recuperação foi o mesmo utilizado no protocolo descrito por Pennycooke e Towill (2001), uma vez que os autores demonstraram que a técnica de vitrificação por gotículas poderia ser melhorada, quando os explantes descongelados eram colocados em meio sem NH_4^+ , nos primeiros cinco dias após a criopreservação. Segundo estes autores, o NH_4^+ seria tóxico para as células congeladas e a sobrevivência dos explantes poderia ser melhorada pela exclusão deste composto do meio de cultura nos primeiros dias após o descongelamento.

Neste ensaio foram utilizadas gemas axilares de batata-doce do acesso UENF 1935, escolhido ao acaso, dentre os 30 acessos pertencentes à coleção de germoplasma de batata-doce da UENF, provenientes de plantas multiplicadas em meio sólido contendo os sais minerais do MS, $0,06 \text{ mol L}^{-1}$ de sacarose e 0,8% de ágar bacteriológico Vetec[®], com pH 5,7 e incubadas na sala de cultivo a $27 \pm 2^\circ\text{C}$ com fotoperíodo de 16:8 horas luz/escuro e irradiância de $25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ fornecidas por lâmpadas fluorescentes luz do dia (OSRAM[®]).

As gemas axilares passaram por um pré-cultivo, onde foram cultivadas em frascos (65 x 125 mm) contendo meio sólido com os sais minerais do MS, $0,3 \text{ mol L}^{-1}$ de sacarose e 0,8% de ágar bacteriológico Vetec[®], com pH 5,7 e incubados na sala de cultivo a $27 \pm 2^\circ\text{C}$ por cerca de 48h nas mesmas condições de fotoperíodo e irradiância descritas anteriormente.

O procedimento de vitrificação consistiu na imersão dos explantes em solução aquosa de meio MS com 2 mol L^{-1} de glicerol e $0,4 \text{ mol L}^{-1}$ de sacarose (Solução Crioprotetora), por 1h a 27°C . O excesso desta solução foi removido e em seguida os explantes submetidos a uma desidratação por exposição a PVS2 (Solução de Vitrificação, que consiste em $0,4 \text{ mol L}^{-1}$ de sacarose, 30% de glicerol, 15% de DMSO e 15% de etileno glicol em meio contendo os sais minerais do MS, pH 5,7) por 16 min a 27°C . O excesso desta solução foi removido e em seguida as gemas axilares foram colocadas em conjunto com uma pequena quantidade (cerca $25 \mu\text{L}$) da solução de vitrificação PVS2, em tiras finas de folha de alumínio estéril. As tiras de alumínio foram dobradas, fechadas e, então imersas em NL por 1 h. Após esse tempo, as tiras de folhas de alumínio contendo as gemas axilares foram aquecidas rapidamente por imersão em 3,0 mL de meio MS com $1,2 \text{ mol L}^{-1}$ de sacarose (Solução Osmocondicionante) durante 20 min a 27°C . Em seguida, as gemas axilares foram retiradas da folha de alumínio e transferidas para frascos de cultivo (65 x 125 mm) contendo meio de recuperação composto de meio MS sólido modificado sem o amônio (NH_4^+) contendo $0,09 \text{ mol L}^{-1}$ de sacarose e suplementado com $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de ANA, $0,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ de BA e $0,1 \mu\text{mol L}^{-1}$ de KIN, onde foram incubadas no escuro por dois dias, seguida por mais três dias sob luz fraca (irradiância de $15 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) e finalmente incubadas na luz usual (irradiância de $25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) fornecidas por lâmpadas fluorescentes luz do dia (OSRAM[®]), em câmara de crescimento tipo BOD (ELETROlab[®] - Modelo EL 202/4).

No quinto dia de incubação, as gemas axilares foram transferidas para um novo meio de recuperação composto de meio MS sólido com o amônio (NH_4^+) contendo $0,09 \text{ mol L}^{-1}$ de sacarose e suplementado com $1,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de ANA, $0,5 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de BA e $0,1 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de KIN.

Os tratamentos do ensaio foram os seguintes:

TRATAMENTO 1 - Pré-tratamento dos explantes, seguido pelo procedimento de vitrificação e imersão em NL;

CONTROLE 1 - Procedimento de vitrificação, seguido pela imersão em NL;

CONTROLE 2 - Pré-tratamento dos explantes e imersão direta em NL;

CONTROLE 3 - Pré-tratamento dos explantes, seguido pelo procedimento de vitrificação e não imersão em NL;

CONTROLE 4 - Gemas axilares em meio de recuperação.

Foram feitas quatro repetições para cada tratamento, sendo que cada repetição consistiu de um frasco de cultivo (65 x 125 mm) contendo cinco gemas axilares.

Após oito semanas a altura, o número de folhas e a taxa de sobrevivência dos explantes foram avaliados.

4.5.4. 4º Ensaio: Encapsulamento-Vitrificação

O quarto ensaio foi conduzido utilizando exatamente o mesmo procedimento para criopreservação de batata-doce descrito por Hirai e Sakai (2003). Neste ensaio foram utilizados segmentos nodais de batata-doce do acesso UENF 1917, escolhido ao acaso, dentre os 30 acessos pertencentes à coleção de germoplasma de batata-doce da UENF, provenientes de plantas multiplicadas em meio sólido contendo os sais minerais do MS, $0,06 \text{ mol L}^{-1}$ de sacarose e 0,8% de ágar bacteriológico Vetec[®], com pH 5,7 e incubadas na sala de cultivo a $27 \pm 2^\circ\text{C}$ com fotoperíodo de 16:8 horas luz/escuro e irradiância de $25 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ fornecidas por lâmpadas fluorescentes luz do dia (OSRAM[®]). Neste ensaio foi testada a técnica de encapsulamento-vitrificação.

Estacas caulinares com dois segmentos nodais de plantas cultivadas *in vitro* foram repicadas e colocadas em frascos (65 x 125 mm) contendo meio MS sólido de multiplicação (Meio de Multiplicação I), composto por $0,09 \text{ mol L}^{-1}$ de sacarose, 0,1% de caseína hidrolisada e 0,8% de ágar bacteriológico Vetec[®], com

pH 5,7 e incubados na sala de cultivo a $27\pm 2^\circ\text{C}$ nas mesmas condições de fotoperíodo e irradiância descritas anteriormente. Após 14 dias, as estacas caulinares contendo os segmentos nodais foram transferidas para um novo meio MS sólido de multiplicação (Meio de Multiplicação II), composto por $0,09\text{ mol L}^{-1}$ de sacarose e suplementado com $2,22\text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$ de BA por mais 14 dias.

Após 28 dias, os novos segmentos nodais crescidos nos meios de multiplicação foram repicados e suspensos em solução de alginato de sódio (composta por sais do meio MS e sem o Ca^{2+} , suplementado com 2% de alginato de sódio e $0,09\text{ mol L}^{-1}$ sacarose). Uma pipeta estéril de $1000\text{ }\mu\text{L}$ foi utilizada para distribuir uma gota de solução de alginato de sódio ($80\text{ }\mu\text{L}$) contendo um segmento nodal na solução de cloreto de cálcio (composta por sais do meio MS, suplementado com $0,09\text{ mol L}^{-1}$ de sacarose e $0,1\text{ mol L}^{-1}$ de CaCl_2). Os explantes foram mantidos na solução de cloreto de cálcio durante 30 min, para permitir a conclusão do processo de encapsulamento.

Após o processo de encapsulamento, os encapsulados foram pré-cultivados em 40 mL de meio MS líquido suplementado com $0,09\text{ mol L}^{-1}$ de sacarose e 0,1% de caseína hidrolisada (Solução de Pré-Cultivo I) em frascos erlenmeyers de 100 mL durante 24 horas em agitador (Nova Ética, Mod. 109) (90 rpm). Em seguida foram transferidos para um meio MS líquido contendo $0,3\text{ mol L}^{-1}$ de sacarose (Solução de Pré-Cultivo II) e pré-cultivados por mais 16 h em agitador (Nova Ética, Mod. 109) (90 rpm).

A crioproteção dos encapsulados pré-cultivados foi realizada por incubação em meio MS líquido suplementado com $1,6\text{ mol L}^{-1}$ de sacarose e 2 mol L^{-1} de glicerol (Solução Crioprotetora) durante 3 horas em agitador (Nova Ética, Mod. 109) (60 rpm).

Os encapsulados foram desidratados em 20 mL de PVS2 (Solução de Vitrificação, que consiste em $0,4\text{ mol L}^{-1}$ de sacarose, 30% de glicerol, 15% de DMSO e 15% de etileno glicol em meio contendo os sais minerais do MS, pH 5,7) num erlenmeyer de 100 mL num agitador rotativo (60 rpm) durante 60 min. Após a desidratação, os encapsulados foram transferidos em conjunto (8 encapsulados por criotubo) para criotubos de 1 mL e suspensos em 0,5 mL de PVS2. Os criotubos foram então mergulhados diretamente em NL e mantidos por pelo menos 1 h.

Depois de retirados do NL, os criotubos foram rapidamente aquecidos em água morna (38°C) por 2 min. O PVS2 foi drenado dos criotubos e os encapsulados incubados em 40 mL de solução osmocondicionante (composta por sais do meio MS com 1,2 mol L⁻¹ de sacarose) durante 20 min em agitador (Nova Ética, Mod. 109) (90 rpm).

Em seguida, os encapsulados foram transferidos para frascos de cultivo (65 x 125 mm) contendo meio de recuperação composto de sais do meio MS sólido contendo 0,09 mol L⁻¹ de sacarose e suplementado com 2,22 µmol L⁻¹ de BA e 2,9 µmol L⁻¹ de GA₃ (Meio de Recuperação I), onde foram incubados por 7 dias em câmara de crescimento tipo BOD (ELETROlab[®] - Modelo EL 202/4) a 27±2°C com fotoperíodo de 16:8 horas luz/escuro e irradiância de 25 µmol m⁻² s⁻¹ fornecidas por lâmpadas fluorescentes luz do dia (OSRAM[®]).

No sétimo dia de incubação os encapsulados foram transferidos para um novo meio de recuperação (meio de recuperação II) composto de sais do meio MS sólido contendo 0,09 mol L⁻¹ de sacarose e suplementado com 1,45 µmol L⁻¹ de GA₃, sem o BA.

Os tratamentos do ensaio foram os seguintes:

TRATAMENTO 1 - Encapsulamento, pré-cultivo, crioproteção, vitrificação e imersão em NL;

CONTROLE 1 - Encapsulamento, crioproteção, vitrificação e imersão em NL;

CONTROLE 2 - Encapsulamento, pré-cultivo e imersão em NL;

CONTROLE 3 - Encapsulamento e imersão em NL;

CONTROLE 4 - Gemas axilares em meio de recuperação.

Foram feitas cinco repetições para cada tratamento, sendo que cada repetição consistiu de um frasco de cultivo (65 x 125 mm) contendo 16 explantes.

Após oito semanas a altura, o número de folhas e a taxa de sobrevivência dos explantes foram avaliados.

4.5.5. Experimento de Encapsulamento-Vitrificação

Para o experimento de criopreservação de batata-doce foi utilizado o procedimento descrito por Hirai e Sakai (2003), com modificação da temperatura em alguns tratamentos, em que foi utilizado o banho de gelo (0°C) ao invés da temperatura ambiente (27°C) e a diminuição do tempo de exposição ao PVS2 de

60 minutos para 30 minutos. Visto que, no quarto ensaio, os explantes tratados em temperatura ambiente (27°C) e expostos ao PVS2 por 60 minutos não sobreviveram.

Neste experimento foram utilizados segmentos nodais de batata-doce do acesso UENF 1987, escolhido ao acaso, dentre os 30 acessos pertencentes à coleção de germoplasma de batata-doce da UENF, provenientes de plantas micropropagadas multiplicadas em meio MS sólido, contendo 0,06 mol L⁻¹ de sacarose e 0,8% de ágar, com pH 5,7 e incubadas na sala de cultivo a 27°C ±2 com fotoperíodo de 16:8 horas luz/escuro e irradiância de 25 μmol m⁻² s⁻¹ fornecidas por lâmpadas fluorescentes luz do dia (OSRAM®). Neste experimento foi testada a técnica de encapsulamento-vitrificação.

Os segmentos nodais foram repicados e suspensos em solução de alginato de sódio (composta por sais inorgânicos do meio MS e sem o Ca²⁺, suplementado com 2% de alginato de sódio e 0,09 mol L⁻¹ de sacarose). Uma pipeta estéril de 1000 μL foi utilizada para distribuir uma gota de solução de alginato de sódio (100 μL) contendo um único segmento nodal na solução de cloreto de cálcio (composta por sais do meio MS, suplementado com 0,09 mol L⁻¹ de sacarose e 0,1 mol L⁻¹ de CaCl₂). Os explantes foram mantidos na solução de cloreto de cálcio durante 30 min, para permitir a conclusão do processo de encapsulamento.

Após o processo de encapsulamento, foi feita a crioproteção dos encapsulados, por incubação destes em meio MS líquido suplementado com 1,6 mol L⁻¹ de sacarose e 2 mol L⁻¹ de glicerol (Solução Crioprotetora) durante 3 horas em agitador (Nova Ética, Mod. 109) (60 rpm).

Os encapsulados foram transferidos em conjunto para criotubos de 1 mL (6 encapsulados por criotubo) e desidratados em 0,5 mL de PVS2 (Solução de Vitrificação, que consiste em 0,4 mol L⁻¹ de sacarose, 30% de glicerol, 15% de DMSO e 15% de etileno glicol em meio contendo os sais minerais do MS, pH 5,7), durante os tempos de 30 e 60 min, em temperatura ambiente (27°C) e em banho de gelo (0°C). Após a desidratação, os criotubos foram então mergulhados diretamente em NL e mantidos por pelo menos 1 h.

