

Ácido ascórbico e polivinilpirrolidona no cultivo *in vitro* de *Dioscorea* spp.

Ascorbic acid and polyvinylpyrrolidone in the *in vitro* cultivation of *Dioscorea* spp.

Ácido ascórbico y polivinilpirrolidona en el cultivo *in vitro* de *Dioscorea* spp.

Recebido: 02/07/2021 | Revisado: 08/07/2021 | Aceito: 10/07/2021 | Publicado: 22/07/2021

Denise dos Santos Vila Verde

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7773-5097>
Universidade Estadual de Santa Cruz, Brasil
E-mail: denisevilaverde@hotmail.com

Maria Inês De Souza Mendes

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7129-2467>
Universidade Estadual de Santa Cruz, Brasil
E-mail: inessm.123@gmail.com

Antônio da Silva Souza

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4535-7807>
Embrapa Mandioca e Fruticultura, Brasil
E-mail: antonio.silva-souza@embrapa.br

Camila Rodrigues Pinto

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7275-3699>
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Brasil
E-mail: camilarodrigues80@hotmail.com

Leila Vasconcelos Costa Nobre

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5132-3235>
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Brasil
E-mail: leilacosta11@hotmail.com

Jorge Eduardo dos Santos Melo

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0659-2698>
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Brasil
E-mail: jesm5567@gmail.com

Carlos Alberto da Silva Ledo

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9578-4167>
Embrapa Mandioca e Fruticultura, Brasil
E-mail: carlos.ledo@embrapa.br

Resumo

A oxidação afeta o crescimento *in vitro*, em função da liberação de compostos fenólicos, resultando no escurecimento dos tecidos e, por consequência, na morte de explantes e de plantas. Diante disso, este trabalho teve como objetivo estudar o efeito do ácido ascórbico e do polivinilpirrolidona (PVP) no cultivo *in vitro* do inhame, visando a redução ou eliminação da oxidação dos explantes e a otimização do crescimento dos genótipos *D. alata* var. *purpurea* (Roxb.) A. Pouchet e *D. rotundata* Poir. Nesse experimento, segmentos nodais de aproximadamente 1 cm de tamanho, extraídos de plantas previamente cultivados *in vitro*, foram introduzidas em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio de cultura 2GGC, acrescido de 30 g L⁻¹ de sacarose, solidificado com 2,2 g L⁻¹ de Phytigel® e pH ajustado a 5,8 antes da autoclavagem. Ao meio básico foram acrescidos dois antioxidantes, compondo dois experimentos distintos. No primeiro experimento, foi utilizado o ácido ascórbico nas concentrações de 0 mg L⁻¹; 25 mg L⁻¹; 50 mg L⁻¹; 75 mg L⁻¹ e 100 mg L⁻¹; e no segundo o PVP, nas doses de 0 mg L⁻¹; 50 mg L⁻¹; 100 mg L⁻¹; 150 mg L⁻¹ e 200 mg L⁻¹. Cada experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 5 x 2 (concentrações de antioxidante x genótipos), contendo 12 repetições por tratamento. Após 90 dias de manutenção em sala de crescimento, procedeu-se a avaliação do desenvolvimento das plantas e observou-se que os antioxidantes ácido ascórbico e polivinilpirrolidona não promoveram melhorias nas variáveis de crescimento.

Palavras-chave: Compostos fenólicos; Micropropagação; Cultivo *in vitro*; Oxidação.

Abstract

Oxidation affects *in vitro* growth, due to the release of phenolic compounds, resulting in tissue darkening and, consequently, in the death of explants and plants. Therefore, this work aimed to study the effect of ascorbic acid and polyvinylpyrrolidone (PVP) in the *in vitro* cultivation of yam, aiming at reducing or eliminating the oxidation of explants and optimizing the growth of genotypes *D. alata* var. *purpurea* (Roxb.) A. Pouchet and *D. rotundata* Poir. In this experiment, nodal segments of approximately 1 cm in size, extracted from plants previously cultivated *in vitro*, were introduced into test tubes containing 10 mL of 2GGC culture medium, added with 30 g L⁻¹ of sucrose, solidified with 2.2 g L⁻¹ of Phytigel® and pH adjusted to 5.8 before autoclaving. Two antioxidants were added to the basic medium, making up two distinct experiments. In the first experiment, ascorbic acid was used at concentrations of 0 mg

L⁻¹; 25mg L⁻¹; 50 mg L⁻¹; 75 mg L⁻¹ and 100 mg L⁻¹; and in the second, PVP, at doses of 0 mg L⁻¹; 50 mg L⁻¹; 100 mg L⁻¹; 150 mg L⁻¹ and 200 mg L⁻¹. Each experiment was installed in a completely randomized design, in a 5 x 2 factorial scheme (antioxidant concentrations x genotypes), containing 12 replicates per treatment. After 90 days of maintenance in the growth room, plant development was evaluated and it was observed that the antioxidants ascorbic acid and polyvinylpyrrolidone did not improve the growth variables.

Keywords: Phenolic compounds; Micropropagation; *In vitro* cultivation; Oxidation.

Resumen

La oxidación afecta el crecimiento *in vitro*, debido a la liberación de compuestos fenólicos, lo que resulta en el oscurecimiento de los tejidos y, en consecuencia, en la muerte de explantes y plantas. Por tanto, este trabajo tuvo como objetivo estudiar el efecto del ácido ascórbico y polivinilpirrolidona (PVP) en el cultivo *in vitro* de ñame, con el objetivo de reducir o eliminar la oxidación de explantes y optimizar el crecimiento de *D. alata* var. *purpurea* (Roxb.) A. Pouchet y *D. rotundata* Poir. En este experimento se introdujeron segmentos nodales de aproximadamente 1 cm de tamaño, extraídos de plantas previamente cultivadas *in vitro*, en tubos de ensayo que contenían 10 mL de medio de cultivo 2GGC, adicionados con 30 g L⁻¹ de sacarosa, solidificado con 2.2 g L⁻¹ de Phytigel® y el pH se ajustó a 5,8 antes de esterilizar en autoclave. Se agregaron dos antioxidantes al medio básico, formando dos experimentos distintos. En el primer experimento, se utilizó ácido ascórbico en concentraciones de 0 mg L⁻¹; 25 mg L⁻¹; 50 mg L⁻¹; 75 mg L⁻¹ y 100 mg L⁻¹; y en el segundo, PVP, a dosis de 0 mg L⁻¹; 50 mg L⁻¹; 100 mg L⁻¹; 150 mg L⁻¹ y 200 mg L⁻¹. Cada experimento se instaló en un diseño completamente al azar, en un esquema factorial 5 x 2 (concentraciones de antioxidantes x genotipos), conteniendo 12 réplicas por tratamiento. Luego de 90 días de mantenimiento en la sala de crecimiento, se evaluó el desarrollo de la planta y se observó que los antioxidantes ácido ascórbico y polivinilpirrolidona no mejoraron las variables de crecimiento.

