

Concentração de níveis de sacarose no meio Murashige and Skoog combinado com variedade na multiplicação de plântulas *in vitro* na batata Reno (*Solanum tuberosum* L.)

Fidel Carlos Jaime ^{1,2}, Paulo Xavier Tebulo ³, Marlene João Alfredo ³, Felisbela Meireles Filipe Manuel ¹, Cremildo Riba Gouveia Dias ^{1,4*}

¹ Centro Zonal Noroeste, Instituto de Investigação Agrária de Moçambique, Lichinga, Niassa, Moçambique.

² Mestrando em Engenharia Agrônômica, Escola de Ciências Agrárias e Veterinária, Universidade Trás-os-Montes e Alto Douro, Portugal.

³ Faculdade de ciências Agrônômicas, Universidade Católica de Moçambique, Cuamba, Niassa, Moçambique.

⁴ Doutorando em Uso Sustentável da Terra, Centro de Estudos Florestais, Instituto Superior de Agronomia, Universidade de Lisboa, Portugal. (*Autor correspondente: cremildodias23.rgd@gmail.com)

Histórico do Artigo: Submetido em: 06/02/2024 – Revisado em: 14/08/2024 – Aceito em: 02/01/2025

RESUMO

A multiplicação de semente da cultura de batata é um fator muito importante para o processo de expansão de cultivo, portanto, opta-se pela multiplicação de plântulas em ambiente *in vitro*, o que facilita a produção de plântulas de qualidade e em quantidade suficiente para a propagação. O conhecimento aprofundado dos componentes do meio de cultura é de extrema importância para o sucesso da produção *in vitro*. Portanto, objetivou-se avaliar diferentes concentrações de sacarose no meio Murashige and Skoog (MS), na multiplicação de plântulas *in vitro* de três variedades de batata Reno. Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado (DIC), em fatorial 3x4, com três variedades (Laldas, Lulimile e Kholophete), e quatro concentrações de sacarose (25, 30, 35 e 40 g l⁻¹). Aos 30 dias após a micropropagação, foram coletados os dados das variáveis massa fresca, número de folha, número de raízes e comprimento do caule. As análises foram realizadas com base no teste de normalidade dos resíduos (Shapiro-Wilk), ANOVA e teste Tukey ($\alpha=0,05$), para a comparação das médias. Para cada variável, foi calculada a dose máxima de eficiência técnica (DMET). A interação entre variedade e concentração foi observada nas variáveis número de raízes e comprimento do caule. Conclui-se que para todas as variedades de 35,3 g l⁻¹ e 31,96 g l⁻¹ de sacarose foram as melhores fontes e concentrações de açúcar para massa fresca e número de folha respectivamente. A variedade Lulimile respondeu melhor à dose de máxima eficiência técnica (33,97 g l⁻¹) para o número de raízes.

Palavras-chave: Micropropagação; Mini-túberculos; Nutrição e *Solanum tuberosum*

Sucrose concentration levels in Murashige and Skoog medium combined with variety in *in vitro* multiplication of Reno potatoes (*Solanum tuberosum* L.)

ABSTRACT

The multiplication of potato crop seeds is a crucial factor for the expansion of cultivation. Therefore, *in vitro* multiplication of seedlings is preferred, as it facilitates the production of high-quality seedlings in sufficient quantities for propagation. A thorough understanding of the components of the culture medium is critical for the success of *in vitro* production. This study aimed to evaluate different sucrose concentrations in the Murashige and Skoog (MS) medium for the *in vitro* multiplication of seedlings from three potato varieties, Reno. A completely randomized design (CRD) in a 3x4 factorial arrangement was used, with three varieties (Laldas, Lulimile, and Kholophete) and four sucrose concentrations (25, 30, 35, and 40 g l⁻¹). Data on fresh mass, leaf number, root number, and stem length were collected 30 days after micropropagation. Analyses were performed based on the Shapiro-Wilk normality test, ANOVA, and Tukey's test ($\alpha=0.05$) for mean comparisons. For each variable, the maximum technical efficiency dose (MTED) was calculated. The interaction between variety and concentration was observed for root number and stem length. It was concluded that, across all varieties, 35.3 g l⁻¹ and 31.96 g l⁻¹ of sucrose were the optimal sources and concentrations for fresh mass and leaf number, respectively. The Lulimile variety showed the best response to the maximum technical efficiency dose (33.97 g l⁻¹) for root number.

Keywords: Micropropagation; Mini-tubers; Nutrition and *Solanum tuberosum*

Jaime, F.C., Tebulo, P.X., Alfredo, M.J., Manuel, F.M.F., Dias, C.R.G (2025). Concentração de níveis de Sacarose no meio de Murashige and Skoog médium combinado com variedade na multiplicação de plântulas *in vitro* na Batata Reno (*Solanum tuberosum* L.). **Revista Brasileira de Meio Ambiente**, v.13, n.1, p.02-14.



Concentración de niveles de sacarosa en el medio de cultivo Murashige and Skoog combinado con variedad en la multiplicación *in vitro* de papas Reno (*Solanum tuberosum* L.)

RESUMEN

La multiplicación de semillas del cultivo de papa es un factor muy importante para el proceso de Expansión del cultivo. Por ello, se opta por la multiplicación en un ambiente *in vitro*, lo que facilita la producción de plántulas de calidad y en cantidad suficiente para la propagación. El conocimiento profundo de los componentes del medio de cultivo es de suma importancia para el éxito de la producción *in vitro*. Por lo tanto, el objetivo fue evaluar diferentes concentraciones en el medio Murashige and Skoog (MS) en la multiplicación *in vitro* de plántulas de tres variedades de papa Reno. Se utilizó un diseño completamente aleatorizado (DCA) en un factorial 3x4 con tres variedades (Laldas, Lulimile y Kholophete) y cuatro concentraciones de sacarosa (25, 30, 35 y 40 g⁻¹). A los 30 días después de la micropropagación, se recolectaron datos de las variables masa fresca, número de hojas, número de raíces y longitud del tallo. Los análisis se realizaron con base en la prueba de normalidad de los residuos (Shapiro-Wilk), ANOVA y la prueba de Tukey ($\alpha=0,05$) para la comparación de medias. Para cada variable se calculó la dosis máxima de eficiencia técnica (DMET). Se observó interacción entre variedad y concentración en las variables número de raíces y longitud del tallo. Se concluye que, para todas las variedades, 35,3 g⁻¹ y 31,96 g⁻¹ de sacarosa fueron las mejores fuentes y concentraciones de azúcar para masa fresca y número de hojas, respectivamente. La variedad Lulimile respondió mejor a la dosis de máxima eficiencia técnica (33,97 g⁻¹) para el número de raíces.