Depois de armazenados em NL, os criotubos foram rapidamente aquecidos em água morna (38°C) por 2 min. O PVS2 foi drenado dos criotubos e os encapsulados incubados em 40 mL de solução osmocondicionante (composta

por sais do meio MS com $1,2 \text{ mol L}^{-1}$ de sacarose) durante 20 min em agitador (Nova Ética, Mod. 109) (60 rpm).

Em seguida, os encapsulados foram transferidos para frascos de cultivo (65 x 125 mm) contendo meio de recuperação composto de sais do meio MS sólido contendo $0,09 \text{ mol L}^{-1}$ de sacarose e suplementado com $2,22 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de BA e $2,9 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de GA_3 (meio de recuperação I), onde foram incubados por sete dias em câmara de crescimento tipo BOD (ELETROLab[®] - Modelo EL 202/4) a $27 \pm 2^\circ\text{C}$ com fotoperíodo de 16:8 horas luz/escuro e irradiância de $25 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ fornecidas por lâmpadas fluorescentes luz do dia (OSRAM[®]).

No sétimo dia de incubação os encapsulados foram transferidos para um novo meio de recuperação (meio de recuperação II) composto de sais do meio MS sólido contendo $0,09 \text{ mol L}^{-1}$ de sacarose e suplementado com $1,45 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de GA_3 , sem o BA.

Os tratamentos do experimento foram os seguintes:

TRATAMENTO 1 - Encapsulamento, crioproteção, PVS2 (30' a temp. ambiente) e imersão em NL;

TRATAMENTO 2 - Encapsulamento, crioproteção, PVS2 (30' a 0°C) e imersão em NL;

TRATAMENTO 3 - Encapsulamento, crioproteção, PVS2 (60' a temp. ambiente) e imersão em NL;

TRATAMENTO 4 - Encapsulamento, crioproteção, PVS2 (60' a 0°C) e imersão em NL;

CONTROLE 1 - Repicagem dos explantes e inoculação no meio de recuperação;

CONTROLE 2 – Encapsulamento e inoculação no meio de recuperação;

CONTROLE 3 - Encapsulamento, imersão em NL;

CONTROLE 4 - Encapsulamento, crioproteção, PVS2 (0') e imersão em NL;

CONTROLE 5 - Encapsulamento, crioproteção, PVS2 (0') e não imersão em NL;

Foram feitas cinco repetições para cada tratamento, sendo que cada repetição consistiu de um frasco de cultivo (65 x 125 mm) contendo seis explantes.

Após oito semanas, foram avaliados altura, número de folhas e taxa de sobrevivência dos explantes.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Caracterização morfológica dos acessos coletados

Observou-se variação para os sete caracteres qualitativos da parte aérea dos 30 acessos de batata-doce estudados (Figura 3). Foram observados os seguintes formatos de folha: triangular (53,5%), lobulada (43,5%) e cordada (3%). Moulin et al. (2012), analisando 80 acessos de batata-doce (dentre eles os 30 acessos do presente estudo) e um de *Ipomoea pescaprae* constataram, também, que os formatos triangular, lobulado e cordado eram predominantes. Além das formas de variações observadas, Moulin et al. (2012) também observaram a forma lanceolada (cerca de 3,7%) e a forma redonda (cerca de 1,2%). Isto se deve ao fato da coleção de germoplasma possuir um número maior de acessos naquela época (80 acessos).

O tipo de lóbulo foi uma característica com grande variabilidade entre os acessos, sendo encontradas cinco das seis formas de variações: ausência de lóbulos (36,5%), lóbulos muito superficiais (17%), superficiais (3%), moderados (26,5%), e profundos (17%). Mesmo trabalhando com um maior número de acessos, as mesmas formas de variações de lóbulos também foram observadas por Moulin et al. (2012). Diferentemente, Veasey et al. (2007), ao avaliarem a diversidade fenotípica de 74 acessos de batata-doce em propriedades do Vale do Ribeira em São Paulo, observaram uma predominância maior de lóbulos muito superficiais (40%).

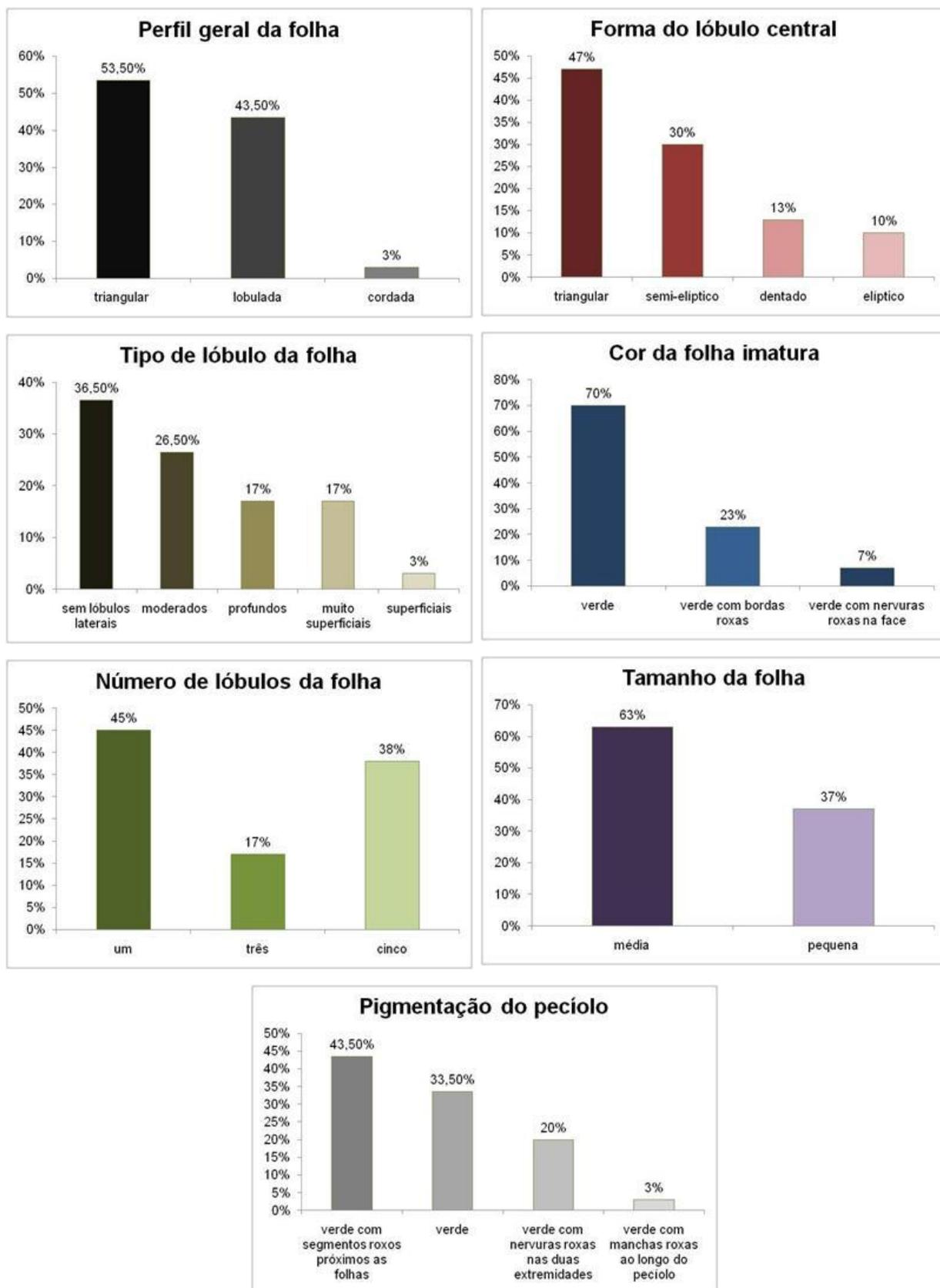


Figura 3. Classes fenotípicas da parte aérea e frequências observadas para 30 acessos de batata-doce do Norte do Estado do Rio de Janeiro. Campos dos Goytacazes - RJ, 2016.

Foram observadas três categorias para o número de lóbulos: apenas um lóbulo (45%), três lóbulos (17%) e cinco lóbulos (38%). As frequências observadas por Moulin et al. (2012) para número de lóbulos (41,5%, 19,5% e 39% para um lóbulo, três lóbulos e cinco lóbulos, respectivamente) foram semelhantes às observadas neste trabalho. Ritschel e Huamán (2002) classificaram 38,2% dos acessos com apenas um lóbulo e 36,4% com cinco lóbulos, sendo estas, também, as duas maiores frequências observadas pelos autores.

O aspecto central do lóbulo da folha foi caracterizado como: dentado (13%), triangular (47%), semi-elíptico (30%) e elíptico (10%). Moulin et al. (2012) também encontraram as mesmas formas de variações observadas. Resultados divergentes a este trabalho foram obtidos por Cavalcante (2008), ao avaliar a diversidade fenotípica de duas variedades e nove clones de batata-doce do município de Junqueiro em Alagoas, caracterizando os genótipos de batata-doce em apenas duas categorias: 63,7% como sendo semi-elíptico e 36,3% como sendo triangular.

Para coloração da folha imatura, as folhas verdes foram predominantes (70%), sendo o restante representado por folhas verdes com bordas roxas (23%) e com nervuras roxas na face (7%). As mesmas formas de variação foram observadas por Moulin et al. (2012), com frequências similares. Veasey et al. (2007), ao avaliarem a diversidade fenotípica de 74 acessos de batata-doce em propriedades do Vale do Ribeira em São Paulo, classificaram para coloração da folha imatura, 50% das folhas como verdes com bordas roxas, 20% para folhas verdes, as demais colorações foram também obtidas, mas em frequências menores.

Foram observadas duas classes para tamanho da folha: pequena (37%) e média (63%). O tamanho médio da folha também foi observado em maior frequência em outros trabalhos de caracterização de germoplasma de batata-doce (Ritschel e Huamán, 2002; Daros et al., 2002; Moulin et al., 2012).

Para a variável coloração do pecíolo constataram-se os seguintes tipos: verde (33,5%), verde com seguimentos roxos próximos às folhas (43,5%), verde com nervuras roxas em ambas as extremidades (20%) e verde com manchas roxas ao longo do pecíolo (3%). Outros trabalhos também constataram uma grande variabilidade de colorações do pecíolo, detectando uma grande

heterogeneidade para esta característica (Daros et al., 2002; Veasey et al., 2007; Moulin et al., 2012).

Os descritores mais úteis na discriminação dos acessos da coleção foram a forma do lóbulo central, o tipo de lóbulo da folha e a pigmentação do pecíolo. Além destes descritores, para Moulin et al. (2012), o descritor formato da folha também foi útil na discriminação dos acessos.

A técnica UPGMA foi eficiente no ajuste entre as distâncias, com correlação cofenética de 0,82 para as associações entre a matriz de distância e o dendrograma das variáveis qualitativas (Figura 4). O ajuste adequado é avaliado pelos valores de correlação cofenética superiores a 0,80, conforme sugerem Bussab et al. (1990).

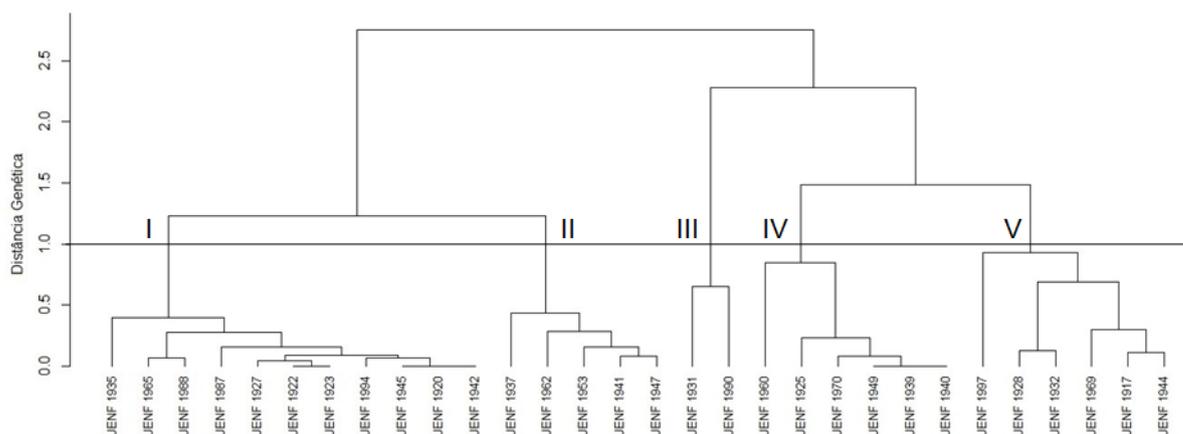


Figura 4. Dendrograma de dissimilaridade genética, obtido pelo método hierárquico de médias ponderadas, com base em descritores qualitativos da parte aérea, entre 30 acessos de batata-doce do Norte do Estado do Rio de Janeiro. Campos dos Goytacazes - RJ, 2016.

Foi realizado um corte a uma distância de 1,0 proporcionando a formação de cinco grupos (Figura 4). Nesta análise, o grupo I reuniu o maior número de acessos, correspondendo 11 acessos; o grupo II por cinco acessos; o grupo III por dois acessos e os grupos IV e V apresentaram seis acessos cada. Neste trabalho não foi observada uma definição dos grupos de acordo com os locais de coleta, assim como Moulin et al. (2012).