Palabras clave: Compuestos fenólicos; Micropropagación; Cultivo *in vitro*; Oxidación.

1. Introdução

O inhame ocupa o quarto lugar em importância global entre as plantas produtoras de raízes e tubérculos (Garcia et al., 2011). Trata-se de uma cultura muito importante para as populações de países tropicais, como aqueles localizados no Oeste da África, principalmente a Nigéria e a Costa do Marfim (Bömer et al., 2019), sendo a principal fonte de segurança alimentar ao concentrar 95% do total que é produzido no mundo (Brito et al., 2011). O Brasil é o segundo maior produtor de inhame da América Latina (Da Silva Simões et al., 2016), com destaque para as regiões Nordeste e Sudeste, servindo como fonte alimentícia e de renda aos pequenos e médios agricultores.

Contudo, como o inhame é propagado de forma vegetativa por meio de túberas-semente, suas plantas ficam submetidas à infecções virais e patológicas que afetam consideravelmente a sua produção, além de causarem danos à conservação dos tubérculos e gerarem erosão genética das variedades e espécies (Aighewi et al., 2015; Sedâmi et al., 2017). Segundo Das et al. (2013), o método convencional de reprodução do inhame é demorado, não sendo adequado para ser utilizado em um sistema de multiplicação rápida.

Uma das alternativas para solucionar esses problemas é a propagação *in vitro*, que pode ajudar a superar as restrições relacionadas à disponibilidade de material de plantio de alta qualidade fitossanitária, mediante o controle de patologias (Vaillant et al., 2005), possibilitando, assim, fornecer ao mercado tubérculos suficientes para uma produção sustentável e um rendimento adequado ao consumo humano (Taha & Abdelaziz, 2017).

Nesse sentido, alguns trabalhos vêm sendo desenvolvidos em *Dioscorea*, como o de da Silva Simões et al. (2014), onde foram avaliadas diferentes concentrações de sais e vitaminas do meio de cultura, e o de Cabrera et al. (2020), visando estabelecer meios de cultura para a conservação *in vitro* de germoplasma. Contudo, ainda é necessário a otimização de protocolos de propagação *in vitro* para atender as crescentes demandas por materiais de plantio de qualidade para *D. rotundata*, como cita Uchendu et al. (2016).

No estabelecimento e multiplicação do inhame *in vitro*, os explantes quando seccionados liberam substâncias que ocasionam o escurecimento dos tecidos e do meio de cultura, além de posterior necrose ou morte do explante, em função da liberação de compostos fenólicos (Melo et al., 1998; Azofeifa-Delgado, 2009). Diante disso, a adição de antioxidantes ao meio

de cultura pode atuar na prevenção da oxidação e polimerização dessas substâncias, além de absorver os produtos da oxidação fenólica (Goulart et al., 2010), permitindo dessa forma um melhor desenvolvimento da planta *in vitro*.

Entre os antioxidantes que podem ser adicionados ao meio de cultura tem-se o PVP e o ácido ascórbico. O PVP é considerado um composto adsorvente (Goulart et al., 2010), polimérico, de alta massa molar, com baixa granulometria, e que possui a habilidade de remover compostos fenólicos de soluções devido à sua baixa solubilidade (Fatibello-Filho & Vieira, 2002). Por sua vez, o ácido ascórbico é capaz de eliminar radicais de oxigênio que são produzidos quando o tecido é seccionado, evitando que as células oxidem, sendo apto para inibir ou prevenir o processo de oxidação (Ndakidemi et al., 2014).

Dessa forma, este trabalho tem como objetivo estudar o efeito da adição do ácido ascórbico e do PVP na redução da oxidação e na otimização do crescimento *in vitro* das plantas dos genótipos *D. alata* var. *purpurea* e *D. rotundata*.

2. Metodologia

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Mandioca e Fruticultura, em Cruz das Almas, Bahia, sendo uma pesquisa quantitativa (Pereira et al., 2018). Segmentos nodais de aproximadamente 1 cm de tamanho foram extraídos de plantas de *D. rotundata* e *D. alata* var. *purpurea*, previamente cultivadas *in vitro*, e introduzidos em tubos de ensaio contendo 10 mL do meio 2GGC (Doukoure et al., 2000), acrescido de 30 g L⁻¹ de sacarose, solidificado com 2,2 g L⁻¹ de Phytigel® e pH ajustado a 5,8 antes da autoclavagem.

No meio básico 2GGC, foram acrescidos os dois antioxidantes, compondo dois experimentos distintos. Para o primeiro experimento, foi utilizado o ácido ascórbico nas concentrações de 0 mg L⁻¹; 25 mg L⁻¹; 50 mg L⁻¹; 75 mg L⁻¹ e 100 mg L⁻¹; e no segundo o PVP nas doses de 0 mg L⁻¹; 50 mg L⁻¹; 100 mg L⁻¹; 150 mg L⁻¹ e 200 mg L⁻¹.

Desse modo, cada experimento foi instalado em um delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 5 x 2 (concentrações de antioxidante x genótipos), contendo 12 repetições por tratamento. Cada parcela experimental foi constituída por um tubo de ensaio contendo um segmento nodal.