Palabras clave: Micropropagación; Mini-tubérculos; Nutrición y *Solanum tuberosum*

1. Introdução

Solanum tuberosum L. popularmente conhecida como batata-inglesa, é originária das cordilheiras dos Andes da América do Sul (Chile, Colômbia, Bolívia, Peru e Equador) (Gutaker et al. 2019; Spooner et al., 2005; Bradshaw et al., 2006; Zhang et al., 2009), sendo uma das principais culturas cultivadas e consumidas no mundo (Britannica, 2023). A área de produção teve um crescimento assinalável ultrapassando todas as culturas alimentares nos países em desenvolvimento (FAOSTAT, 2022). Sua domesticação ocorreu há mais de 2.000 anos nas margens do Lago Titicaca, perto da fronteira entre o Peru e a Bolívia (Vilvert et al., 2022). Por volta de 1570, foi introduzida na Europa por meio da Espanha e em 1590 chegou à Inglaterra, (Bradshaw et al., 2006; Zhang et al., 2009; Machiada e Hirano, 2015; Britannica, 2023). Somente 200 anos depois da sua introdução na Europa, a batata se tornou alimento básico para essa população (Hawkes, 1990; Spooner et al., 2005; Bradshaw et al., 2006). A partir dos anos 1620, foi levada da Europa para a América do Norte e, em seguida para o resto do mundo onde se tornou alimento popular (Lopes e Buso, 1997; Neto, 2018). Por isso, é considerada uma das culturas alimentícias de maior importância para a humanidade, ocupando o quarto lugar em produção, ficando atrás somente do milho, trigo e arroz ((Lang, 2001; Bradshaw et al., 2006; Rezende, 2008).

Dentre os processos de produção da batata-inglesa destaca-se a micropropagação, que é realizada incorporando no meio de cultura concentrações de sais do meio MS (Murashige and Skoog), onde é acrescido 20 ou 30 g⁻¹ de sacarose, podendo ou não adicionar o ágar (Matsuda, Miyashita e Miyagawa, 2003; Pereira e Fortes, 2003). Já Bhatia (2015) diz que, concentrações de 20-60 g⁻¹ de sacarose são mais preferidas como fonte de carbono. Avaliando o cultivo *in vitro* de batata com 0 g⁻¹ e 30 g⁻¹ de sacarose Badret, Angers e Desjardins (2011), observaram maior produção de biomassa de raízes, menor número de folhas e comprimento de parte aérea com a adição de 30 g⁻¹ dessa fonte de carbono. As raízes formadas no cultivo *in vitro* de plântulas desempenham um papel preponderante no processo de aclimatização das mudas propagadas (Chen et al., 2020), visto que interferem no suprimento de água para as plântulas (Amghar et al., 2021).

São amplas as vantagens que podemos relacionar com a cultura de tecidos quando comparada com as técnicas tradicionais de multiplicação de plântulas. A assepsia utilizada possibilita o cultivo de plântulas isentas de doenças (fungos, bactérias e vírus), permitindo o incremento da produção, tanto em termos qualitativos quanto quantitativos (Sinclair et al., 2004; Tegen & Mohammed, 2016; Grego et al., 2019).

As vantagens do cultivo *in vitro* mencionadas incluem a otimização do processo, que depende da utilização indispensável de uma fonte de carbono (Ainsworth, 2005; Aluko, 2021). A sacarose é a fonte de carbono mais utilizada (Gago et al., 2014), desempenhando funções essenciais no processo fisiológico (Badr, 2011; Bhatia, 2015) e na produção de fotoassimilados necessários para a formação de tecidos vegetais (Lemoine, 2000). A utilização de uma fonte externa de carbono traz benefícios no fornecimento de energia e na biossíntese de moléculas importantes para o crescimento celular do vegetal (Pereira et al., 2021). Bhatia (2015) salienta que a sacarose é a melhor fonte de carbono, seguida pela glicose, maltose e rafinose.

Sendo um componente essencial na composição de meio de cultura, a sacarose, quando adicionada ao meio, atua como fator determinante no crescimento das plântulas (Bhatia, 2015) e como agentes osmóticos (Gago et al., 2014) quando adicionado no meio, ajuda na remoção do excesso de água intracelular, por meio de um gradiente osmótico (Sampaio et al., 2018). Dentre as várias desvantagens que podemos destacar, está a utilização desregrada de concentrações de sacarose que pode interferir na formação das raízes (Gago et al., 2022), visto que concentrações muito elevadas de sacarose proporcionam a diminuição da absorção de sais e água pelas plântulas. Este argumento é fundamentado por Besson et al., (2010), na qual este autor fundamenta que a concentração de sacarose também pode interferir na formação das raízes, uma vez que o aumento da concentração de açúcares no meio de cultivo diminui a absorção de sais e água, e isso pode interferir negativamente no crescimento da plântula. Thorpe et al., (2008) relatam ainda que o somatório dos açúcares produzidos pelas plântulas no processo de fotossíntese e os que estão contidos no meio de cultura vão ocasionar níveis altos de absorção de açúcares pelas plântulas, fazendo com que sua concentração total seja elevada e prejudicando o enraizamento.

Não obstante, as plântulas *in vitro* produzidas em concentrações muito baixas de sacarose apresentam um desenvolvimento anormal (Obendorf e Wettlaufer, 1984), visto que não possuem energia suficiente para a realização dos processos metabólicos (Badr, 2011). Por conseguinte, altas concentrações de sacarose no meio restringem a eficiência fotossintética, reduzindo os níveis de clorofila (Gago et al., 2014) e, consequentemente, promovendo o crescimento anormal das plântulas (Hazarika, 2006). A maior parte delas não suporta o processo de aclimação *ex vitro*. Por outro lado, na ausência de sacarose, as plântulas que crescem sob condições de cultura de tecido não fixam CO₂ suficiente para sustentar o crescimento, devido à limitação de CO₂ nas condições *in vitro* (Gago et al., 2014), o que em muitos casos, acarreta necessidade de açúcares para fornecer energia e carboidratos essenciais à biossíntese de componentes estruturais e funcionais (Pasqual, 2001). Assim, para o desenvolvimento adequado de um protocolo de cultura *in vitro*, deve-se considerar diversos fatores ambientais, tais como temperatura, umidade, CO₂ e luz (Badr, 2011; Batista et al., 2018). A luz participa de ativamente dos processos metabólicos das plântulas elas não respondem apenas à intensidade da luz, mas também à sua qualidade espectral, que pode ser utilizada para controlar o crescimento e a morfogênese (Batista et al., 2018).