Por intermédio da caracterização da parte aérea foram detectadas três possíveis duplicatas (a primeira entre os acessos UENF 1922 e UENF 1923, a segunda entre os acessos UENF 1920, UENF 1942 e UENF 1945 e a terceira

entre os acessos UENF 1939, UENF 1940 e UENF 1949) (Figura 4) e constatada uma elevada variabilidade fenotípica para os descritores (Figura 5). Estes resultados estão próximos aos obtidos por Moulin et al. (2012).

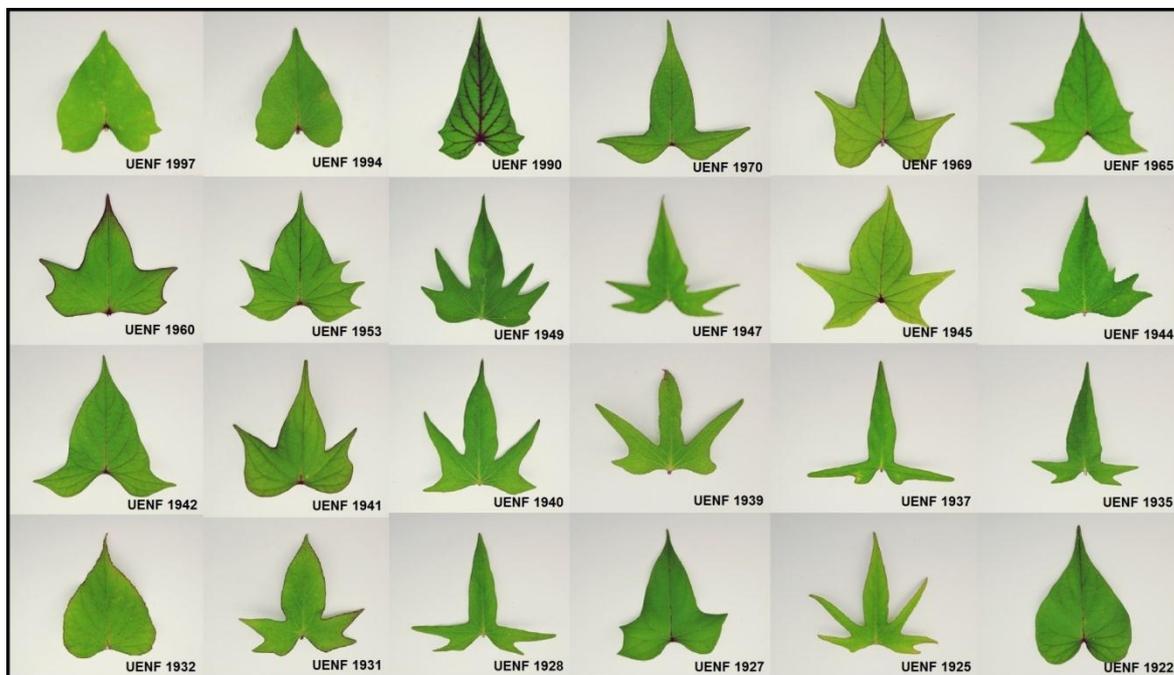


Figura 5. Variabilidade fenotípica das folhas dos acessos de batata-doce do Norte do Estado do Rio de Janeiro. Campos dos Goytacazes - RJ, 2016.

Observou-se variação para os seis caracteres qualitativos de raízes dos 28 acessos de batata-doce estudados, com diferentes frequências para cada classe fenotípica (Figura 6).

Para o formato das raízes, foi constatada uma grande variabilidade, apresentando seis variações: redonda (3,6%), redonda elíptica (7,1%), elíptica (3,6%), oboval (14,3%), longa elíptica (10,7%) e longa irregular (60,7%). Outros trabalhos também constataram uma grande variabilidade de formato de raízes. Moulin et al. (2012) observaram sete classes para os 80 acessos avaliados, já Ritschel e Huamán (2002) encontraram oito classes para os 324 acessos estudados. Esse aumento do número de classes em outros trabalhos deve-se ao fato destes autores terem trabalhado com um maior número de acessos.

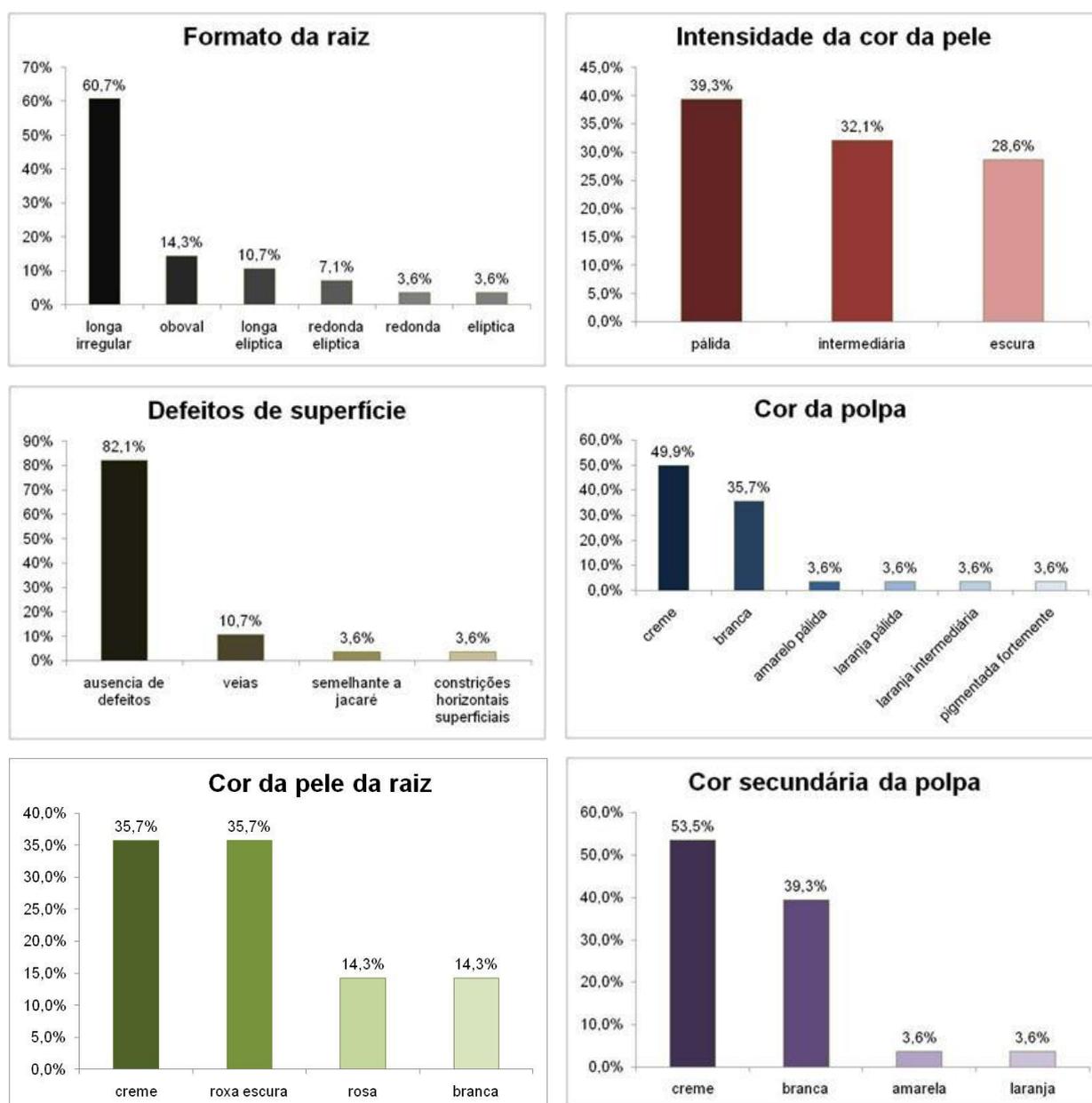


Figura 6. Classes fenotípicas dos descritores para raiz e frequências observadas para 28 acessos de batata-doce do Norte do Estado do Rio de Janeiro. Campos dos Goytacazes - RJ, 2016.

Para a variável defeitos da superfície foram observadas raízes sem defeitos (82,1%), com pele de jacaré (3,6%), com defeitos tipo veia (10,7%) e constrições horizontais superficiais (3,6%). Resultados similares foram obtidos por Daros et al. (2002), Cavalcante (2008) e Moulin et al. (2012), que observaram as classes descritas neste trabalho em distintas proporções.

As cores predominantes da pele da raiz dos acessos caracterizados foram classificadas como creme (35,7%) e roxa escura (35,7%), constatando-se

ainda as colorações rosa (14,3%) e branca (14,3%). Chávez et al. (2006) e Veasey et al. (2007) observaram predominância da coloração creme. Já Daros et al. (2002) e Moulin et al. (2012) encontraram a cor rosada como predominante, enquanto que Ritschel e Huamám (2002) classificaram a cor da pele como sendo branca para 41,2% dos acessos.

A intensidade da cor da pele foi caracterizada como pálida para 39,3% dos acessos, intermediária para 32,1% e escura para 28,6%. Da mesma forma, Daros et al. (2002), Cavalcante (2008) e Moulin et al. (2012) encontraram todas as intensidades para cor da pele da raiz, com predominância da intensidade intermediária.

Para a característica coloração da polpa da raiz, os acessos apresentaram: cor creme (49,9%), branca (35,7%), amarelo pálida (3,6%), laranja pálida (3,6%), laranja intermediária (3,6%) e pigmentado fortemente com antocianinas (3,6%). Outros autores também constataram uma grande diversidade de cores para polpa, com predominância da cor creme, em consonância com este trabalho (Ritschel e Huamán, 2002; Chávez et al., 2006; Veasey et al., 2007; Moulin et al., 2012).

A característica coloração secundária da polpa foi caracterizada como branca (39,3%), creme (53,5%), amarela (3,6%) e laranja (3,6%). Diferente dos dados obtidos no presente estudo, Moulin et al. (2012), ao caracterizarem a mesma coleção de germoplasma de batata-doce da UENF, porém com um número maior de acessos (80), observaram a ausência da coloração secundária da polpa em 76,1% dos acessos. Essa diferença na coloração secundária da polpa pode ser explicada pelo fato de Moulin et al. (2012) terem utilizado raízes de batata-doce coletadas diretamente no campo, nas propriedades rurais onde foram coletados os acessos, enquanto que no presente estudo foram utilizadas raízes de plantas cultivadas em vasos de 1,5 L em casa de vegetação. Além da diferença de ambientes em condições de casa de vegetação, o desenvolvimento radicular dos acessos é restrito.

Os descritores mais úteis na discriminação dos acessos da coleção foram o formato da raiz e a cor da polpa. Além desses, para Moulin et al. (2012) o descritor defeitos de superfície também foi útil.

Os dados foram agrupados pelo método UPGMA, e por meio da matriz gerada pela distância de Cole-Rodgers obteve-se o agrupamento apresentado no

dendrograma da Figura 7. Foi obtida uma correlação cofenética de 0,65. Alguns autores justificam que coeficientes com valores compreendidos entre 0,6 e 0,8 são provenientes do pequeno número de variáveis utilizadas. Segundo Santos (2010), existem outros fatores que também podem influenciar nos valores dos coeficientes como tipo e quantidade das variáveis qualitativas e a qualidade dos dados obtidos.

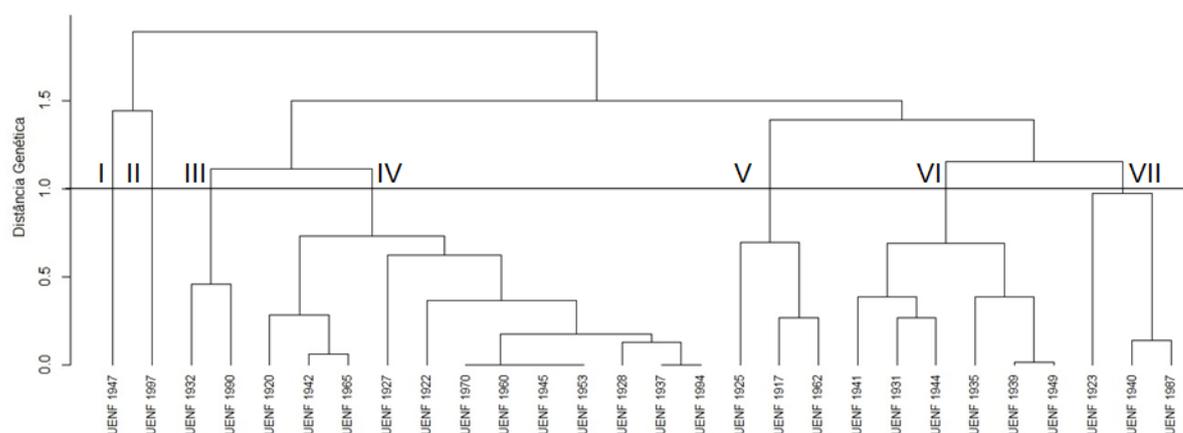


Figura 7. Dendrograma de dissimilaridade genética, obtido pelo método hierárquico de médias ponderadas, com base em descritores qualitativos de raiz, entre 28 acessos de batata-doce do Norte do Estado do Rio de Janeiro. Campos dos Goytacazes - RJ, 2016.

Foi realizado um corte a uma distância de 1,0 proporcionando a formação de sete grupos (Figura 7). Nesta análise, os grupos I e II foram formados por um acesso cada, o grupo III por dois acessos, o grupo IV por 12 acessos, o grupo VI por seis acessos e os grupos V e VII apresentaram três acessos cada. Neste trabalho não foi observada uma definição dos grupos de acordo com os locais de coleta, assim como no trabalho de Moulin et al. (2012).