Após a introdução no meio de cultura, os explantes foram mantidos em sala de crescimento, com condições de temperatura de 27 ± 1 °C, densidade de fluxo de fótons de 30 μmol m⁻² s⁻¹ e fotoperíodo de 16 horas.

Após 90 dias de cultivo *in vitro*, foram avaliadas as seguintes variáveis: porcentagem de explantes responsivos, altura de parte aérea (APA; em cm), número de folhas verdes (NFV), número de folhas senescentes (NFS), número de brotos (NB), número de segmentos nodais (NSN), número de raízes (NR), massa da matéria fresca da parte aérea (MFPA), massa da matéria fresca de raízes (MFR), massa da matéria seca da parte aérea (MSPA), massa da matéria seca de raízes (MSR), em mg, e comprimento da maior raiz (CR; em cm). Para a determinação da massa seca, o material vegetal foi colocado em estufa de circulação de ar forçado a temperatura de 60° C, até atingir peso constante.

Também foi avaliado o grau de oxidação, de forma subjetiva, utilizando uma escala de classificação, onde: 0= sem oxidação; 1= baixa oxidação; 2= oxidação intermediária; 3= alta oxidação (Utino et al., 2001).

Para calcular a porcentagem de explantes responsivos, foi considerado o número de segmentos nodais regenerados em cada tratamento, e com o percentual de cada tratamento foi obtida a média geral do experimento. Já para o grau de oxidação foi calculada a média para cada genótipo, nas diferentes concentrações dos antioxidantes ácido ascórbico e PVP, e depois obtida a média de ambos os genótipos e para cada dose estudada (média geral).

Os demais dados obtidos foram submetidos ao teste F da análise de variância, com o auxílio do programa estatístico R, versão 3.4 (R Core Team, 2016), utilizando o pacote ExpDes.pt (Ferreira et al., 2018). Para as médias das concentrações dos antioxidantes foram ajustados modelos de regressão polinomial e as médias dos genótipos comparadas pelo teste de F a 5% de probabilidade. Para as variáveis que não atenderam as pressuposições da análise de variância foi utilizado a transformação $\sqrt{x + 0,5}$.

3. Resultados e Discussão

Efeito do ácido ascórbico no controle da oxidação e no crescimento *in vitro* de plantas de inhame

Os segmentos nodais do genótipo *D. alata* var. *purpurea* apresentaram 100% de regeneração na ausência e em todas as doses do ácido ascórbico, enquanto o *D. rotundata* apresentou 75% de regeneração na concentração de 75 mg L⁻¹ e 100% nas demais doses. De maneira geral, os explantes apresentaram 97,5% de regeneração nas condições experimentais em que foram submetidos, taxa superior às obtidas por Behera et al. (2009), em *D. oppositifolia* L., que oscilaram entre 20% e 90% de explantes responsivos cultivados em meio MS sólido suplementado com várias concentrações de cinetina, BAP, ANA e 100 mg L⁻¹ de ácido ascórbico.

Na Tabela 1, o teste F da análise de variância demonstrou que para número de folhas verdes (NFV) houve efeito significativo para os fatores isolados. Para altura de parte aérea (APA), número de brotos (NB), número de segmentos nodais (NSN), massa da matéria fresca de parte aérea (MFPA), massa da matéria seca de parte aérea (MSPA), massa da matéria fresca de raízes (MFR), massa da matéria seca de raízes (MSR) e comprimento da maior raiz (CR) houve efeito significativo para o fator genótipo. Para a interação dos fatores houve efeito significativo para o número de folhas senescentes. Apenas para número raízes (NR) não houve nenhum efeito significativo.

Tabela 1. Resumo da análise de variância das variáveis de crescimento dos genótipos *D. alata* var. *purpurea* e *D. rotundata*, submetidos a diferentes doses de ácido ascórbico no meio de cultura 2GGC.

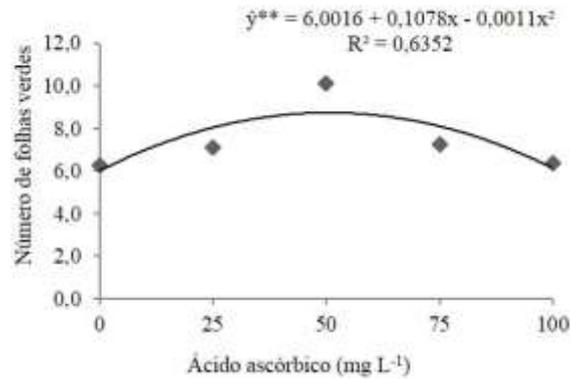
FV	GL	APA	NFV	NFS	NB	NSN	NR	MFPA	MSPA	MFR	MSR	CR
AA	4	0,29 ^{ns}	1,39*	0,45*	0,05 ^{ns}	0,5 ^{ns}	0,37 ^{ns}	58,50 ^{ns}	4,66 ^{ns}	8,39 ^{ns}	0,60 ^{ns}	0,56 ^{ns}
GNT	1	1,40**	3,13**	1,54**	0,46**	3,90**	0,004 ^{ns}	332,44**	10,24*	218,05**	7,98**	79,21**
AA * GNT	4	0,27 ^{ns}	0,57 ^{ns}	0,59**	0,02 ^{ns}	0,51 ^{ns}	0,47 ^{ns}	52,28 ^{ns}	3,64 ^{ns}	9,66 ^{ns}	0,61 ^{ns}	0,85 ^{ns}
Erro	107	0,20	0,40	0,16	0,03	0,28	0,27	30,43	2,17	5,26	0,37	1,09
Média		5,37	7,40	0,36	1,40	3,33	2,19	248,11	21,57	25,43	3,01	10,17
CV (%)		18,27	23,14	49,38	12,8	28,16	33,83	37,7	33,16	53,62	34,81	35,17

FV= fator de variação; GL= grau de liberdade; AA= ácido ascórbico; GNT = genótipo; APA = altura de parte aérea (cm); NFV = número de folhas verdes; NB = número de brotos; NSN = número de segmentos nodais; NR = número de raízes; MFPA = massa da matéria fresca de parte aérea (mg); MSPA= massa da matéria seca de parte aérea (mg); MFR = massa da matéria fresca de raízes (mg); MSR = massa da matéria seca de raízes (mg); CR = comprimento da maior raiz (cm). **, *significativo pelo teste F a 1% e 5% de probabilidade, respectivamente; ^{ns} não significativo a 5% de probabilidade. Fonte: Autores.