Importa salientar, as respostas das células induzidas por reguladores de crescimento podem potencializar a rota a morfogênica específica (Ikeuchi et al., 2016; Motte et al., 2014). Nas plântulas propagadas *in vitro*, a indução morfogênica está relacionada à concentração de nutrientes, à fonte de carbono, ao estado físico do meio de cultura, assim como às condições de temperatura. A radiação da fonte de luz na sala de crescimento pode ser ajustada *in vitro*, permitindo a melhor adaptação do material propagado, assim como estimular o crescimento e desenvolvimento das espécies (Hussain et al., 2012). Além de adequar os nutrientes à cultura, um dos fatores determinantes é a concentração da fonte de carbono, esse fator deve ser levado em consideração. Em cultivos heterogênicos, a fonte orgânica de carbono tem a sua utilidade no fornecimento da energia necessária para o crescimento e desenvolvimento da planta (Yaseen et al., 2013).

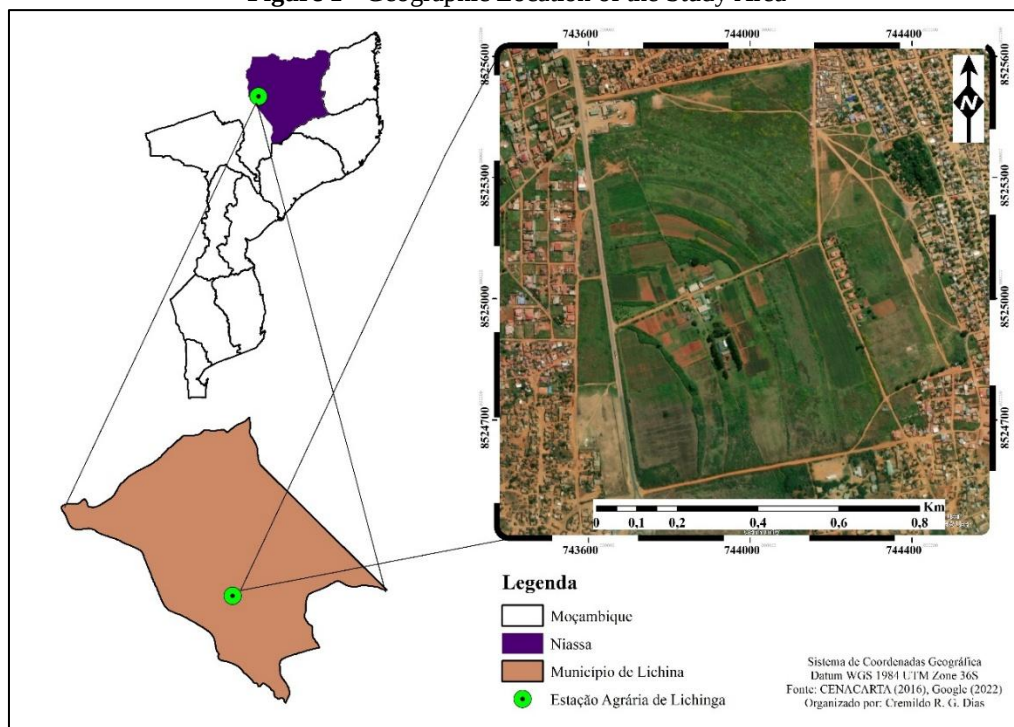
A batata-inglesa é uma das culturas mais importantes na alimentação dos Moçambicanos. Ela é cultivada, maioritariamente no período de sequeiro, entre os meses de novembro a março, e em regadio entre os meses de abril a outubro, Martinho et al. (2017). Devido à grande procura, faz-se cada vez mais necessária uma indagação mais profunda a fim de satisfazer o mercado de semente da batata-inglesa. Diante desse contexto, objetivou-se avaliar a influência da concentração de sacarose no meio MS (Murashige and Skoog), na multiplicação *in vitro* de plântulas de batata-reno de três variedades.

2. Material e Métodos

O experimento foi conduzido nas condições do laboratório de cultura de tecidos do Instituto de Investigação Agrária de Moçambique (IIAM), Centro Zonal Noroeste (CZNo), Distrito de Lichinga, Moçambique (13°19'58" S, 35°15'05" E, 1401 m de altitude) (figura 1). Segundo a classificação de Köppen, o clima da região é do tipo Cwb, com duas estações do ano bem definidas: verões temperados e chuvosos e invernos secos e frios (Dias et al. (2022), com precipitação anual de 1.200 mm e temperatura média anual de 21°C (MAE, 2014).

Figura 1 – Localização geográfica da área de estudo

Figure 1 - Geographic Location of the Study Area



Na produção *in vitro* de plântulas, foram avaliadas três variedades de batata-reno (Laldas, Lulimile e Kholophete). Essas variedades foram liberadas recentemente pelo Instituto de Investigação Agrária de Moçambique (IIAM), Centro Zonal Noroeste (CZNo), adaptadas às zonas frescas do planalto de Lichinga, com rendimentos médios que variam de 20 a 30 ton/ha (Martinho et al., 2017).

Foram empregues diferentes concentrações de sacarose: 25, 30, 35, e 40 g l⁻¹. A solução nutritiva foi gelificada com 10 g l⁻¹ de ágar e acrescida 4,2 g l⁻¹ de MS (Murashige and Skoog 1962), isenta de reguladores de crescimento. O pH da solução nutritiva foi ajustado para 5,70 ± 0,02, e o ágar foi adicionado após a correção do pH. Em seguida, o meio de cultura foi levado para a micro-ondas por 7 minutos, a uma temperatura de 100°C (Postma et. al., 2009). Com o auxílio de um distribuidor de meio de cultura, realizou-se a distribuição do mesmo em frascos de vidro, sendo que cada frasco foi adicionado 20 ml de solução nutritiva. Em seguida para a esterilização do meio de cultura, os frascos foram levados à autoclave por 15 minutos, a 121°C e pressão de 1 atm.

No interior de uma cabine de fluxo laminar foi realizada a micropropagação. Antes dessa atividade, realizou-se à assepsia no interior do mesmo com álcool a 70% e exposição à luz ultravioleta, por 15 minutos. Em seguida, foi realizada a micropropagação *in vitro* dos tecidos das três variedades, com o auxílio de uma lamparina para manter a assepsia durante o manuseio dos frascos e folhas de alumínio previamente esterilizados (Fior, 2014).