Por intermédio da caracterização das raízes foram detectadas duas possíveis duplicatas (a primeira entre os acessos UENF 1945, UENF 1953, UENF 1960 e UENF 1970 e a segunda entre os acessos (UENF 1937 e UENF 1994) (Figura 7). Foi constatada uma elevada variabilidade fenotípica para os descritores de raiz (Figura 8). Estes resultados estão próximos aos obtidos por Moulin et al. (2012).



Figura 8. Variabilidade fenotípica das raízes dos acessos de batata-doce do Norte do Estado do Rio de Janeiro. Campos dos Goytacazes - RJ, 2016.

5.2. Caracterização molecular dos acessos coletados

Um total de 17 iniciadores foram testados e avaliados quanto ao número de bandas geradas e ao polimorfismo verificado para estas bandas. Foi obtido um total de 114 bandas, sendo 68 polimórficas (59,65%) e 46 monomórficas (40,35%). O número médio de fragmentos polimórficos produzidos por iniciador foi de quatro (Tabela 4). O iniciador mais polimórfico foi o $(GA)_8YT$, gerando oito bandas (Figura 9).

Tabela 4. Marcadores ISSR na análise da diversidade genética entre 30 acessos de batata-doce da Coleção de Germoplasma da UENF. Campos dos Goytacazes - RJ, 2016.

		Marcadores ISSR
Número de iniciadores		17
Número total de bandas		114
Bandas polimórficas		68
Bandas monomórficas		46
Média de bandas polimórficas por iniciador		4
Maior distância		0,53 (UENF 1941 e UENF 1927)
Menor distância		0,07 (UENF 1965 e UENF 1969)
Distância média		0,32 ($\pm 0,07$)
Correlação cofenética		0,83

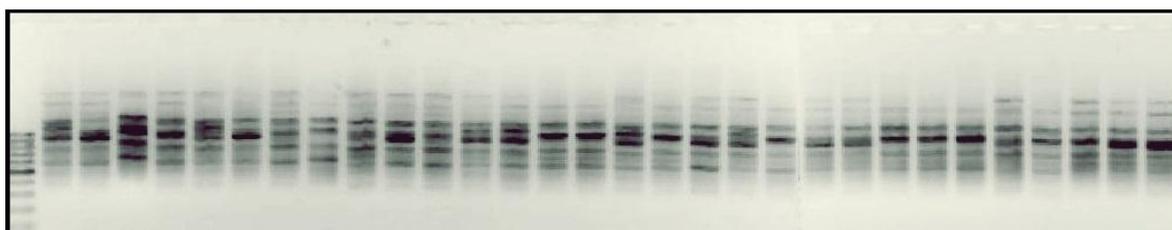


Figura 9. Perfil de um gel de ISSR utilizando o iniciador de sequência $(GA)_8YT$ para os 30 acessos de batata-doce da Coleção de Germoplasma da UENF. Campos dos Goytacazes - RJ, 2016.

O nível de polimorfismo observado para o marcador ISSR, neste trabalho, foi elevado, semelhante ao de He et al. (2007) e Moulin et al. (2012). He et al. (2007), trabalhando com 100 acessos de batata-doce, obtiveram 239 marcas polimórficas usando 14 iniciadores de ISSR, com uma média de 17 bandas polimórficas por iniciador. Este elevado polimorfismo pode ser justificado pela procedência dos acessos, que foram coletados na China, Nova Guiné e Indonésia, que são considerados centros secundários de diversidade genética da batata-doce. Moulin et al. (2012), usando 19 iniciadores de ISSR previamente selecionados para 82 acessos de *Ipomoea* (81 acessos de batata-doce pertencentes a coleção de germoplasma da UENF e um de *Ipomoea pescaprae*), obtiveram 135 marcas polimórficas, em média, 7,1 bandas polimórficas por iniciador.

A técnica de ISSR foi eficiente para acessar a variabilidade genética da população de batata-doce, conforme já descrito em outros trabalhos com batata-doce (Qiang et al., 2008; Moulin et al., 2012). Os genótipos apresentaram uma distância média de 0,32 ($\pm 0,07$). A matriz de dissimilaridade de Jaccard demonstrou que os acessos UENF 1941 e UENF 1927 são os mais distantes, com distância de 0,53. Por outro lado, UENF 1965 e UENF 1969 foram considerados os acessos mais próximos, com uma distância de 0,07 (Tabela 4) (Figura 10). De forma semelhante Moulin et al. (2012) obtiveram uma distância genética que variou de 0,05 a 0,69, com uma distância média de 0,27.

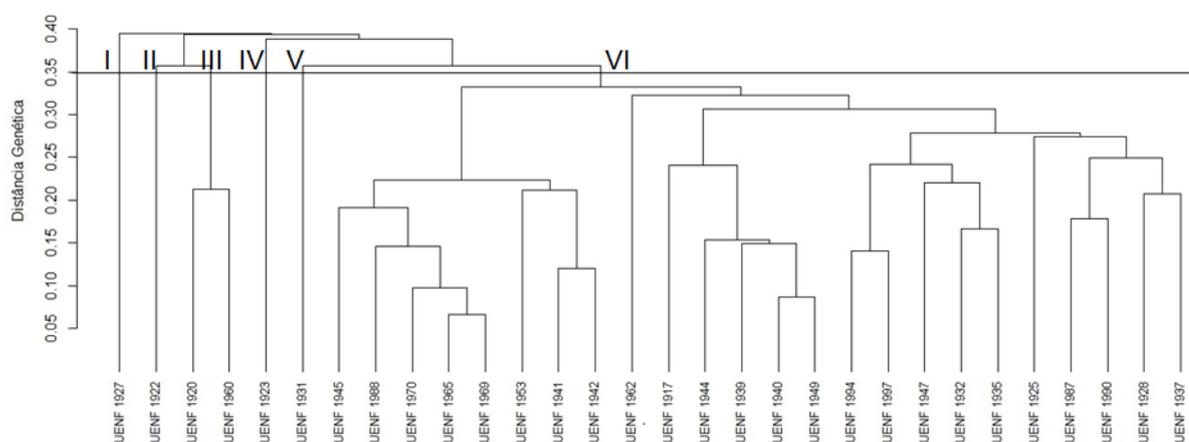


Figura 10. Dendrograma obtido pelo método UPGMA a partir da matriz de dissimilaridade expressa pelo complemento aritmético de Jaccard entre 30 acessos de batata-doce da Coleção de Germoplasma da UENF, com base em 68 fragmentos polimórficos amplificados por marcador ISSR. Campos dos Goytacazes - RJ, 2016.

He et al. (2007) obtiveram uma distância genética que variou de 0,17 a 1,48, com uma distância média de 0,57. Qiang et al. (2008) obtiveram uma distância genética que variou de 0,16 a 0,92, com uma distância média de 0,57. A diferença das distâncias genéticas entre os trabalhos é devida, principalmente, à origem dos acessos estudados. He et al. (2007) e Qiang et al. (2008) trabalharam com acessos de diferentes regiões do mundo. Já Moulin et al. (2012) e o presente estudo trabalharam com acessos de batata-doce da mesma região (Norte Fluminense - RJ).

Na caracterização molecular, os marcadores ISSR demonstraram polimorfismo entre os acessos estudados e não foram detectadas duplicatas, o

que permitiu desconsiderar a hipótese de duplicatas, observada anteriormente na caracterização morfológica dos acessos (Figura 10). Os marcadores moleculares são mais confiáveis que descritores morfológicos, pois não sofrem interferência do ambiente (Carelli, 2003).

A técnica UPGMA foi eficiente no ajuste entre as distâncias, com correlação cofenética de 0,83 (Tabela 4) para as associações entre a matriz de distância e o dendrograma das variáveis. Estima-se que houve um bom ajuste entre as distâncias, pois o ajuste adequado é avaliado pelos valores de correlação cofenética superiores a 0,80, conforme sugerem Bussab et al. (1990).

Foi realizado um corte a uma distância de 0,35 proporcionando a formação de seis grupos (Figura 10). Nesta análise, os grupos I, II, IV e V foram formados por um acesso cada, o grupo III por dois acessos e o grupo IV reuniu o maior número de acessos, correspondendo a 24 acessos. Neste trabalho não foi observada uma definição dos grupos de acordo com os locais de coleta, assim como Moulin et al. (2012).

Foi constatada uma alta variabilidade para os genótipos de batata-doce que fazem parte da Coleção de Germoplasma de batata-doce da UENF (Figura 10), corroborando com outros trabalhos realizados com batata-doce (Elameen et al., 2008; Veasey et al., 2008; Lin et al., 2009; Moulin et al., 2012).

5.3. Desinfestação e estabelecimento *in vitro* dos acessos coletados

De modo geral, a taxa de contaminação dos explantes por fungos foi de 29% (Figura 11). Após 30 dias, apenas o acesso UENF 1970 não apresentou contaminação *in vitro*. Quatro dos 30 acessos apresentaram porcentagem de contaminação superior a 50%, sendo eles: UENF 1922 (71,4%), UENF 1925 (60%), UENF 1927 (60%) e UENF 1990 (65%) (Figura 12).

Em trabalhos anteriores de desinfestação visando o estabelecimento *in vitro*, dos mesmos acessos aqui estudados, foi constatada uma alta taxa de infestação por fungos (100%), quando os explantes desinfestados e inoculados *in vitro* eram coletados diretamente da casa de vegetação, e apesar do tratamento das plantas matrizes com fungicidas, não houve eficácia para a redução da contaminação *in vitro* (dados não publicados).

Vettorazzi (2013), com o objetivo de reduzir a taxa de contaminação *in vitro* ocasionada pelas condições dos explantes oriundos da casa de vegetação, utilizou explantes de brotações provenientes de ramas de batata-doce coletadas em casa de vegetação, desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio (0,1%) e enraizadas em substrato comercial previamente autoclavado, formadas em câmara de crescimento, com luz e temperatura controlada. Essa metodologia foi eficiente e reduziu a alta taxa de infestação por fungos de 100% para 54,8%. No presente trabalho, essa metodologia mostrou-se ainda mais eficiente com uma taxa de contaminação dos explantes por fungos de apenas 29%.

Assim sendo, os procedimentos de desinfestação das ramas e a formação de novas brotações em câmara de crescimento para a retirada dos explantes com o objetivo de reduzir a contaminação *in vitro* foi eficiente para reduzir a contaminação destes acessos.

Apesar destas contaminações, todos os acessos foram estabelecidos *in vitro* e a coleção *in vitro* de germoplasma de batata-doce foi implantada.



Figura 11. Contaminação por fungos em explantes de batata-doce *in vitro*, em meio contendo sais minerais do meio MS e $0,06 \text{ mol L}^{-1}$ de sacarose. Campos dos Goytacazes - RJ, 2016.

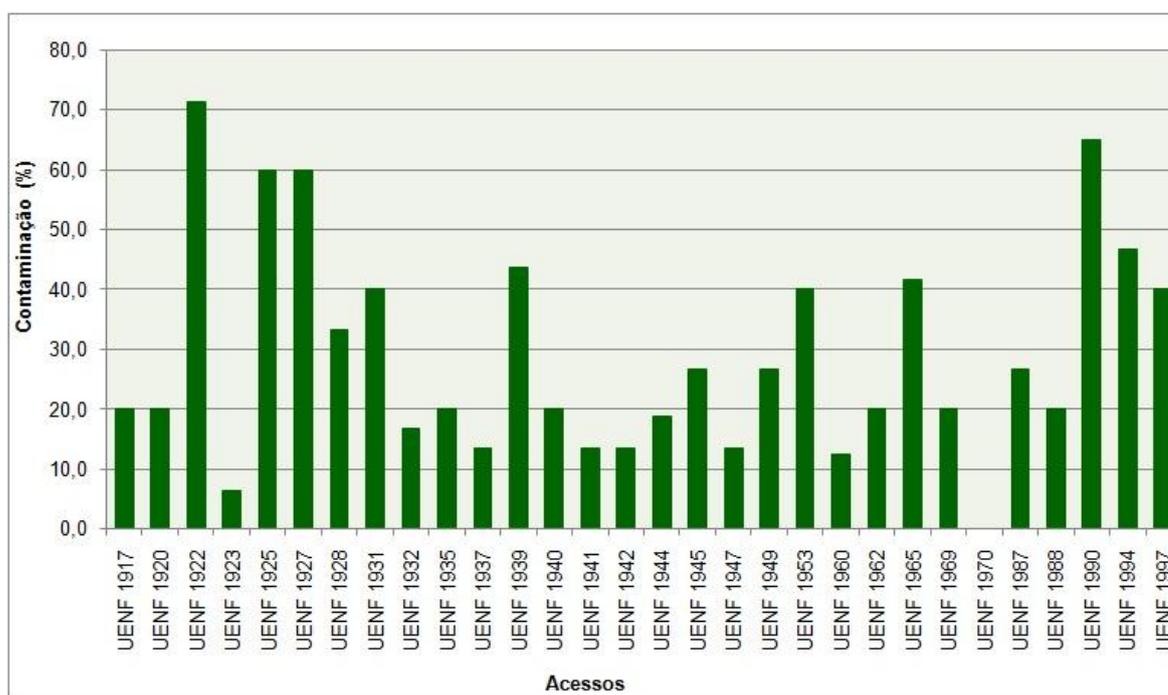


Figura 12. Porcentagem de contaminação dos explantes de acessos de batata-doce *in vitro*, em meio contendo sais minerais do meio MS e $0,06 \text{ mol L}^{-1}$ de sacarose. Campos dos Goytacazes - RJ, 2016.