Com relação ao coeficiente de variação, o menor valor encontrado foi de 12,8%, para o número de brotos (NB), e o maior, 53,62%, para a massa da matéria fresca de raízes (MFR) (Tabela 1).

A partir do valor estimado obtido através da equação de regressão, a dose ótima para o número de folhas verdes é de 49 mg L⁻¹ de ácido ascórbico, com uma altura máxima estimada de 8,64 cm (Figura 1). Pode-se observar que há um aumento no número de folhas verdes até essa concentração de ácido ascórbico, seguido de um decréscimo progressivo nas demais doses (Figura 1). Para a equação, o coeficiente de determinação (R²) obtido para esta variável foi de 63,52%. Haja vista a presença de uma gema na base de cada folha, o número de folhas é importante porque determina o potencial de propagação da planta. Já para o número de folhas senescentes não foi possível ajuste de equação polinomial com alto valor de R².

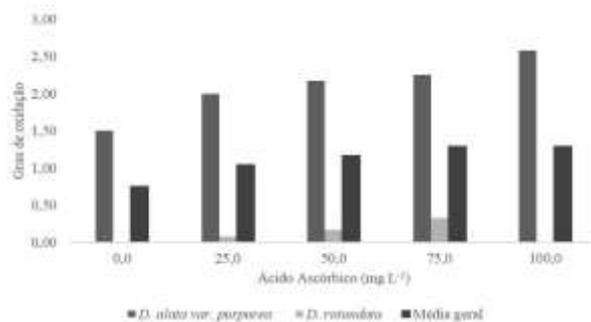
Figura 1. Número de folhas verdes dos genótipos *D. alata* var. *purpurea* e *D. rotundata*, submetidos a diferentes doses de ácido ascórbico no meio de cultura 2GGC, por 90 dias.



Fonte: Autores.

Em todas as doses do ácido ascórbico houve algum grau de oxidação nos explantes, contudo isso não afetou a regeneração, conforme as Figuras 2 e 3. Em acordo com este estudo, Borges et al. (1999), estudando diferentes antioxidantes em *D. alata* L., com a dose de 100 mg L⁻¹ de ácido ascórbico e a presença de PVP, não obtiveram resultados significativos em nenhuma das variáveis. Como se pode observar, as concentrações utilizadas de ácido ascórbico não foram capazes de eliminar a oxidação *in vitro* dos explantes, o que, entretanto, não resultou em baixas porcentagens de explantes responsivos. Contudo, a não significância do número de raízes entre os tratamentos (Tabela 1), que pode ser uma consequência da fenolização, indica uma limitação para um bom enraizamento das plantas (Concepción et al., 2005).

Figura 2. Médias do grau de oxidação dos explantes nos genótipos *D. alata* var. *purpurea* e *D. rotundata*, submetidos a diferentes doses de ácido ascórbico em meio de cultura 2GGC por 90 dias.



Fonte: Autores.

Figura 3. Plantas dos genótipos *D. alata* var. *purpurea* (a) e *D. rotundata* (b) aos 90 dias de cultivo, em meio 2GGC, suplementado com doses de ácido ascórbico de 0 mg L⁻¹; 25 mg L⁻¹; 50 mg L⁻¹; 75 mg L⁻¹ e 100 mg L⁻¹, respectivamente da esquerda para a direita.



Fonte: Autores.

Em bananeira ‘Prata’ (Musa AAB), mesmo com a redução de sais no meio de cultura e empregando a dose de 25 mg L⁻¹ de ácido ascórbico, não foi possível eliminar a oxidação dos explantes. Apesar disso, a adição do ácido ascórbico mostrou-se fundamental para a redução da oxidação e a permanência do explante em meio de cultura por mais tempo (Utino et al., 2001). Já Melo et al. (1998), estudando diferentes antioxidantes em *D. cayenensis*, obtiveram melhor controle da oxidação com a utilização de 150 mg L⁻¹ de ácido ascórbico, entretanto houve um menor número de brotações quando comparado aos antioxidantes PVP e cisteína.

Pode-se observar, na Tabela 2, que para todas as variáveis, exceto para o número de brotos, o genótipo *D. alata* var. *purpurea* apresentou médias superiores ao genótipo *D. rotundata*. Estudando *D. rotundata* e *D. alata*, Adeniyi et al. (2008) observaram que seus resultados de indução e regeneração via meristema foram dependentes das espécies, como também foi verificado nas variáveis avaliadas neste trabalho.

Tabela 2. Médias das variáveis de desenvolvimento para os genótipos *D. alata* var. *purpurea* e *D. rotundata*, submetidos a diferentes doses de ácido ascórbico em meio de cultura 2GGC após 90 dias.

Variáveis	Genótipo	
	<i>D. alata</i> var. <i>purpurea</i>	<i>D. rotundata</i>
Altura de parte aérea (cm)	5,94 a	4,76 b
Número de folhas verdes	8,48 a	6,26 b
Número de brotos	1,23 b	1,58 a
Número de segmentos nodais	4,18 a	2,44 b
Massa fresca de parte aérea (mg)	313,40 a	179,38 b
Massa seca de parte aérea (mg)	25,25 a	17,70 b
Massa fresca de raízes (mg)	40,04 a	8,28 b
Massa seca de raízes (mg)	4,14 a	1,69 b
Comprimento da maior raiz (cm)	15,55 a	3,88 b

Médias seguidas de letras diferentes na linha diferem entre si pelo teste F (P<0,05). Fonte: Autores.