Em cada frasco, foram adicionados 4 explantes (microestacas), aplicando-se a técnica de cultura do ápice caulinar, com 0,5 cm de comprimento contendo uma ou duas folhas. O ápice das plântulas é uma área

desprovida de tecidos condutores (xilema e floema), considerada área livre de possíveis doenças que poderiam comprometer o cultivo *in vitro*. Por fim, os frascos foram cobertos com folhas de alumínio e selados com parafilm. Posteriormente, as plântulas foram mantidas em uma sala de crescimento com temperatura de $\pm 25^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas de escuridão, com intensidade luminosa média de $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Os tratamentos foram distribuídos em um esquema fatorial 3 x 4 (três variedades de batata e quatro doses de sacarose), em um delineamento inteiramente ao acaso, com três repetições. A unidade experimental foi considerada um frasco de vidro de 225 mL contendo 20 mL de meio de cultura, no qual foram adicionados explantes (microestacas) previamente estabelecidos *in vitro* de batata.

Passados 30 dias de cultivo, as plântulas foram retiradas do meio de cultura, e as raízes foram lavadas com água corrente com a finalidade de retirar todo o meio de cultura aderido ao sistema radicular. Em seguida, foram avaliados por plântula: a massa fresca (g), o número de raízes, o número de folhas e o comprimento do caule (mm).

Os dados foram submetidos ao teste de normalidade dos resíduos por meio do teste de Shapiro-Wilk e à homocedasticidade pelo teste de Bartlett, sendo, posteriormente, submetidos à análise de variância (ANOVA), para verificar a presença ou ausência de interação entre os fatores. Com base nos resultados, foi realizado o teste de comparação de médias de Tukey ($\alpha=0,05$). Também foi realizado ajuste de equações de regressão, com o intuito de calcular a dose de máxima eficiência técnica por meio da primeira derivada da equação da regressão. A escolha das equações de regressão levou em consideração a significância dos coeficientes até 5% de probabilidade. Os softwares utilizados foram o R versão 4.2.3 (R Development Core Team, 2023) e o Microsoft Excel 365.

3. Resultados e Discussão

Constatando-se a significância estatística para as variáveis massa fresca (sacarose) e número de folhas nas variedades, bem como nas concentrações de sacarose, foi aplicado o teste de comparação de médias por meio do teste Tukey ($p \leq 0,05$) (Tabela 1). Para ambas as variáveis, não houve interação entre as variedades e as doses de sacarose, indicando que os efeitos de cada uma dessas variáveis são independentes. Portanto, uma equação global para cada variável foi suficiente para explorar o comportamento destas três variedades.

Tabela 1 – Teste de Tukey para variáveis Massa fresca e número de folhas de três variedades de batata, após 30 dias de cultivo *in vitro* em diferentes concentrações de sacarose

Table 1 - Tukey test for Fresh mass and number of leaves of three Potato varieties after 30 days of *in vitro* cultivation in different sucrose concentrations

Tratamentos	Massa Fresca (g)	Folhas (n°)
Variedades	Médias	Médias
Laldas	0,235a	12,32b
Lulimile	0,227a	16,3a
Kholophete	0,237a	13,56b
Média geral	0,233	14,06
CV (%)	24,5 %	16,75%

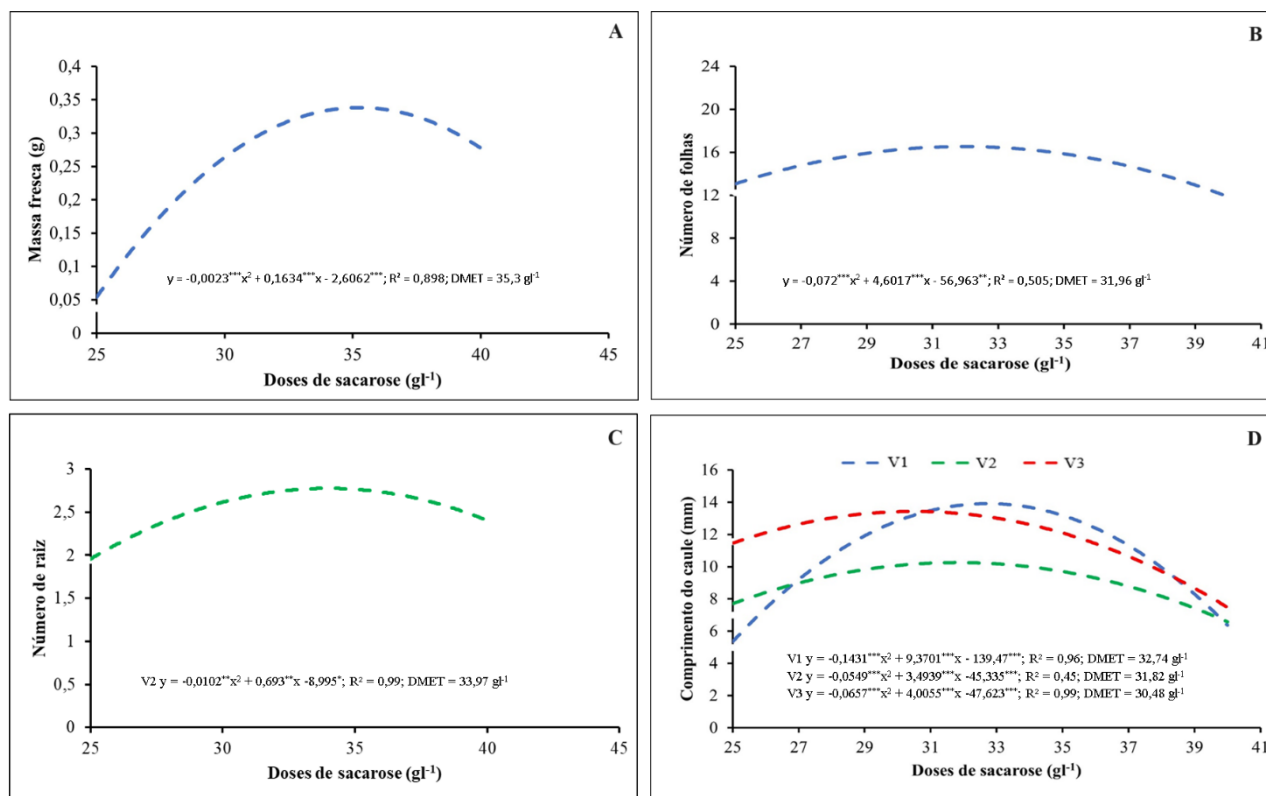
Médias que não apresentam a mesma letra na vertical diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Nas variedades testadas neste experimento, em relação à massa fresca, não foram observadas diferenças estatísticas entre elas (Tabela 1). Esses fatores evidenciam claramente que estão ligados às características genotípicas das variedades.