5.4. Os ensaios e o experimento de criopreservação

De forma geral, os explantes não responderam aos diferentes tratamentos de criopreservação nos quatro ensaios (Figuras de 13 a 16 / Tabelas de 5 a 8) e no experimento de encapsulamento-vitrificação (Figura 17 / Tabela 9). Os explantes de batata-doce de todos os tratamentos mantiveram-se, durante as oito semanas de avaliação, com o mesmo aspecto que apresentavam quando foram inoculados no meio de recuperação. Ocorreu a morte de todos os explantes, exceto em alguns controles, nos quatro ensaios e no experimento de encapsulamento-vitrificação.

Neste trabalho, o pré-cultivo dos explantes foi feito em meio contendo sacarose com a concentração de $0,3 \text{ mol L}^{-1}$, por 48 horas para os três primeiros ensaios (vitrificação em gotículas) (Figuras de 13 a 15) e por 16 horas para o quarto ensaio (encapsulamento-vitrificação) (Figura 16). Para Pennycooke e Towill (2000), a eliminação da etapa de pré-cultivo em meio contendo sacarose resultou na morte de todos os explantes criopreservados. O pré-cultivo em meio contendo sacarose é essencial para a sobrevivência dos explantes de batata-doce criopreservados (Pennycooke e Towill, 2001; Hirai e Sakai, 2003). Apesar de

a batata-doce tolerar soluções com até $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ de sacarose, Pennycooke e Towill (2000), observaram que a concentração de $0,3 \text{ mol L}^{-1}$ de sacarose é a mais indicada para essa cultura. Os benefícios da sacarose são bem conhecidos, pois, além do efeito osmótico, ela é capaz de penetrar em grandes quantidades nas células, durante a pré-incubação. O acúmulo de açúcar nos tecidos está associado à tolerância ao congelamento, mas não é uma garantia de viabilidade dos tecidos após a criopreservação (Adela e Deliu, 2006).



Figura 13. Gemas axilares de batata-doce do acesso UENF 1990 criopreservados no 1º ensaio de vitrificação em gotículas (Pennycooke e Towill, 2000, modificado) após oito semanas em meio de recuperação. **T1:** Pré-tratamento + Vitrificação + nitrogênio líquido (NL); **C1:** Vitrificação + NL; **C2:** Pré-tratamento +NL; **C3:** Pré-tratamento + Vitrificação; **C4:** Explante em meio de recuperação. Barra 65 mm. Campos dos Goytacazes - RJ, 2016.

Tabela 5. Sobrevivência (%), altura (cm) e nº de folhas de gemas axilares de batata-doce do acesso UENF 1990 criopreservados no 1º ensaio de vitrificação em gotículas (Pennycooke e Towill, 2000, modificado) após oito semanas em meio de recuperação. NL = Nitrogênio Líquido. Campos dos Goytacazes - RJ, 2016.

Tratamentos	Sobrevivência (%)	Altura (cm)	Nº de Folhas
T1 - Pré-tratamento + Vitrificação + NL	0	0	0
C1 - Vitrificação + NL	0	0	0
C2 - Pré-tratamento +NL	0	0	0
C3 - Pré-tratamento + Vitrificação	0	0	0
C4 - Explante em meio de recuperação	100	9	7

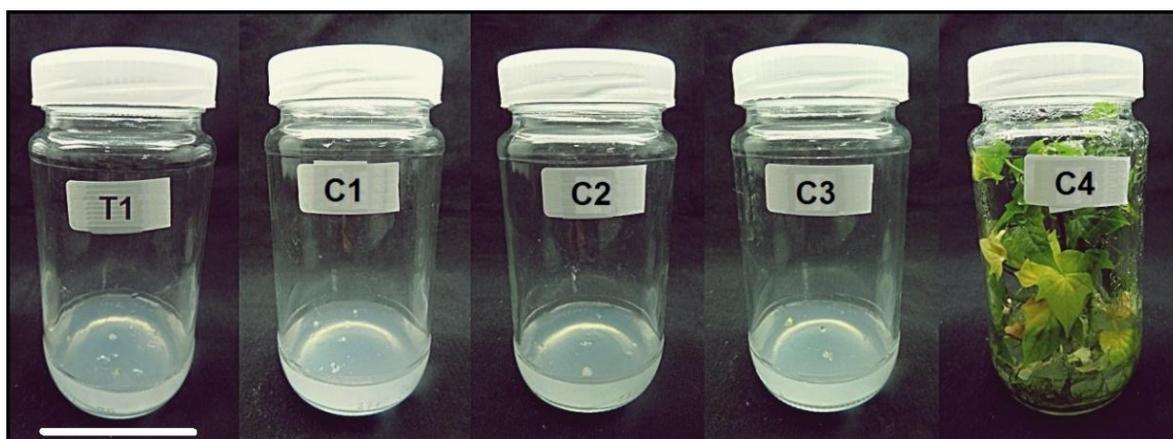


Figura 14. Gemas axilares de batata-doce do acesso UENF 1937 criopreservados no 2º ensaio de vitrificação em gotículas (Pennycooke e Towill, 2000, modificado) após oito semanas em meio de recuperação. **T1:** Pré-tratamento + Vitrificação + nitrogênio líquido (NL); **C1:** Vitrificação + NL; **C2:** Pré-tratamento +NL; **C3:** Pré-tratamento + Vitrificação; **C4:** Explante em meio de recuperação. Barra 65 mm. Campos dos Goytacazes - RJ, 2016.

Tabela 6. Sobrevivência (%), altura (cm) e nº de folhas de gemas axilares de batata-doce do acesso UENF 1937, criopreservados no 2º ensaio de vitrificação em gotículas (Pennycooke e Towill, 2000, modificado) após oito semanas em meio de recuperação. NL = Nitrogênio Líquido. Campos dos Goytacazes - RJ, 2016.

Tratamentos	Sobrevivência (%)	Altura (cm)	Nº de Folhas
T1 - Pré-tratamento + Vitrificação + NL	0	0	0
C1 - Vitrificação + NL	0	0	0
C2 - Pré-tratamento +NL	0	0	0
C3 - Pré-tratamento + Vitrificação	0	0	0
C4 - Explante em meio de recuperação	100	7,5	8

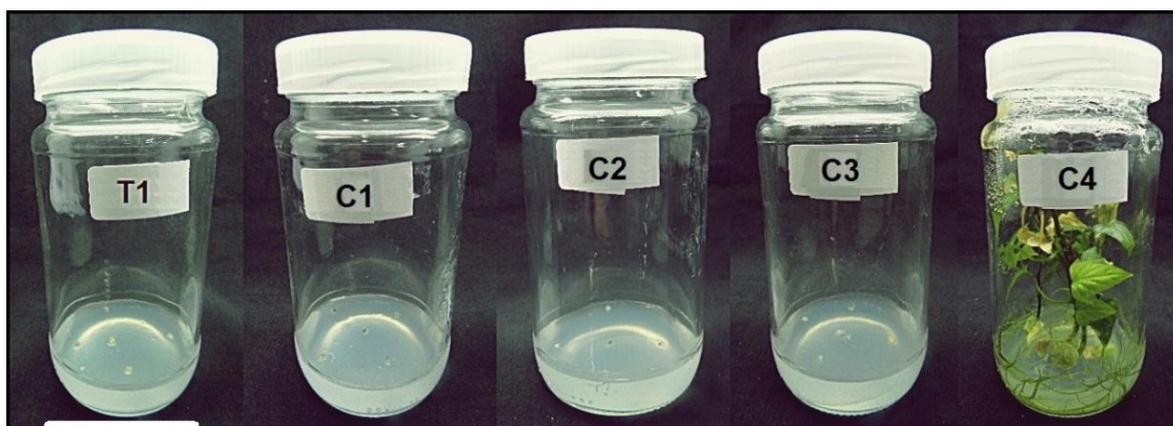


Figura 15. Gemas axilares de batata-doce do acesso UENF 1935, criopreservados no 3º ensaio de vitrificação em gotículas (Pennycooke e Towill, 2001) após oito semanas em meio de recuperação. **T1:** Pré-tratamento + Vitrificação + nitrogênio líquido (NL); **C1:** Vitrificação + NL; **C2:** Pré-tratamento +NL; **C3:** Pré-tratamento + Vitrificação; **C4:** Explante em meio de recuperação. Barra 65 mm. Campos dos Goytacazes - RJ, 2016.

Tabela 7. Sobrevivência (%), altura (cm) e nº de folhas de gemas axilares de batata-doce do acesso UENF 1935, criopreservados no 3º ensaio de vitrificação em gotículas (Pennycooke e Towill, 2001) após oito semanas em meio de recuperação. NL = Nitrogênio Líquido. Campos dos Goytacazes - RJ, 2016.

Tratamentos	Sobrevivência (%)	Altura (cm)	Nº de Folhas
T1 - Pré-tratamento + Vitrificação + NL	0	0	0
C1 - Vitrificação + NL	0	0	0
C2 - Pré-tratamento +NL	0	0	0
C3 - Pré-tratamento + Vitrificação	0	0	0
C4 - Explante em meio de recuperação	100	6,1	8



Figura 16. Gemas axilares de batata-doce do acesso UENF 1917, criopreservados no 4º ensaio de encapsulamento-vitrificação (Hirai e Sakai, 2003) após oito semanas em meio de recuperação. **T1:** Encapsulamento + Pré-cultivo + Crioproteção + Vitrificação + nitrogênio líquido (NL); **C1:** Encapsulamento + Crioproteção + Vitrificação + NL; **C2:** Encapsulamento + Pré-cultivo + NL; **C3:** Encapsulamento + NL; **C4:** Explante em meio de recuperação. Barra 65 cm. Campos dos Goytacazes - RJ, 2016.

Tabela 8. Sobrevivência (%), altura (cm) e nº de folhas de gemas axilares de batata-doce do acesso UENF 1917, criopreservados no 4º ensaio de encapsulamento-vitrificação (Hirai e Sakai, 2003) após oito semanas em meio de recuperação. NL = Nitrogênio Líquido. Campos dos Goytacazes - RJ, 2016.

Tratamentos	Sobrevivência (%)	Altura (cm)	Nº de Folhas
T1 - Encapsulamento + Pré-cultivo + Crioproteção + Vitrificação + NL	0	0	0
C1 - Encapsulamento + Crioproteção + Vitrificação + NL	0	0	0
C2 - Encapsulamento + Pré-cultivo + NL	0	0	0
C3 - Encapsulamento + NL	0	0	0
C4 - Explante em meio de recuperação	100	4,1	5



Figura 17. Gemas axilares de batata-doce do acesso UENF 1987, criopreservados no experimento de encapsulamento-vitrificação após oito semanas em meio de recuperação. **T1:** Encapsulamento + Crioproteção + PVS2 (30' a 27°C) + NL; **T2:** Encapsulamento + Crioproteção + PVS2 (30' a 0°C) + NL; **T3:** Encapsulamento + Crioproteção + PVS2 (60' a 27°C) + NL; **T4:** Encapsulamento + Crioproteção + PVS2 (60' a 0°C) + NL; **C1:** Explante em meio de recuperação; **C2:** Explante encapsulado em meio de recuperação; **C3:** Encapsulamento + NL; **C4:** Encapsulamento + Crioproteção + PVS2 (0') + NL; **C5:** Encapsulamento + Crioproteção + PVS2 (0'). Barra 65 mm. Campos dos Goytacazes - RJ, 2016.

Tabela 9. Sobrevivência (%), altura (cm) e n° de folhas de gemas axilares de batata-doce do acesso UENF 1987, criopreservados no experimento de encapsulamento-vitrificação após oito semanas em meio de recuperação. NL = Nitrogênio Líquido. Campos dos Goytacazes - RJ, 2016.

Tratamentos	Sobrev. (%)	Altura (cm)	N° de Folhas
T1 - Encapsulamento + Crioproteção + PVS2 (30' a 27°C) + NL	0	0	0
T2 - Encapsulamento + Crioproteção + PVS2 (30' a 0°C) + NL	0	0	0
T3 - Encapsulamento + Crioproteção + PVS2 (60' a 27°C) + NL	0	0	0
T4 - Encapsulamento + Crioproteção + PVS2 (60' a 0°C) + NL	0	0	0
C1 - Explante em meio de recuperação	100	1	3
C2 - Explante encapsulado em meio de recuperação	100	1,5	4
C3 - Encapsulamento + NL	0	0	0
C4 - Encapsulamento + Crioproteção + PVS2 (0') + NL	0	0	0
C5 - Encapsulamento + Crioproteção + PVS2 (0')	0	0	0

No presente estudo, dois tipos de meios de pré-cultivo contendo sacarose foram testados: meio de pré-cultivo na forma líquida no primeiro ensaio (Figura 13 / Tabela 5) e meio de pré-cultivo na forma sólida no segundo e terceiro ensaios (Figuras 14 e 15 / Tabelas 6 e 7). Tanto o meio líquido quanto o meio sólido de pré-cultivo não foram eficientes para induzir a tolerância ao congelamento. O primeiro ensaio seguiu o protocolo de Pennycooke e Towill (2000), no qual os autores utilizaram meio de pré-cultivo na forma líquida, não informando se houve agitação do meio. No segundo e terceiro ensaios foi utilizado meio de pré-cultivo sólido que teve por objetivo melhorar a oxigenação dos explantes de batata-doce.

Nos quatro ensaios (Figuras de 13 a 16) e no experimento (Figura 17), os explantes antes de serem expostos ao PVS2, foram imersos em solução contendo glicerol e sacarose (Solução Crioprotetora). Nos três primeiros ensaios (de vitrificação em gotículas) (Figuras 13 a 15), os explantes foram imersos em solução crioprotetora por uma hora, enquanto que no quarto ensaio (Figura 16) e no experimento de encapsulamento-vitrificação (Figura 17), a imersão foi de três horas.