O número de folhas senescentes teve uma média geral de 0,36, não havendo ocorrência na dose de 100 mg L⁻¹ de ácido ascórbico. O genótipo *D. alata* var. *purpurea* não apresentou senescência foliar na ausência e nas doses estudadas de ácido

ascórbico (Tabela 3). Já para o *D. rotundata*, os valores obtidos foram baixos, com médias de 0,17, 0,50, 0,17 folhas senescentes na ausência e nas doses de 25, mg L⁻¹, 50 mg L⁻¹, entretanto houve diferenças estatísticas (Tabela 3) na concentração de 75 mg L⁻¹ de ácido ascórbico com a média de 3,55 folhas senescentes, esse baixo número de folhas senescentes ocorreu provavelmente devido à baixa concentração de etileno nos tubos de ensaio, haja vista que, entre outros processos, ele representa o sinal primário que provoca a abscisão foliar (Kerbaudy, 2004).

Tabela 3. Média da variável número de folhas senescentes dos genótipos *D. alata* var. *purpurea* e *D. rotundata* submetidos a diferentes concentrações de ácido ascórbico em meio de cultura 2GGC, após 90 dias.

Genótipo	Ácido ascórbico (mg L ⁻¹)				
	0,0	25,0	50,0	75,0	100,0
	Número de folhas senescentes				
<i>D. alata</i> var. <i>purpurea</i>	0,00 a	0,00 a	0,00 a	0,00 a	0,00 a
<i>D. rotundata</i>	0,17 a	0,50 a	0,17 a	3,56 b	0,00 a

Médias seguidas por letras diferentes na coluna diferem entre si pelo teste F (P<0,05). Fonte: Autores.

Efeito do polivinilpirrolidona (PVP) no controle da oxidação e no crescimento *in vitro* de plantas de inhame

Nas condições experimentais estudadas empregando o PVP, os segmentos nodais apresentaram uma média de 97,5% de regeneração. O genótipo *D. alata* var. *purpurea* mostrou 100% de regeneração na ausência e na adição das doses de PVP. Já o *D. rotundata* apresentou média de 95%, sendo que houve 75% de regeneração na concentração de 50 mg L⁻¹ de PVP, enquanto nas demais doses e na ausência do PVP ocorreu 100% de regeneração. Como observado, o genótipo utilizado interfere na resposta *in vitro* dos explantes, a exemplo do que acontece com outros fatores, como o estágio de maturação e o nível de regeneração do explante, o meio de cultura, a adição de reguladores de crescimento e as condições de cultivo.

Conforme a análise de variância dos dados (Tabela 4), para o número de brotos (NB) e o número de raízes (NR) houve efeito significativo para o fator PVP. As variáveis número de folhas verdes (NFV), número de segmentos nodais (NSN), massa da matéria fresca de parte aérea (MFPA), massa da matéria seca de parte aérea (MSPA), massa da matéria fresca de raízes (MFR), massa da matéria seca de raízes (MSR) e comprimento da maior raiz (CR) apresentaram efeito altamente significativo para o fator genótipo. Houve efeito significativo na interação (PVP X genótipo) para altura de parte aérea (APA), número de folhas senescentes (NFS), número de raízes (NR) e massa da matéria fresca de raízes (MFR).

Tabela 4. Resumo da análise de variância das variáveis de crescimento dos genótipos *D. alata* var. *purpurea* e *D. rotundata*, submetidos a diferentes doses de polivinilpirrolidona (PVP) em meio de cultura 2GGC.

FV	GL	APA	NFV	NFS	NB	NSN	NR	MFPA	MSPA	MFR	MPSR	CR
PVP	4	0,37**	0,042 ^{ns}	0,00**	0,11*	0,10 ^{ns}	0,57*	22,38 ^{ns}	1,86 ^{ns}	22,28**	0,25 ^{ns}	0,53 ^{ns}
GNT	1	2,68**	7,10**	0,01 ^{ns}	0,03 ^{ns}	13,47**	0,40 ^{ns}	496,68**	25,38**	227,83**	7,22**	84,20**
PVP*GNT	4	0,32**	0,06 ^{ns}	0,01**	0,01 ^{ns}	0,12 ^{ns}	0,81**	40,78 ^{ns}	2,43 ^{ns}	13,40*	0,32 ^{ns}	0,70 ^{ns}
Erro	107	0,09	0,23	0,00	0,04	0,2	0,18	19,00	1,23	4,92	0,26	0,70
Média		5,06	6,8	0,01	1,51	3,35	2,18	221,06	19,39	28,23	2,78	10,81
CV (%)		12,48	18,25	5,86	13,55	23,51	27,04	30,81	25,86	48,76	27,56	26,63

FV= fator de variação; GL= graus de liberdade; PVP = polivinilpirrolidona; GNT = genótipo; APA = altura de parte aérea (cm); NFV = número de folhas verdes; NB = número de brotos; NSN = número de segmentos nodais; NR = número de raízes; MFPA = massa da matéria fresca de parte aérea (mg); MSPA= massa da matéria seca de parte aérea; MFR = massa da matéria fresca de raízes (mg); MSR = massa da matéria seca de raízes; CR = comprimento da maior raiz (cm). **, *significativo pelo teste F a 1% e 5% de probabilidade, respectivamente; ^{ns} não significativo a 5% de probabilidade. Fonte: Autores.

O menor coeficiente de variação dos dados foi obtido para variável altura de parte aérea (APA), com 12,48%, e o maior na massa da matéria fresca de raízes (MFR), com 48,76% (Tabela 4). Para Werner et al. (2012), em cultura de tecidos, o coeficiente de variação elevado é influenciado em função de diversos fatores, como a variabilidade genética do material, a variação somaclonal, a qualidade fisiológica do explante, o genótipo, o tipo do explante, as características do meio de cultura, o tempo e a temperatura de cultivo, e a intensidade luminosa.

Os modelos de equações polinomiais ajustados apresentaram coeficiente de determinação (R^2) de 57,95%, para o número de brotos, e 92,96%, para a massa da matéria fresca de raízes (Tabela 5). Para altura de parte aérea e número de raízes não foi possível o ajuste de equação com sentido biológico.

Tabela 5. Equações de regressão, coeficientes de determinação (R^2), doses ótimas (DO) de polivinilpirrolidona (mg L^{-1}) e valores estimados (VE) de variáveis de desenvolvimento dos genótipos *D. alata* var. *purpurea* e *D. rotundata*, após 90 dias de cultivo *in vitro*.