Para as concentrações de sacarose utilizadas neste experimento, observou-se que concentração de 25 g l^{-1} (Tabela 1 e f Figura 2A) não favoreceu o acúmulo de massa fresca, demonstrando que há baixo acúmulo de energia e, como consequência, uma baixa capacidade para realizar atividades metabólicas necessárias para a produção da massa fresca.

Figura 2 - Desempenho das variáveis em função de diferentes doses de sacarose após 30 dias de cultivo *in vitro* de três variedades de batata Reno: **A.** Curva de resposta global para a Massa fresca (g) das três variedades. **B.** Curva de resposta global para Número de folhas das três variedades. **C.** Curva de resposta para Número de raiz da variedade Lulimile. **D.** Curva de resposta para comprimento do caule (mm) das três variedades.

Figure 2 - Performance of variables as a function of different doses of sucrose after 30 days of *in vitro* cultivation of three varieties of Reno potato: **A.** Overall response curve for fresh mass (g) of the three varieties. **B.** Overall response curve for the number of leaves of the three varieties. **C.** Response curve for root number of the Lulimile variety. **D.** Response curve for stem length (mm) of the three varieties.



V1 = Laldas; V2 = Lulimile; V3 = Kholophete; R^2 = Coeficiente de determinação; DMET = dose de máxima eficiência técnica; ns = não significativo; * = significativo a 5%; ** = significativo a 1%; *** = significativo a menos que 0,1%.

Para mitigar esse cenário, a identificação e a adequação do meio de cultura à base de MS (Murashige and Skoog), adicionado de uma fonte de carbono (sacarose, glicose, frutose, maltose), com ou sem a presença de ágar, têm grande importância para a micropropagação de plântulas *in vitro*, visto que o balanceamento de sacarose no meio de cultura e a presença de outros componentes proporcionam o bom crescimento das plântulas e o desempenho aceitável das atividades metabólicas, permitindo a diminuição dos custos de produção (Couto et al., 2020).

Neste contexto, na concentração de 30 gl⁻¹, as plântulas receberam energia suficiente e evidenciaram acúmulo da massa fresca. Os resultados do presente estudo são semelhantes aos de Mantovani et al. (2013) e Winhelmann et al. (2019), que descrevem que, para a produção de mudas *in vitro*, a solução nutritiva contendo níveis baixos ou muito elevados de sacarose não é benéfica para o crescimento de plântulas.

Estudos desenvolvidos por Cassana (2007) com plântulas *in vitro* cultivadas na ausência de sacarose mostram que essas não acumulam energia, visto que as atividades metabólicas são reduzidas. Ao adicionar 15 gl⁻¹ de sacarose ao meio de cultura [potencial osmótico = -0,112 MPa], as plântulas receberam energia suficiente e observou-se um grande aumento da massa fresca. Essa situação pode contribuir para sobrevivência *ex vitro*. Esses argumentos são fundamentados ainda por Pereira et al. (2021), que afirmam que as plântulas cultivadas *in vitro* não encontram boas condições para a realizar a fotossíntese. Nesse

contexto, a adição de grandes quantidades de carboidratos influência como fonte de energia para a biossíntese das moléculas necessárias ao crescimento celular.

Os resultados observados para a variável massa fresca neste experimento (Tabela 1), quando submetidos ao cálculo de regressão (Figura 2A), mostram que as três variedades testadas têm o ponto ótimo de massa fresca estimado em 35,3 gl^{-1} (0,341 g), com coeficiente de determinação (R^2) de 0,898 (Figura 2A), indicando que o ajuste do modelo global polinomial de grau dois apresentou um forte desempenho positivo ao explicar 89,8% da variação da massa fresca. Isso se deve às doses de sacarose, sendo que a outra parte (10,2%) é atribuída a fatores não previstos.

As médias observadas mostram claramente que todas as variedades testadas neste experimento, quando submetidas a doses de sacarose abaixo de 35 gl^{-1} , apresentam respostas não satisfatórias face ao déficit, visto que a produção de energia pela plântula é limitada. Da mesma forma, o aumento dos níveis de sacarose acima de 35 gl^{-1} não resulta em ganhos proporcionais no desempenho das plântulas. Isso demonstra que a aplicação da dose acima do ponto ótimo não gera respostas significativas no aumento da massa fresca. Isso se deve ao fato de que a plântula não consegue aproveitar o nutriente disponível em excesso.

Os resultados se assemelham aos de Oliveira, Saconato e Fonseca (2010), que observaram a maior massa fresca na concentração mais elevada de sacarose. Quando a quantidade de sacarose está acima do ponto ótimo, pode criar efeitos deletérios, como a redução da absorção de água e sais minerais, o que leva à redução do desenvolvimento das mudas (Besson et al., 2010; Gago et al., 2014; Gago et al., 2022).

O número de folhas variou, e a variedade Lulimile apresentou o maior número de folhas, enquanto a variedade Laldas apresentou o menor (tabela 1). As concentrações de sacarose favoreceram atividades metabólicas satisfatórias, promovendo o acúmulo de energia e, conseqüentemente, o aumento no número de folhas. Na concentração de 30 gl^{-1} (Tabela 1), observou-se um número maior de folhas em comparação com as demais concentrações aplicadas neste experimento.

Neste contexto, as médias apresentadas na Tabela 1, referentes ao número de folhas, quando submetidas ao efeito quadrático (como foi mencionado anteriormente, para esta variável não foi detectada interação entre variedades e doses de sacarose, sendo uma equação quadrática global suficiente para explicar o comportamento das variedades), indicaram o ponto ótimo estimado em 31,96 gl^{-1} para uma produtividade de 16,56 folhas. Isso demonstra que, para alcançar a eficiência técnica para essas variedades, as concentrações de sacarose não podem estar abaixo ou acima do valor ilustrado na Figura 3. O coeficiente de determinação (R^2) para a variável número de folhas foi de 0,505 (Figura 2B), indicando que o ajuste do modelo global polinomial de grau dois apresentou um desempenho moderadamente positivo ao explicar 50,5% da variação total no número de folhas. A outra parte (49,5%) a fatores não previstos.