Segundo Pennycooke e Towill (2000), o efeito tóxico do PVS2 também pode ser atenuado por meio da imersão dos explantes em solução crioprotetora, antes da exposição ao PVS2. Hirai e Sakai (2003) observaram uma maior taxa de

recuperação de explantes para aqueles imersos em solução crioprotetora (contendo glicerol e sacarose), em comparação com os explantes que não passaram por essa solução. Ao trabalharem com a técnica de encapsulamento-vitrificação, Hirai e Sakai (2003) otimizaram o tempo de imersão dos explantes de batata-doce em solução crioprotetora para três horas, o mesmo tempo utilizado no experimento de encapsulamento-vitrificação, no presente trabalho.

O efeito tóxico do PVS2 fica bem evidente quando os explantes submetidos à solução de PVS2 e não imersos em NL, não sobreviveram (C3 no 1º, 2º e 3º ensaios - Figuras de 13 a 15 e C5 no experimento de encapsulamento-vitrificação - Figura 17). Os explantes submetidos ao PVS2 e imersos em NL sofreram um estresse ainda maior ao serem submetidos à baixa temperatura e também não sobreviveram (T1 e C1 no 1º, 2º, 3º e 4º ensaios - Figuras de 13 a 16 e T1, T2, T3, T4, C4 e C5 no experimento de encapsulamento-vitrificação - Figura 17). O PVS2 apresentou elevada toxicidade, danificando os explantes de batata-doce. É provável que o tempo de exposição ao PVS2, mesmo nos tratamentos que não foram submetidos ao NL, tenha resultado em danos irreversíveis às células. No trabalho de Towill e Jarret (1992), a exposição direta dos explantes de batata-doce ao PVS2, sem imersão em NL, também ocasionou 100% de mortalidade, no entanto, a taxa de sobrevivência pôde ser aumentada para 54% quando os autores expuseram os explantes gradativamente (60%, 80% e por fim 100%) em soluções de PVS2 diluídas em meio MS líquido.

A adição de diferentes reguladores de crescimento (ANA, BA e KIN no 2º e 3º ensaios; BA e GA₃ no 4º ensaio e no experimento) (Figuras de 14 a 17 / Tabelas de 6 a 9) ou não adição (no 1º ensaio) (Figura 13 / Tabela 5) no meio de recuperação dos explantes não foi suficiente para o desenvolvimento dos mesmos após a criopreservação. Diferentes concentrações de reguladores de crescimento foram utilizadas por Pennycooke e Towill (2000), no meio de recuperação de gemas axilares de batata-doce, de um genótipo proveniente da *Southern Regional Plant Introduction Station* em Griffin, no estado da Georgia - EUA. Pennycooke e Towill (2000) observaram que a concentração de reguladores composta por 1,0 µmol L⁻¹ de ANA, 0,5 µmol L⁻¹ de BA e 0,1 µmol L⁻¹ de KIN, foi a que proporcionou melhor recuperação dos explantes, sem a formação de calos. Enquanto que, no presente estudo, utilizando a mesma concentração para ANA, BA e KIN, no 2º e 3º ensaios, a recuperação dos explantes não foi observada.

A retirada do amônio no terceiro ensaio nos primeiros cinco dias de recuperação dos explantes não foi suficiente para que os mesmos criopreservados sobrevivessem (Figura 15 / Tabela 7). O amônio foi retirado do meio de recuperação, pois segundo Pennycooke e Towill (2001), o amônio é tóxico para as células congeladas e a sobrevivência dos explantes pode ser melhorada pela exclusão deste no meio de recuperação nos primeiros dias. Pennycooke e Towill (2001), ao trabalharem com quatro genótipos pertencentes à *Southern Regional Plant Introduction Station* em Griffin, no estado da Georgia – EUA, obtiveram taxas de recuperação entre 62 a 93% nos diferentes genótipos estudados. A taxa de sobrevivência dos explantes criopreservados foi aumentada em até três vezes, quando os mesmos eram colocados em meio MS sem amônio durante os primeiros cinco dias de recuperação, em relação àqueles cultivados diretamente em meio MS contendo amônio.

A presença de luz no quarto ensaio (Figura 16 / Tabela 8) e no experimento de encapsulamento-vitrificação (Figuras 17 / Tabelas 9), ou a ausência de luz nos três primeiros ensaios (de vitrificação em gotículas) (Figuras 13 a 15 / Tabelas 5 a 7), nos primeiros dias em meio de recuperação, também não causou efeito positivo na sobrevivência dos explantes. Pennycooke e Towill (2000), trabalhando com a técnica de vitrificação em gotículas obtiveram 66% de sobrevivência em explantes de batata-doce, quando os mesmos foram submetidos à ausência de luz nos primeiros dias de recuperação. Hirai e Sakai (2003), trabalhando com a técnica de encapsulamento-vitrificação em batata-doce, também obtiveram bons resultados de sobrevivência dos explantes, utilizando a luz desde os primeiros dias de recuperação. A luz pode ser um fator determinante no desenvolvimento dos explantes após o congelamento, podendo contribuir para as respostas variáveis à criopreservação, observadas frequentemente em batata-doce (Pennycooke e Towill, 2000).

Para a montagem dos quatro ensaios e do experimento de encapsulamento-vitrificação, foram utilizadas gemas axilares (1º, 2º e 3º ensaios) e segmentos nodais (4º ensaio e experimento de encapsulamento-vitrificação) com comprimento aproximadamente entre 0,5 e 2 mm (retirados a olho nu), provenientes de plantas conservadas *in vitro* com idade de doze semanas. Em seus trabalhos, Pennycooke e Towill (2000 e 2001), utilizaram gemas axilares com comprimento entre 0,5 e 1 mm, provenientes de plantas conservadas *in vitro*

com idade de oito semanas. Já Hirai e Sakai (2003), utilizaram segmentos nodais com aproximadamente 1 mm, provenientes de plantas conservadas *in vitro*, porém a idade das plantas, para a retirada dos explantes, não foi informada. Segundo Takagi (2000), o explante mais adequado para o sucesso da criopreservação consiste do meristema apical com um primórdio foliar, medindo de 0,5 a 2 mm de comprimento, dependendo da espécie, sendo que, no presente estudo, foi utilizado o mesmo comprimento para as gemas axilares e segmentos nodais.

No presente estudo, a retirada das gemas axilares (1º, 2º e 3º ensaios) e dos segmentos nodais (4º ensaio e experimento de encapsulamento-vitrificação) das plantas cultivadas *in vitro* ocorreu independentemente da posição na planta e a distribuição dos mesmos entre os tratamentos foi aleatória. Segundo Pennycooke e Towill (2000), a posição dos explantes na planta *in vitro* também tem efeito na sobrevivência dos mesmos após a criopreservação. Os autores sugerem que isto pode estar relacionado com os níveis endógenos de açúcares e ao tamanho dos explantes. Porém, é uma prática comum entre os autores, a retirada dos explantes das plantas cultivadas *in vitro*, independente da posição e a distribuição aleatória dos mesmos entre os tratamentos. No presente estudo, não foram utilizadas gemas axilares próximas à base das plantas, pois Pennycooke e Towill (2000) observaram que os explantes próximos à base das plantas apresentavam taxa de sobrevivência de 0% após a exposição ao PVS2 e ao NL.

O sucesso da criopreservação não é apenas determinado pela técnica da criopreservação em si, mas também pela condição dos explantes. O explante extraído deve estar em um estado fisiológico adequado para aquisição da osmotolerância à desidratação e ao congelamento (Sakai, 1998). Portanto, o tamanho ideal combinado com o adequado estado fisiológico do explante é um dos fatores essenciais para obtenção de alta taxa de sobrevivência após o descongelamento (Takagi, 2000).

Em virtude dos resultados negativos obtidos com a técnica de vitrificação em gotículas nos três primeiros ensaios (Figuras 13 a 15), foi utilizada a técnica de encapsulamento-vitrificação, no quarto ensaio (Figura 16) e no experimento (Figura 17), pois nesta técnica os explantes encapsulados não ficam em contato direto com o PVS2, diminuindo, assim, a sua toxicidade. O encapsulamento dos explantes (sem exposição ao PVS2) (C2) não impediu o desenvolvimento dos

mesmos, uma vez que a altura e o número de folhas foram maiores no controle, onde os explantes foram encapsulados (C2) em relação ao controle onde os explantes não foram encapsulados (C1) (Figura 17 / Tabela 9). Os explantes encapsulados sofrem uma desidratação mais lenta durante a exposição ao PVS2. Além disso, os explantes encapsulados são mais fáceis de manipular e permitem uma maior flexibilidade na manipulação de grandes quantidades de material, pois o intervalo de tempo nas etapas desta técnica é maior em relação à vitrificação em gotículas (Sakai e Engelmann, 2007, Sakai et al., 2008).

Apesar de todas as vantagens envolvendo a técnica de encapsulamento-vitrificação, a mesma também não foi eficiente na criopreservação dos acessos de batata-doce, uma vez que ocorreu a morte dos explantes em todos os tratamentos, tanto quando os explantes foram submetidos ao PVS2 em temperatura ambiente (27°C), como também quando os explantes foram submetidos ao PVS2 no banho de gelo (0°C), nos tempos 0', 30' e 60' (Figura 17 / Tabela 9). Em seus trabalhos, Pennycooke e Towill (2000 e 2001) e Hirai e Sakai (2003) submeteram os explantes de batata-doce ao PVS2 sempre em temperatura ambiente (27°C), pois os autores alegaram que a batata-doce é uma planta sensível ao frio e a utilização de temperaturas mais baixas podem provocar lesões nos explantes afetando a taxa de sobrevivência, o que pode ser corroborado no presente estudo. A batata-doce se desenvolve melhor em locais ou épocas em que a temperatura média é superior a 24 °C (Silva et al., 2004) e no seu ambiente natural (condições *ex vitro*), ela não suporta bem as baixas temperaturas, mantendo esta característica quando cultivada *in vitro* (Vettorazzi, 2013).

As diferentes técnicas de criopreservação, tanto a vitrificação em gotículas (Pennycooke e Towill, 2000; Pennycooke e Towill, 2001) quanto o encapsulamento-vitrificação (Hirai e Sakai, 2003), não foram eficientes para os diferentes genótipos de batata-doce estudados (Figuras 13 a 17). Mesmo baseando-se em protocolos pré-existentes para a espécie, estes não funcionaram para os acessos de batata-doce em estudo, uma vez que o material era geneticamente diferente do material dos protocolos pré-existentes, além do material também ser de locais distintos (Tabela 2). Pennycooke e Towill (2000 e 2001) utilizaram em seus trabalhos, genótipos provenientes da *Southern Regional Plant Introduction Station* em Griffin, no Estado da Georgia - EUA, enquanto que

Hirai e Sakai (2003) trabalharam com genótipos provenientes do *Kagoshima Biotechnology Institute* de Kagoshima – Japão. Ambos os trabalhos utilizam genótipos provenientes de regiões com temperaturas menores em relação à temperatura do país onde o estudo foi realizado (Brasil). Em regiões mais frias, a tolerância do material a ser criopreservado será maior, por isso os protocolos originais, proveniente de locais com temperaturas mais baixas obtiveram sucesso na criopreservação de batata-doce, enquanto que no presente estudo, sendo os genótipos de batata-doce provenientes de local com elevadas temperaturas não houve eficiência na técnica de criopreservação.

Em uma revisão sobre criopreservação de germoplasma de batata-doce publicada por Feng et al. (2011), os autores relatam que a última publicação sobre criopreservação de batata-doce foi no ano de 2008 por Wang e Valkonen, utilizando a técnica de encapsulamento-vitrificação.

Os protocolos utilizados no presente trabalho devem ser testados em outros acessos de batata-doce, além disso, deve ser testada a exposição gradual dos explantes em soluções de PVS2 diluídas em meio MS líquido, com o objetivo de diminuir o efeito tóxico do PVS2.

6. CONCLUSÕES

- A caracterização morfológica e molecular possibilitou inferir uma alta variabilidade dos acessos de batata-doce que fazem parte da Coleção de Germoplasma de batata-doce da UENF, apontando boas perspectivas para o programa de melhoramento genético desta cultura.

- Apesar das contaminações, todos os acessos foram estabelecidos *in vitro* e a coleção de germoplasma de batata-doce *in vitro* foi implantada na UENF.

- As técnicas de vitrificação em gotículas e de encapsulamento-vitrificação baseadas em protocolos pré-existentes para a espécie não foram eficientes para a criopreservação dos diferentes genótipos de batata-doce estudados.

- A não sobrevivência dos explantes de batata-doce criopreservados deve-se, provavelmente, à toxicidade do PVS2 e à origem dos genótipos utilizados nos experimentos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adela, H., Deliu, C. (2006) Cryopreservation of strawberry shoot tips by encapsulationdehydration. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 34:28-33.
- Amaral, L. (2005) *Conservação e propagação in vitro de três cultivares híbridas de amarílis*. Dissertação (Mestrado em Melhoramento Genético) - Campinas, Instituto Agronômico de Campinas, 119 p.
- Anuário Brasileiro de Hortaliças. (2014) Reetz, E.R. Santa Cruz do Sul, *Gazeta Santa Cruz*, 2014. 88 p.
- Assy-Bah, B., Engelmann, F. (1992) Cryopreservation of mature embryos of coconut (*Cocos nucifera* L.) and subsequent regeneration of plantlets. *Cryo-Letters*, 13:117-126.
- Augustin, E., Garcia, A., Rocha, B.H.G. (2000) Caracterização de variedades de batata-doce (*Ipomoea batatas*) através de descritores morfológicos e isoenzimáticos. *Ciência Rural*, 30:49-53.
- Austin, D.F. (1988) The taxonomy, evolution and genetic diversity of sweet potatoes and related wild species *In: Exploration, maintenance and utilization of sweet potato genetic resources In: Proceedings of the First Planning Conference*, Lima, Peru, International Potato Center (CIP), p. 27-59.