Fatores	Genótipo	Equação	R^2 (%)	DO	VE
Massa da matéria fresca de raízes (mg)					
PVP (Genótipo)	<i>D. alata</i> var. <i>purpurea</i>	$\hat{y}^{**} = 45,245 - 0,6956x + 0,0045x^2$	92,96	200,00	89,19 ¹
Número de folhas senescentes					
PVP (Genótipo)	<i>D. rotundata</i>	$\hat{y}^{**} = 0,1107 - 0,0019x + 7E-06x^2$	85,71	135,71	-0,02
Número de brotos					
PVP		$\hat{y}^* = 1,53970 - 0,0043x + 0,00003x^2$	57,95	200,00	1,83 ¹

**; *significativo pelo teste F a 1% e 5% de probabilidade, respectivamente pelo teste F da ANOVA. ^{ns} não significativo a 5% de probabilidade. ¹valor baseado na média dos valores observados. Fonte: Autores.

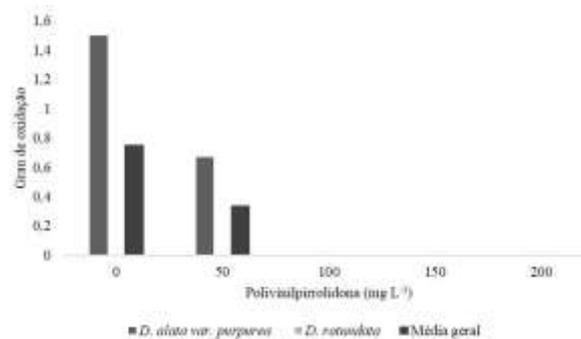
Para o número de folhas senescentes a menor média (-0,02) foi obtida na dose ótima de $135,71 \text{ mg L}^{-1}$ de PVP, conforme a tabela 5.

O número de brotos apresentou a maior média (1,83) na dose ótima de 200 mg L^{-1} de PVP (Tabela 4). Estudando a utilização do PVP, em comparação com outros antioxidantes, Melo et al. (1998) obtiveram o maior número de brotações (3,30) em *D. caynensis* com a concentração de 100 mg L^{-1} desse antioxidante, que, entretanto, não foi capaz de reduzir a oxidação, que ocorreu de forma intensa ou intermediária nas doses estudadas (50 mg L^{-1} , 100 mg L^{-1} e 150 mg L^{-1}). Já em *D. hispida*, dentre diferentes doses de antioxidantes, como o ácido cítrico, a caseína hidrolisada, o sulfato de adenina e o carvão ativado, o PVP, na concentração de 1.000 mg L^{-1} , proporcionou o máximo de brotações, além de eliminar completamente a lixiviação de compostos fenólicos no meio e controlar seu escurecimento (Shukla & Shukla, 2014).

Para a massa da matéria fresca de raízes, a maior média (89,19 mg) também foi alcançada na dose de 200 mg L^{-1} de polivinilpirrolidona (Tabela 5).

Na ausência e na concentração de 50 mg L^{-1} de PVP houve registro de oxidação dos explantes tanto em *D. alata* var. *purpurea* como em *D. rotundata*, nesse caso em um grau bem mais baixo, o que não foi observado nas concentrações mais elevadas do antioxidante. Porém, apesar disso, não houve interferência na regeneração dos explantes (Figuras 4 e 5).

Figura 4. Médias do grau de oxidação do genótipo *D. alata* var. *purpurea* e *D. rotundata*, submetido a diferentes doses de polivinilpirrolidona em meio de cultura 2GGC, por 90 dias.



Fonte: Autores.

Figura 5. Plantas dos genótipos *D. alata* var. *purpurea* (a) e *D. rotundata* (b) aos 90 dias de cultivo no meio 2GGC, suplementado com as doses de polivinilpirrolidona (PVP) de 0 mg L⁻¹; 50 mg L⁻¹; 100 mg L⁻¹; 150 mg L⁻¹ e 200 mg L⁻¹.



Fonte: Autores.

A baixa oxidação dos explantes de *D. alata* var. *purpurea* e a total ausência em *D. rotundata* pode estar relacionada ao genótipo (Azofeifa-Delgado, 2009) e ao grau de maturação dos explantes (Concepción et al., 2005), pois o dano oxidativo geralmente é mais severo durante os estágios iniciais de cultivo (Azofeifa-Delgado, 2009), ocorrendo uma redução com as frequências de subcultivos. Além disso, o meio de cultura 2GGC pode ter influenciado nessa baixa oxidação, já que em sua composição possui 100 mg L⁻¹ de ácido ascórbico, que é caracterizado como uma substância antioxidante.

Em outras espécies do mesmo gênero, a utilização do carvão ativado foi mais eficiente que o PVP no controle da oxidação, como citam Poornima & Ravishankar (2007) em *D. oppositifolia* (Linn) e *D. pentaphylla* (Linn).

Em relação aos dois genótipos estudados, para todas as variáveis, *D. alata* var. *purpurea* apresentou médias estatísticas superiores (Tabela 6). Visando otimizar a concentração de PVP nesse genótipo, Shah & Lele (2012) concluíram que ele foi o aditivo mais eficaz na redução da exsudação fenólica dos segmentos nodais de *D. alata* var. *purpurea*.

Tabela 6. Médias das variáveis de desenvolvimento para os genótipos *D. alata* var. *purpurea* e *D. rotundata*, submetidos a diferentes doses de polivinilpirrolidona em meio de cultura 2GGC, após 90 dias.

Variáveis	Genótipos	
	<i>D. alata</i> var. <i>purpurea</i>	<i>D. rotundata</i>
Número de folhas verdes	8,18 a	5,34 b
Número de segmentos nodais	4,70 a	1,93 b
Massa fresca de parte aérea (mg)	286,89 a	151,75 b
Massa seca de parte aérea (mg)	23,22 a	15,36 b
Massa seca de raízes (mg)	3,59 a	1,68 b
Comprimento da maior raiz (cm)	15,62 a	4,36 b

Médias seguidas por letras diferentes na linha diferem entre si pelo teste F (P<0,05). Fonte: Autores.