Estudos semelhantes reportam o mesmo resultado, como os de Pereira e Fortes (2005), que mencionam que a concentração de sacarose é importante para a produtividade de folhas. O mesmo resultado foi reportado por Flores et al. (2015), que explicam que o maior número de folhas pode ser elucidado pela relação fonte-dreno, ou seja, quanto maior a quantidade média de acúmulo de sacarose (na forma de amido) na folha, maior será a possibilidade de formação de novas folhas e posterior direcionamento de fotoassimilados para o sistema radicular.

Na tabela 2, encontram-se os resultados das análises estatísticas de número de raízes nas três variedades. Para a variável número de raízes houve interação significativa ao nível de 5% entre variedades e doses de sacarose, mostrando que a dose de sacarose é dependente das variedades.

Tabela 2 - Teste de Tukey para variável Número de raízes de três variedades de batata, após 30 dias de cultivo *in vitro* em diferentes concentrações de sacarose

Table 2 - Tukey test for Number of roots of three Potato varieties after 30 days of *in vitro* cultivation in different sucrose concentrations

Tratamentos	Concentrações			
Variedades	25 gl^{-1}	30 gl^{-1}	35 gl^{-1}	40 gl^{-1}
Laldas	1,91a	1,63b	2,30a	2,22a
Lulimile	1,94a	2,66a	2,27a	2,43a

Kholophete	1,86a	1,68b	1,63b	1,90a
Média geral	1,90	1,99	2,21	2,18
CV%	15,14			

Médias que não apresentam a mesma letra na vertical diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Diferentes concentrações de sacarose induziram respostas variadas no sistema radicular da plântula. As concentrações de sacarose aplicadas neste estudo tiveram uma interferência no número de raízes, uma vez que as concentrações intermediárias de 30 gl^{-1} a 35 gl^{-1} (Tabela 2) apresentaram bom desempenho na absorção de sais e água, fator que influenciou positivamente o número de raízes.

Em seus trabalhos, os autores Sampaio et al. (2018) sugerem que a sacarose, por ser responsável pelos processos fotossintéticos, quando adicionada ao meio de cultura, atua externamente, auxiliando na remoção do excesso de água intracelular por meio de gradiente osmótico, possibilitando o crescimento das plântulas.

Outros relatos sobre a influência da sacarose são descritos por Thorpe et al. (2008), Besson et al. (2010) e Galdiano et al. (2013). Esses autores afirmam que os níveis de açúcar interferem não apenas na emissão e no crescimento do sistema radicular, mas também podem afetar o crescimento da parte aérea da plântula.

Os resultados observados na Figura 2C, seguidos pela Tabela 2 (variedade Lulimile), estão em concordância com os argumentos apresentados por Pereira et al. (2021). Esses autores afirmam que as plântulas cultivadas *in vitro* não encontram boas condições para a realização da fotossíntese. Neste contexto, a adição de grandes quantidades de carboidratos tem influência como fonte de energia para a biossíntese de moléculas necessárias ao crescimento celular.

Relatos similares são apresentados por Badr et al. (2011), ao avaliarem o cultivo *in vitro* da batata (*Solanum tuberosum*). Eles descreveram que, ao utilizar 0 gl^{-1} desta fonte de carbono, foi observada menor produção de biomassa de raízes, menor número de folhas e menor comprimento da parte aérea. Com a adição de 30 gl^{-1} dessa fonte de carbono, observou-se aumento na produção de biomassa de raízes, no número de folhas e no comprimento da parte aérea.

Nas concentrações de 25 gl^{-1} e 40 gl^{-1} , mínima e máxima utilizadas neste experimento, observou-se números baixos de raízes. Segundo estudos, esses números baixos podem estar relacionados ao fato de que concentrações tanto baixas quanto muito elevadas não são benéficas para a produção de raízes, pois, quando um nutriente está em excesso ou em escassez, a plântula fica prejudicada, sem capacidade de absorver outros nutrientes disponíveis. Esse fato é fundamentado por alguns autores, entre os quais destacamos Lemes et al. (2016), que relatam que o açúcar produzido pela plântula durante a fotossíntese, somado à sacarose contida no meio de cultivo, propicia alta absorção de açúcar pelas plântulas, elevando sua concentração de açúcar total e prejudicando o enraizamento.

A constituição dos componentes do meio de cultura interfere significativamente na formação das raízes, visto que a presença ou ausência de sacarose tem impacto direto nos processos de formação e desenvolvimento das raízes. Segundo o resultado obtido na Figura 2C, observa-se que, quando a sacarose está disponível no nível ótimo, a formação das raízes é facilitada, resultando em um bom desempenho na absorção de água e sais e, por conseguinte, uma resposta direta no processo de formação das raízes.

Das três variedades testadas neste experimento, apenas a variedade Lulimile apresentou efeito de regressão significativo ao nível de 0,1%, com o ponto ótimo agrônomo para incrementar a formação das raízes em 33,97 gl^{-1} (Figura 2C), para uma produtividade de 2,78 raízes. O coeficiente de determinação (R^2) para a variável número de raízes da variedade Lulimile foi de 0,99 (Figura 4), indicando que o ajuste do modelo polinomial de grau dois apresentou um desempenho muito forte e positivo ao explicar 99% da variação total no número de raízes. A outra parte (1%) é atribuída a fatores não previstos.

Estes argumentos são fundamentados por Besson et al. (2010), afirmando que a concentração de sacarose também pode interferir na formação das raízes, uma vez que o aumento da concentração de açúcares no meio de cultivo ocasiona a diminuição da absorção de sais e água, e isso pode interferir no crescimento da plântula.

Através da tabela 3, verifica-se que o comprimento do caule apresenta interação estatisticamente significativa ($p \leq 0,01$), mostrando que é influenciado pela variedade e dose de sacarose.

Tabela 3 - Teste de Tukey para variável Comprimento do caule de três variedades de batata, após 30 dias de cultivo *in vitro* em diferentes concentrações de sacarose**Table 3** - Tukey test for Stem length of three Potato varieties after 30 days of *in vitro* cultivation in different sucrose concentrations

Tratamentos	Concentrações			
Variedades	25gl ⁻¹	30gl ⁻¹	35gl ⁻¹	40gl ⁻¹
Laldas	4,99c	13,92a	12,12a	6,72a
Lulimile	6,99b	12,20a	7,56b	7,28a
Kholophete	11,56a	13,09a	12,41a	7,37a
Média geral (mm)	7,84	13,07	13,07	7,21
CV%	9,08			

Médias que não apresentam a mesma letra na vertical diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade erro.