- Barrueto Cid, L.P. (2001) A propagação *in vitro* de plantas. O que é isso? *Biotecnologia*, 19:16-21.
- Borém, A., Miranda, G.V. (2009) *Melhoramento de plantas*, 5. ed., Viçosa, MG: Ed. UFV, p.56-65.
- Borges, A., Rosa, M.S., Recchia, G.H., Queiroz-Silva, J.R., Bressan, E.A., Veasey, E.A. (2009) CTAB methods for DNA extraction of sweet potato for microsatellite analysis. *Scientia Agrícola*, Piracicaba, 64:529-534.
- Bussab, W.O., Miazaki, E.S., Andrade, D.F. (1990) Introdução à Análise de Agrupamentos. *In: 9º Simpósio Nacional de Probabilidade e Estatística, São Paulo*. Associação Brasileira de Estatística, 105p.
- Cardoso, D.L., Luz, L.N., Pereira, T.N.S. (2011) *Estratégias em melhoramento de plantas*, Viçosa, MG: Arka, p.121-129.
- Carelli, B.P. (2003) *Estimativa de variabilidade genética em acessos crioulos e cultivares comerciais de tomates (Lycopersicon esculentum Mill.) do sul do Brasil e avaliação da presença do gene Mi*. Tese (Doutorado) - São Carlos - SP, Universidade Federal de São Carlos (UFSCAR), 115p.
- Carvalho, M.F., Crestani, M., Farias, F.L., Meirelles, J.L., Bogo, A., Guidolin, A.F. (2008) Caracterização da diversidade genética entre acessos crioulos de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) coletados em Santa Catarina por marcadores RAPD. *Ciência Rural*, Santa Maria, 38:1522-1528.
- Cavalcante, M. (2008) *Caracterização morfológica, desempenho produtivo e divergência genética de genótipos de batata-doce*. Dissertação de mestrado - Universidade Federal de Alagoas. 61p.
- Cavalcante, M., Ferreira, P.V., Paixão, S.L., Costa, J.G., Pereira, R.G., Madalena, J.A.S. (2009) Potenciais produtivo e genético de clones de batata-doce. *Acta Scientiarum. Agronomy*, 31:421-426.
- CGIAR 2015. Genebanks: investing in biodiversity for future generations. Disponível em: <<http://www.cgiar.org/consortium-news/genebanks-investing-in-biodiversity-for-future-generations/>> Acesso em: 31 de agosto de 2015.

- Chávez, R., Sánchez, T., Iglesias, C.C. (2006) Caracterización morfológica y molecular de genótipos mejorados de camote (*Ipomoea batatas*) para ecosistemas Árido-Salino-Bórico. *Ciência e Desenvolvimento*, 8:84-115.
- Cole-Rodgers, P., Smith, D.W., Bosland, P.W. (1997) A novel statistical approach to analyse genetic resource evaluations using *Capsicum* as an example. *Crop Science*, 37(3):1000(3).
- Cruz, C.D. (2013) GENES - a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. *Acta Scientiarum*, 35(3):271-276.
- Cruz, C.D., Regazzi, A.J. (2004) *Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético*. Viçosa: UFV. 2ª edição revisada, 390p.
- Daros, M., Amaral Jr., A.T., Pereira, T.N.S., Leal, N.R., Freitas, S.P., Sediyaama, T. (2002) Caracterização morfológica de acessos de batata-doce. *Horticultura Brasileira*, 20:43-47.
- Ding, F., Jin, S., Hong, N., Zhong, Y., Cao, Q., Yi, G., Wang, G. (2008) Vitrification - cryopreservation, an efficient method for eliminating *Candidatus Liberobacter asiaticus*, the citrus Huanglongbing pathogen, from *in vitro* adult shoot tips. *Plant Cell Reports*, 27:241-250.
- Dorion, N., Kadri, M., Bigot, C. (1991) *In vitro* preservation at low temperature of rose plantlets usable for direct acclimatization. *Acta Horticulturae*, 298:335-343.
- Dumet, D., Engelmann, F., Chabrillange, N., Duval, Y. (1993) Cryopreservation of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) somatic embryos involving a desiccation step. *Plant Cell Reports*, 12:352-355.
- Elameen, A., Fjellheim, S., Larsen, A., Rognli, O.A., Sundheim, L., Msolla, S., Masumba, E., Mtunda, K., Klemsdal, S.S. (2008) Analysis of genetic diversity in a sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) germplasm collection from Tanzania as revealed by AFLP. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 55:397-408.
- Embrapa (2008) Brasil terá quarto maior banco de germoplasma. Disponível em: <<http://www.cenargen.embrapa.br/cenargenda/noticias/anba2904.pdf>>
Acesso em: 31 de agosto de 2015.

- Embrapa (2010) Conservação de germoplasma vegetal. Disponível em: <http://www.cenargen.embrapa.br/_tt/tt04_02conservacao.html> Acesso em: 31 de agosto de 2015.
- Embrapa (2015) PA3 - Banco Ativo de Germoplasma de Batata-doce. Disponível em: < <http://plataformarg.cenargen.embrapa.br/rede-vegetal/projetos-componentes/pc14-bancos-de-germoplasma-de-raizes-e-tuberculos/planos-de-acao/pa3-banco-ativo-de-germoplasma-de-batata-doce>> Acesso em: 31 de agosto de 2015.
- Engelmann, F. (1997) Importance of desiccation for the cryopreservation of recalcitrant seed and vegetatively propagated species. *Plant Genetic Resources*, 112:9-18.
- Engelmann, F. (2004) Plant cryopreservation: progress and prospects. *In vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 40:427-433.
- Engelmann, F. (2011) Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. *In vitro Cellular and Development Biology - Plant*, 47:5-16.
- Engelmann, F., Dussert, S. (2013) Cryopreservation. *In: Normah, M.N., Chin, H.F., Reed, B.M. (Eds.). Conservation of Tropical Plant Species*. Springer, New York, 107-119.
- Engelmann, F., Gonzalez-Arno, M.T., Wu, Y., Escobar, R. (2008) The development of encapsulation dehydration. *In: Reeb BM (ed.) Plant cryopreservation: a practical guide*. Springer, New York, p. 3-13.
- FAO (2011) Disponível em: < <http://www.fao.org>>. Acesso em: 15 de outubro de 2011.
- Faria, G.A., Costa, M.A.P.C., Junghans, T.G., Ledo, C.A.S., Souza, A.S. (2006) Efeito da sacarose e sorbitol na conservação *in vitro* de *Passiflora giberti* N. E. Brown. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal - SP, 28(2):267-270.
- Feng, C., Yin, Z., Ma, Y., Zhang, Z., Chen, L., Wang, B., Li, B., Huang, Y., Wang, Q. (2011) Cryopreservation of sweetpotato (*Ipomoea batatas*) and its pathogen eradication by cryotherapy. *Biotechnology advances*, 29(1): 84-93.

- Ferrari, M.D., Guigou, M., Lareo, C. (2013) Energy consumption evaluation of fuel bioethanol production from sweet potato. *Bioresource Technology*, 136:377-84.
- Ferreira, M.E., Grattapaglia, D. (1998) *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética*. 3. ed. Brasília: Embrapa-Cenargen, 220p.
- Fortes, G.L.R., Pereira, J.E.S. (2001) Preservação *in vitro* da batata com ácido acetilsalicílico e duas fontes de carboidrato. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, 36(10):1261-1264.
- Fuglie, K., Liming, Z.L., Salazar, T. (1999) Economic impact of virus-free sweet potato planting material in shandong province, China. *International Potato Center: Lima, Peru*, 23:219-224.
- George, E.F., De Klerk, G-J. (2008) The Components of Plant Tissue Culture Media I: Macro- and Micro-Nutrients. *In: George, E.F., Hall, M.A., De Klerk, G-J. Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition*. Springer. p. 65-114.
- Golmirzaie, A.M., Panta, A., Diaz, S. (2000) Systematic determination of an adequate method for large-scale sweetpotato cryopreservation at CIP. *JIRCAS Japan International Research Center for Agricultural Sciences*, 8:460-2.
- Gonzalez-Arno, M.T., Engelmann, F. (2006) Cryopreservation of plant germplasm using the encapsulation-dehydration technique: review and case study on sugarcane. *Cryo-Letters*, 27:155-168.
- Guedes, M.C. (2004) Antocianinas: pigmento natural ou remédio? *Revista Científica do IMAPES*, p. 71-73.
- Hao, Y.J., Deng, X.X. (2003) Genetically stable regeneration of apple plants from slow growth. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 72(03):253-260.
- Huang, J.C., Sun, M. (2000) Genetic diversity and relationship of sweet potato and its wild relatives in *Ipomoea* series *Batatas* (Convolvulaceae) as revealed by intersimple sequence repeat (ISSR) and restriction analysis of chloroplast DNA. *Theoretical and Applied Genetics*, 100:1050-1060.

- He, X., Liu, Q., Ishiki, K., Zhai, H., Wang, Y. (2007) ISSR analysis of genetic diversity and relationships among sweet potato (*Ipomoea batatas*) landraces in China. *Plant Genetics and Breeding*, 150:35-41.
- Hirai, D., Sakai, A. (2003) Simplified cryopreservation of sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) by optimizing conditions for osmoprotection. *Plant Cell Reports*, 21: 961-966.
- Hirosse, E.H., Creste, J.E., Custódio, C.C., Machado-Neto, N.B. (2012) *In vitro* growth of sweet potato fed with potassium phosphite. *Acta Scientiarum Agronomy*, 34:85-91.
- Hu, J., Nakatani, M., Lalusin, A.G., Kuranouch, T., Fujimura, T. (2003) Genetic analysis of sweetpotato and wild relatives using inter-simple sequence repeats (ISSRs). *Breeding Science*, 53:297-304.
- Huamán, Z. (1991) *Descriptors for sweet potato*. Rome: International Board for Genetic Resources/Centro Internacional de la Papa/Asian Vegetable Research and Development Center, 134p.
- Huamán, Z. (1992) Systematic botany and morfology of the sweetpotato plant. *Technical Information Bulletin*, 25. Lima: CIP, 22p.
- Huamán, Z., De La Puente, F. (1988) Development of a sweet potato gene bank at CIP. *CIP Circular*, 16:1-10.
- Inibap (2006) *Global conservation strategy for Musa (banana and plantain)*. Montpellier: International network for the improvement of banana and plantain. 27p.
- Islam, M.D.T., Leunufna, S., Dembele, D.P., Keller, E.R.J. (2003) *In vitro* conservation of four mint (*Mentha* spp.) accessions. *Plant Tissue Culture*, 13(1):37-46.
- Jones, A. (1967) Should Nishiyama's K123 (*Ipomoea trifida*) be designated *I. batatas*? *Economic Botany*, 21(2):163-166.
- Joshi, S.P., Gupta, V.S., Aggarwal, R.K., Ranjekar, P.K., Brar, D.S. (2000) Genetic diversity and phylogenetic relationship as revealed by inter simple sequence

- repeat (ISSR) polymorphism in the genus *Oryza*. *Theoretical and Applied Genetics*, 100:1311-1320.
- Kovalchuk, I., Lyudvikova, Y., Volgina, M., Reed, B.M. (2009) Medium, container and genotype all influence *in vitro* cold storage of apple germplasm. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 96(2):127-136.
- Lambardi, M., Benelli, C., Carlo, A., Fabbri, A., Grassi, S., Lynchet, P.T. (2002) Medium- and long-term *in vitro* conservation of olive germplasm (*Olea europaea* L.). *Acta Horticulturae*, 586:109-112.
- Lemos, E.E.P., Ferreira, M.S., Alencar, L.M.C., Neto, C.E.R., Albuquerque, M.M. (2002) Conservação *in vitro* de germoplasma de cana-de-açúcar. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 37(10):1359-1364.
- Li, P.G., Um, T.H., Deng, L. (2013) Anticancer effects of sweet potato protein on human colorectal cancer cells. *World Journal Gastroenterol*, 19(21): 3300-3308.
- Lin, K.H., Lai, Y.C., Li, H.C., Lo, S.F, Chen, L.F.O., Lo, H.F. (2009) Genetic variation and its relationship to root weight in the sweet potato as revealed by RAPD analysis. *Scientia Horticulturae*, 120:2-7.
- Loebenstein, G. (2009) Origin, distribution and economic importance. *In*: Loebenstein, G., Thottappilly, G. editors. The sweet potato. *Springer*, p. 9-12.
- Miaja, M.L., Gribaudo, I., Vallania, R., Fernandez, L.F. (2000) Low temperature storage and cryopreservation of a *Vitis vinifera* L. germplasm collection: first results. *Acta Horticulturae*, 538:177-181.
- Moulin, M.M. (2010) *Coleta, caracterização e conservação de variedades locais de batata-doce (Ipomoea batatas L. Lam) do Norte do estado do Rio de Janeiro*. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Campos dos Goytacazes - RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), 122p.
- Moulin, M.M., Rodrigues, R., Gonçalves, L.S.A., Sudré, C.P., Pereira, M.G. (2012) A comparison of RAPD and ISSR markers reveals genetic diversity among

- sweet potato landraces (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.). *Acta Scientiarum. Agronomy*, 34(2), 139-147.
- Moulin, M.M., Rodrigues, R., Gonçalves, L.S.A., Sudré, C.P., Santos, M.H., Silva, J.R.P. (2012) Collection and morphological characterization of sweet potato landraces in north of Rio de Janeiro state. *Horticultura Brasileira*, 30:286-292.
- Murashige, T., Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15:473-497.
- Murilo, D.V. (1990) Aspectos econômicos da batata-doce. In: *Encontro de professores, pesquisadores e extensionistas do Rio Grande do Norte*, 4., Mossoró, RN: Escola Superior de Agricultura de Mossoró - ESAM, p.21-28.
- Neto, L.G.P. (2004) *Germinação de sementes de soja armazenadas em banco de germoplasma*. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Lavras. 76p.
- Nick, C., Silva, D.J.H., Mattedi, A.P., Pedrosa, D.A. (2010) Conservação *ex situ* dos recursos fitogenéticos. In: Pereira, T.N.S. (ed.) *Germoplasma: conservação, manejo e uso no melhoramento de plantas*, Viçosa, MG: Arka, p. 59-88.
- Oliveira, A.C.B., Sedyama, M.A.N., Sedyama, T., Finger, F.L., Cruz, C.D. (2002) Variabilidade genética em batata-doce com base em marcadores isoenzimáticos. *Horticultura Brasileira*, Brasília, 20:576-582.
- Ooi, C.P., Loke, S.C. (2012) Sweet potato for type 2 diabetes mellitus. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2:CD009128.
- Painting, K.A., Perry, M.C., Denning, R.A., Ayad, W.G. (1995) *Guidebook for genetic resources documentation*. Rome: IPGRI, 317p.
- Panis, B., Piette, B., Swennen, R. (2005) Droplet vitrification of apical meristems: a cryopreservation protocol applicable to all Musaceae. *Plant Science*, 168:45-55.
- Panis, B., Strosse, H., Van Den Henda, S., Swennen, R. (2002) Sucrose preculture to simplify cryopreservation of banana meristem cultures. *Cryo-Letters*, 23:375-384.