De acordo com as variáveis de crescimento indicadas na Tabela 7, pode-se observar que o genótipo *D. alata* var. *purpurea* apresentou, de modo geral, as maiores médias em relação às doses de PVP estudadas. Como ressaltam da Silva Simões et al. (2016), é possível que diferentes gêneros e espécies possuam exigências hormonais distintas para uma regeneração ótima. Como observado neste trabalho, a espécie *D. alata* var. *purpurea* pode possuir características morfológicas e fisiológicas que resultam em maiores médias para as variáveis estudadas.

Tabela 7. Média das variáveis altura de parte aérea (cm), número de raízes e massa fresca de raízes (mg) dos genótipos *D. alata* var. *purpurea* e *D. rotundata* submetidos a diferentes concentrações de polivinilpirrolidona em meio de cultura 2GGC, após 90 dias.

Genótipos	Polivinilpirrolidona (mg L ⁻¹)				
	0	50	100	150	200
Altura de parte aérea (cm)					
<i>D. alata</i> var. <i>purpurea</i>	5,80 a	5,87 a	6,05 a	5,55 a	5,35 a
<i>D. rotundata</i>	4,85 a	3,30 b	4,76 b	5,52 a	3,13 b
Número de folhas senescentes					
<i>D. alata</i> var. <i>purpurea</i>	0,00 a	0,00 a	0,00 a	0,00 a	0,00 a
<i>D. rotundata</i>	0,12 b	0,00 a	0,00 a	0,00 a	0,00 a
Número de raízes					
<i>D. alata</i> var. <i>purpurea</i>	2,54 a	1,75 a	2,33 a	1,83 a	2,75 a
<i>D. rotundata</i>	3,00 a	1,78 a	2,17 a	2,75 a	0,75 b
Massa da matéria fresca de raízes (mg)					
<i>D. alata</i> var. <i>purpurea</i>	43,20 a	23,33 a	27,52 a	30,09 a	89,19 a
<i>D. rotundata</i>	14,98 b	6,12 a	6,63 b	8,48 b	2,66 b

Médias seguidas por letras diferentes na coluna diferem entre si pelo teste F (P<0,05). Fonte: Autores.

Para a altura de parte aérea, estatisticamente nas doses de 50 mg L⁻¹, 100 mg L⁻¹ e 200 mg L⁻¹ de PVP, o genótipo *D. alata* var. *purpurea* difere de *D. rotundata*, apresentando as maiores médias (Tabela 7).

Não houve folhas senescentes para o genótipo *D. alata* var. *purpurea* na ausência e nas doses de PVP, enquanto para *D. rotundata* a maior média do número de folhas senescentes (0,12) ocorreu na ausência do PVP, diferindo estatisticamente das demais concentrações (Tabela 7). Nas demais doses não houve registro de folhas senescentes, indicando que não houve acúmulo de etileno nos tubos de ensaio. A ausência de folhas senescentes é um fator importante, pois reflete em maior vigor e crescimento

das plantas.

No entanto, na variável número de raízes, apenas na dose de 200 mg L⁻¹ a espécie *D. alata* var. *purpurea* difere estatisticamente, com maior média. Já para a massa da matéria fresca de raízes, na ausência e nas doses de 100 mg L⁻¹, 150 mg L⁻¹ e 200 mg L⁻¹, *D. alata* var. *purpurea* apresenta médias superiores às produzidas pelo *D. rotundata* (Tabela 7).

4. Conclusão

As concentrações estudadas dos antioxidantes ácido ascórbico e polivinilpirrolidona não promoveram melhor desenvolvimento das variáveis de crescimento, mas, mesmo havendo registro de oxidação, houve regeneração dos explantes. Dessa forma, para o uso desses produtos, deve-se conduzir novos estudos com concentrações mais elevadas desses antioxidantes alcançando 1.000 mg L⁻¹, visando verificar se o aumento das concentrações pode interferir no crescimento e na total eliminação da oxidação das plantas de inhame.

Agradecimentos

À CAPES, pelo auxílio financeiro à bolsa de estudos. À Embrapa Mandioca e Fruticultura, por disponibilizar toda estrutura física e apoio financeiro, para o desenvolvimento do trabalho. À UFRB (Universidade Federal do Recôncavo da Bahia) especificamente ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias apoiando o desenvolvimento da dissertação da qual este artigo foi extraído.