Apesar de a concentração de 30 gl⁻¹ apresentar valores absolutos maiores, não foram observadas diferenças significativas com o teste de Tukey a 5% de significância. Nesse sentido, houve diferenças significativas nas concentrações de 25 gl⁻¹ e 35 gl⁻¹ (Tabela 3), o que permite afirmar que, na concentração mais baixa de sacarose, (25 gl⁻¹), as plântulas não acumularam energia suficiente e, por isso, não tiveram capacidade de realizar atividade metabólica para expressar o desenvolvimento do caule.

Estudos desenvolvidos no cultivo *in vitro* de batata (*Solanum tuberosum*) por Badret et al. (2011) descrevem que a produção com 0 gl⁻¹ e 30 gl⁻¹ de sacarose resultou em elevada produção de biomassa de raízes, menor número de folhas e menor comprimento da parte aérea. Os autores observaram ainda que, com a utilização de 30 gl⁻¹ dessa fonte de carbono, houve um incremento no acúmulo de diversas substâncias, entre as quais sacarose, glicose e frutose, que desempenham um papel preponderante durante o processo *ex vitro* das plântulas de batata.

Neste experimento, o bom desempenho no desenvolvimento do caule foi alcançado na concentração intermediária de 35 gl⁻¹ (Tabela 3). Nessa concentração, as plântulas acumularam energia suficiente para expressar o crescimento, uma vez que as atividades metabólicas foram realizadas sem perturbações.

Por outro lado, o aumento da concentração de sacarose de 35 gl⁻¹ para 40 gl⁻¹ (Tabela 3) resultou na diminuição do comprimento do caule. Esse efeito pode estar relacionado ao fato de que concentrações elevadas não são benéficas para o crescimento de plântulas *in vitro*, criando perturbações e impedindo a absorção adequada de nutrientes pelas plântulas, o que pode levar à elevação dos custos de produção em relação à sacarose, uma vez que essa fonte de carbono entra em maior quantidade na composição do meio de cultura.

Os resultados observados neste experimento estão em concordância com os argumentos de Galdiano et al. (2013). Esses autores afirmam que plântulas produzidas em ambientes com baixo potencial osmótico (causado pelo aumento de sais e/ou açúcares no meio) apresentam diminuição da água disponível no meio de cultivo e, como consequência, o potencial hídrico das células tende a baixar, provocando alterações no metabolismo e propiciando o acúmulo de altos níveis de aminoácidos. A parte aérea das plântulas apresenta maiores valores quando cultivadas em concentrações variando de 26 a 31 gl⁻¹ de sacarose, enquanto concentrações maiores favorecem a redução no crescimento.

Com base nos argumentos desses autores e comparando com as médias observadas nas variedades Laldas, Lulimile e Kholophete (Tabela 3) utilizadas neste experimento, fica claro que o balanceamento dos sais e da sacarose no meio de cultura de batata é de extrema importância para o crescimento e bom desempenho das atividades metabólicas, além de contribuir para a redução dos custos de produção *in vitro* e aumentar a taxa de sobrevivência das plântulas nas condições *ex vitro*.

No cultivo da batata, o balanceamento da concentração dos sais e da sacarose no meio MS (Murashige and Skoog) é indispensável, devido à possibilidade de aumento das atividades metabólicas e da taxa de

sobrevivência das plântulas no processo de aclimatização, além de permitir a redução dos custos de produção *in vitro* das mudas.

Neste contexto, quando submetidas ao efeito quadrático, as variedades testadas neste experimento, nomeadamente Laldas, Lulimile e Kholophete, apresentaram médias em relação ao ponto ótimo agrônômico de sacarose variando de 32,74 g l⁻¹ 31,82 g l⁻¹ e 30,48 g l⁻¹, respectivamente (Figura 2D). Nessas condições, observou-se o crescimento do comprimento do caule em 13,92 mm, 10,25 mm e 13,43 mm, respectivamente. Esses resultados permitem afirmar que o aumento do nível de sacarose acima das médias da Figura 2D, em relação ao comprimento do caule, não resultará em um aumento gradual proporcional. Além disso, isso encarecerá a produção *in vitro* de plântulas e causará desequilíbrios na absorção dos sais e do meio MS (Murashige and Skoog), que são essenciais para o bom desenvolvimento das plântulas.

4. Conclusões

Com as variáveis estudadas e os resultados apresentados, conclui-se que a variedade Lulimile respondeu melhor à aplicação das dosagens de sacarose, apresentando maior número de raízes e folhas na dosagem de 30 g l⁻¹.

A dose de máxima eficiência técnica para massa fresca foi a de 35,3 g l⁻¹, resultando na produção de 0,34 g, enquanto para o número de folhas foi a de 31,96 g l⁻¹, produzindo 16,56 folhas. Quanto ao número de raízes, a máxima eficiência técnica foi obtida com a aplicação de 33,97 g l⁻¹, produzindo 2,78 raízes.

No que diz respeito ao comprimento do caule, a otimização da eficiência técnica foi denotada na variedade Kholophete, com 30,48 g l⁻¹, resultando em um crescimento de 13,43 mm.

Recomenda-se a realização de mais estudos desse tipo para identificar tendências e padrões no âmbito da propagação da batata Reno por meio da tecnologia de cultura de tecidos vegetais.

5. Agradecimentos

Agradecemos ao Instituto de Investigação Agrária de Moçambique (IIAM) - Centro Zonal Noroeste (Estação Agrária de Lichinga) pelo financiamento dos reagentes e consumíveis.

6. Referência Bibliográfica

Ainsworth E.A., Long S.P. (2005). What have we learned from 15 years of free-air CO₂ enrichment (FACE)? A meta-analytic review of the responses of photosynthesis, canopy properties and plant production to rising CO₂. **New Phytol.** 165:351–372.

Aluko OO, Li C, Wang Q, Liu H. (2021). Sucrose Utilization for Improved Crop Yields: A Review Article. **Int J Mol Sci.** 22(9):4704.

Amghar I, Ibriz M, Ibrahim M, Boudra A, Gaboun F, Meziani R, Iraqi D, Mazri MA, Diria G, Abdelwahd R. (2021). *In Vitro* Root Induction from Argan (*Argania spinosa* (L.) Skeels) Adventitious Shoots: Influence of Ammonium Nitrate, Auxins, Silver Nitrate and Putrescine, and Evaluation of Plantlet Acclimatization. **Plants (Basel).** 10(6):1062.