- Panta, A., Panis, B., Ynouye, C., Criel, B., Swennen, R., Roca, W. (2006) Improvement of potato cryopreservation for the long-term conservation of Andean landraces at the International Potato Center (CIP). *Cryobiology*, 53:401.
- Pasqual, M. (2001) *Meios de Cultura*. Lavras: UFLA-FAEPE, 74p.
- Pennycooke, J.C., Towill, L.E. (2000) Cryopreservation of shoot tips from *in vitro* plants of sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) by vitrification. *Plant Cell Reports*, 19: 733–737.
- Pennycooke, J.C., Towill, L.E. (2001) Medium alterations improve regrowth of sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) shoot tips by vitrification and encapsulation-dehydration. *Cryo-Letters*, 22: 381-389.
- Plessis, P., Steponkus, P.L. (1996) Cryopreservation of sweet potato shoot tips by vitrification. *Cryobiology*, 33: 655–656.
- Popova, E., Kim, H.H., Paek, K.Y. (2010) Cryopreservation of coriander (*Coriandrum sativum* L.) somatic embryos using sucrose preculture and air desiccation. *Science Horticulturae*, 124:522-528.
- Qiang, L., Qing-Chang, L., Hong, Z., Dai-Fu, M., Xin, W., Xue-Qin, L., Yu-Ping, W. (2008) Genetic diversity in main parents of sweetpotato in China as revealed by ISSR markers. *Acta Agronomica Sinica*, 34:972–977.
- Qiu, H.G., Huang, J.K., Yang, J. (2010) Bioethanol development in China and the potential impacts on its agricultural economy. *Applied Energy*, 87(1):76-83.
- Rabbani, M.A., Iwabuchi, A., Murakami, Y., Suzuki, T., Takayanashi, K. (1998) Variation and the relationship among mustard (*Brassica juncea*) germplasm from Pakistan. *Euphytica*, 101:357-366.
- Radzan, M.K. (2003) *Introduction to plant tissue culture*. 2^a ed. Enfield: Science Publishers. p. 287-306.
- Ratnaparkhe, M.B., Tekeoglu, M., Muehbauer, F.J. (1998) Inter-simple-sequence repeat (ISSR) polymorphisms are useful for finding markers associated with disease resistance gene clusters. *Theoretical and Applied Genetics*, 97:515-519.

- Reddy, M.P., Sarla, N., Siddiq, E.A. (2002) Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica*, 128:9-17.
- Ritschel, P.S., Huáman, Z. (2002) Variabilidade morfológica da coleção de germoplasma de batata-doce da Embrapa-Centro Nacional de Pesquisas de Hortaliças. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 37:485-492.
- Roca, W.M., Arias, D.I., Chaves, R. (1991) Métodos de conservación *in vitro* del germoplasma. In: Roca, W.M., Mroginski, L.A. (Ed.). *Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones*. Cali: Centro Internacional de Agricultura Tropical, p. 697-714.
- Roesler, P.V.S., Gomes, S.D., Moro, E., Kummer, A.C.B., Cereda, M.P. (2008) Produção e qualidade de raiz tuberosa de cultivares de batata batata-doce no oeste do Paraná. *Acta Scientia Agronômica*, Maringá, 30:117-122.
- Rossel, G., Kriegner, A., Zhang, D.P. (2000) From Latin America to Oceania: The historic dispersal of sweet potato re-examined using AFLP. *CIP Program Report*, p. 315–321.
- 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.
- Sá, A.J., Lédo, A.S., Lédo, C.A.S. (2011) Conservação *in vitro* de mangabeira da região nordeste do Brasil. *Ciência Rural*, Santa Maria, 41(1):57-62.
- Sakai, A. (1998) Development of cryopreservation techniques. In: Engelmann, F., Takagi, H. (eds.) *Cryopreservation of tropical plant germplasm*. IPGRI, Tsukuba: Japan, 1-7.
- Sakai, A., Engelmann, F. (2007) Vitrification, encapsulation-vitrification and droplet vitrification: a review. *Cryo-Letters*, 28:151-172.
- Sakai, A., Hirai, D., Niino, T. (2008) Development of PVS-based vitification and encapsulation-vitrification protocols. In: Reed, B. (ed.) *Plant cryopreservation: a practical guide*. New York: Springer, p. 33-58.

- Sakai, A., Kobayashi, S., Oiyama, I.E. (1990) Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification. *Plant Cell Reports*, 9:30-33.
- Santos, I.R.I. (2004) *Criopreservação de eixos embrionários de espécies de Citrus usando encapsulamento e desidratação*. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. 23p.
- Santos, D.B. (2010) *Procedimentos Multivariados no Agrupamento de Genótipos de Maracujazeiro com Base em Matriz de Distância Conjunta e em Separado para Características Quantitativas e Categóricas*. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) - Cruz das Almas - BA, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), 59p.
- Santos, I.R.I., Salomão, A.N. (2010) *Manual de curadores de germoplasma - vegetal: criopreservação*. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. 17p.
- Santos, M.C., Lédo, A.S., Lédo, C.A.S., Souza, F.V.D., Junior, J.F.S. (2011) Efeito da sacarose e do sorbitol na conservação *in vitro* de segmentos nodais de mangabeira. *Revista Ciência Agronômica*, 42(3):735-741.
- Sarwar, M., Siddiqui, S.U. (2004) *In vitro* conservation of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) germplasm. *Pakistan Journal of Botany*, 36(03):549-556.
- Scapim, C.A., Pires, I.E., Cruz, C.D., Amaral Júnior, A.T., Braccini, A.L., Oliveira, V.R. (1999) Avaliação da diversidade genética em *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh, por meio da análise multivariada. *Revista Ceres*, 46(266):347-356.
- Schnabel-Preikstas, B., Earle, E.D., Steponkus, P.L. (1992) Cryopreservation of sweet potato shoot-tips by vitrification. *Cryobiology*, 29: 738-739.
- Sharma, K., Mishra, A.K., Misra, R.S. (2008) A simple and efficient method for extraction of genomic DNA from tropical tuber crops. *African Journal of Biotechnology*, 7:1018-1022.
- Silva, J.B.C., Lopes, C.A., Magalhães, J.S. (2002) Cultura da batata-doce. In: Cereda, M.P. (ed.) *Agricultura: tuberosas amiláceas latino americanas*. São Paulo: Cargill. 2:449-503.

- Silva, J.B.C., Lopes, C.A., Magalhães, J.S. (2004) *Cultura da batata-doce (Ipomoea batatas L.)*. Brasília: Embrapa-CNPq, Sistema de produção, n. 6.
- Souza, A.B. (2000) Avaliação de cultivares de batata-doce quanto a atributos agronômicos desejáveis. *Ciência Agrotécnica*, Lavras, 24:841-845.
- Souza, J.A. de., Schuch, M.W., Silva, L.C. da., Ferri, J., Soares, G. C. (2007) Solidificante no meio de cultura e tamanho do explante no estabelecimento da propagação *in vitro* de pitangueira (*Eugenia uniflora L.*). *Revista Brasileira de Agrociência*, Pelotas, 13:115-118.
- Spooner, D., Van Treuren, R., De Vicente, M.C. (2005) *Molecular markers for genebank management*. IPGRI. Technical Bulletin nº 10. Disponível em: www.ipgri.cgiar.org/publications/pdf/1082.pdf. International Plant Genetic Resources Institute. Rome, Italy.
- 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.
- Tahtamouni, R.W., Shibli, R.A., Ajlouni, M.M. (2001) Growth responses and physiological disorders in wild pear (*Pyrus syriaca Boiss*) during slow-growth *in vitro* preservation on osmostressing media. *Plant Tissue Culture*, 11(1):15-23.
- Takagi, H. (2000) Recent developments in cryopreservation of shoot apices of tropical species. In: Engelmann, F., Takagi, H. (eds.) *Cryopreservation of tropical plant germplasm current research progress and application*. JIRCAS/IPGRI, p. 178-193.
- Takagi, H., Thinh, N.T., Kyesmu, P.M. (1998) Cryopreservation of vegetatively propagated tropical crops by vitrification. *Acta Horticulturae*, 461: 485-494.
- Teixeira, D.M.C., Nascimento, A.S. (1999) *Redução do crescimento in vitro de batata-doce pela diminuição da disponibilidade de sacarose*. Boletim Técnico da Embrapa, nº 23.

- Thompson, P.G., Hong, L.L., Ukoskit, K., Zhu, Z. (1997) Genetic linkage of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers in sweet potato. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 122:79-82.
- Towill, L.E., Jarret, R.L. (1992) Cryopreservation of sweet potato (*Ipomoea batatas* [L.] Lam.) shoot tips by vitrification. *Plant Cell Reports*, 11: 175-178.
- Uragami, A., Sakai, A., Magai, M. (1990) Cryopreservation of dried axillary buds from plantlets of *Asparagus officinalis* L. grown *in vitro*. *Plant Cell Reports*, 9:328–331.
- Veasey, E.A., Borges, A., Rosa, M.S., Silva, J.R.Q., Bressan, E.A., Peroni, N. (2008) Genetic diversity Brazilian sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.)Lam., Solanales, Convolvulaceae) landraces assessed whit microsatellite markers. *Genetics and Molecular Biology*, Ribeirão Preto, 1(3):725-733.
- Veasey, E.A., Silva, J.R.Q., Rosa, M.S., Borges, A., Bressan, E.A., Peroni, N. (2007) Phenology and morphological diversity of sweet potato (*Ipomoea batatas*) landraces of the Vale do Ribeira. *Scientia Agrícola*, 64:416-427.
- Vettorazzi, R.G. (2013) *Conservação in vitro de variedades de batata-doce (Ipomoea batatas L. Lam) do Norte do Estado do Rio de Janeiro*. Monografia de conclusão de curso - Ciências Biológicas, Campos dos Goytacazes - RJ. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), 41p.
- Wang, M., Shi, Y., Xia, X., Li, D., Chen, Q. (2013) Life-cycle energy efficiency and environmental impacts of bioethanol production from sweet potato. *Bioresource Technology*, 133:285-92.
- Wang, Q., Valkonen, J.P.T. (2009) Cryotherapy of shoot tips: novel pathogen eradication method. *Trends Plant Science*, 14:119-122.
- Wang, Q.C., Valkonen, J.P.T. (2008) Elimination of two viruses which interact synergistically from sweetpotato by shoot tip culture and cryotherapy. *Journal of Virological Methods*, 154:135-45.
- Withers, L.A. (1991) *In vitro* conservation. In: Hawkes, J.G. (ed.) *Genetic conservation of world crop plants*. San Diego: Academic, p. 31-42.

- Withers, L.A., Williams, J.T. (1998) Conservação *in vitro* de recursos genéticos de plantas. *In: Torres, C.A., Caldas, L.S., Buso, J.A. (Ed). Cultura de tecidos e transformação genética de plantas.* Brasília: Embrapa – SPI: Embrapa, CNPH, p. 297-329.
- Wolfe, A.D., Xiang, Q-Y., Kephart, S.R. (1998) Assessing hybridization in natural populations of *Penstemon* (Scrophulariaceae) using hypervariable intersimple sequence repeat (ISSR) bands. *Molecular Ecology*. 7:1107–1125.
- Zhang, L.M., Wang, Q.M., Liu, Q.C., Wang, Q.C. (2009) Sweetpotato in China. *In: Loebenstein, G., Thottappilly, G. (eds.) Biology and biotechnology of sweet potato.* Springer, p. 325-58.
- Zhang, P., Chen, C., Shen, Y., Ding, T., Ma, D., Hua, Z., Sun, D. (2013) Starch saccharification and fermentation of uncooked sweet potato roots for fuel ethanol production. *Bioresource Technology*, 128:835-8.
- Zietkiewicz, E., Rafalski, A., Labuda, D. (1994) Genome fingerprint by simple sequence repeat (SSR) anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, 20:176-183.