Referências

- Adeniyi, O. J., Adetimirin, V. O., Ingelbrecht, I., & Asiedu, R. (2008). Shoot and plantlet regeneration from meristems of *Dioscorea rotundata* Poir. and *Dioscorea alata* L. *African Journal of Biotechnology*, 7(8), 1003-1008.
- Aighevi, B. A., Asiedu, R., Maroya, N., & Balogun, M. (2015). Improved propagation methods to raise the productivity of yam (*Dioscorea rotundata* Poir.). *Food security*, 7(4), 823-834.
- Azofeifa, Á. (2009). Problemas de oxidação e escurecimento de explantes cultivados *in vitro*. *Mesoamerican Agronomy*, 20 (1), 153-175.
- Behera, K. K., Sahoo, S., & Prusti, A. (2009). Regeneration of Plantlet of Water Yam (*Dioscorea oppositifolia* L.) through *in vitro* culture from nodal segments. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 37(1), 94-102.
- Bömer, M., Rathnayake, A. I., Visendi, P., Sewe, S. O., Sicat, J. P. A., Silva, G., Kumar, L., & Seal, S. E. (2019). Tissue culture and next-generation sequencing: A combined approach for detecting yam (*Dioscorea* spp.) viruses. *Physiological and molecular plant pathology*, 105, 54-66.
- Borges, M., Aguilera, N., Saborí, G., Vazquez, J., Rodríguez, A., & García, M. (1999). Influência de diferentes antioxidantes na micropropagação do inhame (*Dioscorea alata* L.). *Agricultural Center*, 26 (2), 69-71.
- Trindade, T., Soares, L. S., Furtado, M. C., Castro, A. A., & Carnelossi, M. A. (2011). Composição centesimal de inhame (*Dioscorea* sp.) in natura e minimamente processado. *Scientia Plena*, 7(6).
- Cabrera, A. R., Torres, J. L., Vega, V. R. M., Péres, M. B., Pino, A. S., & Pérez, M. M. (2020). Conservação *in vitro* de cultivares de inhame (*Dioscorea alata* L.) em condições mínimas de crescimento. *Agricultura Tropical*, 6 (1), 33-40.
- Concepción, O., Nápoles, L., Pérez, A. T., Peralta, N., Hernández, M., & Trujillo, R. (2005). Efecto de tres antioxidantes en el cultivo *in vitro* de ápices de guayaba (*Psidium guajava* L.). Relación entre el origen del explante y el contenido de compuestos fenólicos. *Cultivos tropicales*, 26(1), 33-39.
- Das, S., Choudhury, M. D., & Mazumder, P. B. (2013). *In vitro* Propagation Of Genus Dioscorea - A Critical Review. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 26-30.
- Doukoure, S., Ahoussou, N., Zoundjhekpou, J., & Tio-Toure, B. E. (2000). Culture *in vitro* chez l'igname (*Dioscorea* sp.): Influence du milieu de culture sur la regeneration des microboutures. *Agronomie Africaine*, 12(3), 105-114.
- Fatibello-Filho, O., & Vieira, I. D. C. (2002). Uso analítico de tecidos e de extratos brutos vegetais como fonte enzimática. *Química Nova*, 25(3), 455-464.
- Ferreira, E. B., Cavalcanti, P. P., & Nogueira, D. A. (2018). Pacote Experimental Designs (Portuguese). R package version 1.2.0. Disponível em: <https://CRAN.R-project.org/package=ExpDes.pt>.
- García, M. B., Batista, R. D., Rodríguez, S. M., Kosky, R. G., Malaurie, B., Hamon, P., & Demenorval, L. C. (2011). Otimização de um meio de cultura para plantas micropropagadas de *Dioscorea alata* L. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 13 (2), 221-228.

- Goulart, P. B., Xavier, A., & Dias, J. M. M. (2010). Efeito de antioxidantes no enraizamento de miniestacas de clones de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*. *Revista Árvore*, 34, 961-972.
- Kerbaui, G. B. (2004). *Fisiologia vegetal*. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan. 470 p.
- Melo, N. F., Cabral, J. B., De Resende, G. M., & De Andrade, A. G. (1998). Efeito de alguns antioxidantes no cultivo *in vitro* de segmentos nodais de Caradacosta (*Dioscorea cayenensis* Lam.). *Embrapa Semiárido-Artigo em periódico indexado (ALICE)*, 22(10), 118-121.
- Ndakidemi, C. F., Mneney, E., & Ndakidemi, P. A. (2014). Efeitos do ácido ascórbico no controle do escurecimento letal em cultura *in vitro* de *Brahylaena huillensis* usando segmentos nodais. *American Journal of Plant Sciences*, 5(1), 187-191.
- Pereira, A. S., Shitsuka, D. M., Parreira, F. J. & Shitsuka, B. (2018). Metodologia da pesquisa científica. UFSM. https://repositorio.ufsm.br/bitstream/handle/1/15824/Lic_Computacao_Metodologia-Pesquisa-Cientifica.pdf?sequence=1
- Poornima, G. N., & Ravishankar, R. V. (2007). *In vitro* propagation of wild yams, *Dioscorea oppositifolia* (Linn) and *Dioscorea pentaphylla* (Linn). *African Journal of Biotechnology*, 6(20), 2348-2352.
- R Core Team R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria (2016). Disponível em: <http://www.R-project.org/>.
- Sêdami, A. B., Todjro, C. G. H., Justine, D. S., Arnaud, A., Clement, A., & Corneille, A. (2017). Effects of activated charcoal on medium-term conservation of yam (*Dioscorea* spp.) cultivated in Benin. *African Journal of Biotechnology*, 16(15), 819-825.
- Shah, H. J., & Lele, S. S. (2012). Propagação *in vitro* de *Dioscorea alata* var. *purpurea*. *Bioquímica Aplicada e Biotecnologia*, 167(6), 1811-1817.
- Shukla, S., & Shukla, S. K. (2014). *In vitro* regeneration of *Dioscorea hispida* through nodal explants—A rich source of starch. *GSTFJ BioSciences*, 3(1), 30-35.
- da Silva Simões, K., Lino, L. S. M., da Silva Souza, A., de Oliveira, S., & da Silva Ledo, C. A. (2014). Enraizamento de inhame em meios MS e carvão ativado. *Científica*, 42(2), 164-169.
- da Silva Simões, K., Lino, L. S. M., da Silva Souza, A., de Oliveira, S., & da Silva Ledo, C. A. (2017). Micropropagação de Inhame da Costa sob concentrações de BAP em distintos meios de cultura. *Magistra*, 28(3/4), 342-351.
- Taha, S. S., & Abdelaziz, M. E. (2017). *In vitro* propagation of yam via nodal segment culture. *Bioscience Research*, 14(4), 1217-1222.
- Uchendu, E. E., Sobowale, O. O., Odimegwu, J., & Adetimirin, V. O. (2016). *In vitro* sucrose concentration influences microtuber production and diosgenin content in white yam (*Dioscorea rotundata* Poir). *In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 52(6), 563-570.
- Utino, S., Carneiro, I. F., & Chaves, L. J. (2001). Crescimento e oxidação de explantes de bananeira prata (Musa AAB) *in vitro*: IV. concentrações de sais, ácidos ascórbicos e frequência de subcultivos. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 23, 409-412.
- Vaillant, V., Bade, P., & Constant, C. (2005). Photoperiod affects the growth and development of yam plantlets obtained by *in vitro* propagation. *Biologia plantarum*, 49(3), 355-359.
- Werner, E. T., Motta, L. B., Martins, M. Q., Lima, A. B. P., & Schmildt, E. R. (2012). Coeficiente de variação como medida da precisão em experimentos de cultura de tecidos de plantas. *Plant Cell Culture & Micropropagation-ISSN 1808-9909*, 8(1-2), 27-36.