Badr, A. (2011). ***In vitro* and ex vitro potato plantlets (*Solanum tuberosum*) metabolic response to exogenously supplied sucrose: a metabolomic approach.** PhD in plant biology, Laval University, Quebec, Canada.

Badret A; Angers P; Desjardins Y. (2011). Metabolic profiling of photoautotrophic and photomixotrophic potato plantlets (*Solanum tuberosum*) provides new insights into acclimatization. **Plant Cell, Tissue, and Organ Culture** 107: 13-24.

- Batista, D. S., Felipe, S. H. S., Silva, T. D., de Castro, K. M., Mamedes-Rodrigues, T. C., Miranda, N. A., ... & Otoni, W. C. (2018). Light quality in plant tissue culture: does it matter. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 54, 195-215.
- Besson, J. C. F., Oliveira, L. K., Bonett, L. P., & Stefanello, S. (2010). Fontes e concentrações de carboidratos no crescimento vegetativo e no enraizamento *in vitro* de *Miltonia flavescens* Lindl. **Revista Brasileira de Biociências**. 8 (1)9-13.
- Bradshaw, J.E., Bryan, G.J. & Ramsay, G. (2006). Genetic Resources (Including Wild and Cultivated *Solanum* Species) and Progress in their Utilisation in Potato Breeding. **Potato Research** 49, 49–65.
- Britannica, T. Editors of Encyclopaedia (2023, November 12). potato. Encyclopedia Britannica. <https://www.britannica.com/plant/potato>.
- Cassana, F. F. (2007). **Caracterização fotossintética e do desenvolvimento de plantas de batata-doce cultivadas *in vitro* e aclimatizadas**. (Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Pelotas).
- Chen J., Liu L., Wang Z., Zhang Y., Sun H., Song S., Bai Z., Lu Z., Li C. (2020). Nitrogen fertilization increases root growth and coordinates the root-shoot relationship in cotton. **Front. Plant Sci.** 11:880.
- Couto, R. T.; Araújo, J. S. P.; Almeida, L. M.; Aguilar, J. P. (2020). enraizamento *in vitro* de cultivares de gerbera híbrida (ASTERACEAE). **Revista Científica Rural, Bagé**. 22 (1), 125-142.
- Dias, C. R. G., Vinjunju, M. S. R., Mussalama, A. Z., & Serrote, C. M. L. (2022). Métodos alternativos para superação de dormência em sementes de *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Witt. **Revista Thema**, 21(1), 224-235.
- FAOSTAT (2022). World Food and Agriculture – Statistical Yearbook 2022. Rome. <https://doi.org/10.4060/cc2211en>.
- Fior, C. S., Freitas, E. M., Pavan, A. M. & Teixeira, M. (2014) **Cultura de tecidos Vegetais**. In Sperotto, R. A. (Org.), *Protocolos e métodos de análise em laboratórios de biotecnologia agroalimentar e de saúde humana* (pp.213-225). Lajeado, RS: Editora da Univates.
- Flores, R., Maggio, L. P., Flôres, P. Z., Bempk, G. S., Auler, N. M., Carvalho, J. F., ... & Silveira, T. M. (2015). Otimização da produção de plantas *in vitro* de cultivares de *Ipomoea batatas*. **Revista de Ciências Agrárias**, 38(3), 429-437.
- Gago J, Martínez-Núñez L, Landín M, Flexas J, Gallego PP. (2014). Modeling the effects of light and sucrose on *in vitro* propagated plants: a multiscale system analysis using artificial intelligence technology. **PLoS One**. 9(1): e85989.
- Gago, D., Bernal, M. Á., Sánchez, C., Aldrey, A., Cuenca, B., Christie, C. B., & Vidal, N. (2022). Effect of Sucrose on Growth and Stress Status of *Castanea sativa* x *C. crenata* Shoots Cultured in Liquid Medium. **Plants (Basel, Switzerland)**, 11(7), 965.
- Galdiano Júnior, R. F., Mantovani, C., Cassano, A. O., & Lemos, E. G. D. M. (2013). Desenvolvimento inicial e crescimento *in vitro* de *Cattleyavioleacea* (Kunth) Rolfe em diferentes concentrações de sacarose. **Acta Amazônica**, 43, 127-134.
- Galdiano Junior, R.F. et al. (2013). Concentrações de sacarose no desenvolvimento *in vitro* e na aclimatização de *Cattleya loddigesii* Lindley. *Semina: Ciências Agrárias*, 34(2)583- 592.
- George, E. F. (1996). Plant Propagation by Tissue Culture. 2. Ed., **Edington: Exegetics**, 1361p. Part 2: In Practice.
- Grego, J, Lopes, F, Marques, M, Ferreira, L & Pinto. (2019). Multiplicação (*in vitro* e *in vivo*) de material de propagação de elevada qualidade. **Boletim técnico** n. ° 3.
- Gutaker, R.M., Weiß, C.L., Ellis, D. et al. (2019). The origins and adaptation of European potatoes reconstructed from historical genomes. **Nat Ecol Evol** 3, 1093–1101.

- Ikeuchi, M., Ogawa, Y., Iwase, A., & Sugimoto, K. (2016). Plant regeneration: cellular origins and molecular mechanisms. *Development*, 143(9), 1442-1451.
- Hawkes, J.G. (1990). The potato evolution, biodiversity, and genetic resources. **London**: Belhaven Press.
- Hazarika BN (2006) Morpho-physiological disorders in *in vitro* culture of plants. **Sci Hort** 108: 105–120.
- Hussain, A., Qarshi, I.A., Nazir, H., Ullah, I. (2012). Plant Tissue Culture: Current Status and Opportunities, Recent Advances in Plant *in vitro* Culture, Annarita Leva (Ed.), ISBN: 978-953-51-0787-3, InTech, DOI: 10.5772/50568.
- Lang J (2001) Notes of a potato watcher. Texas A&M University Press, College Station, Texas
- Lemes, C. S. R., Sorgato, J. C., Soares, J. S., & Rosa, Y. B. C. J. (2016). Culture media and sucrose on initial *in vitro* growth of *Miltonia flavescens* **Ciência Rural**, 46(3), 499-506.
- Lemoine R. (2000). Sucrose transporters in plants: Update on function and structure. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) Biomembr.* 1465:246–262.
- LOPES, C. A.; BUSO, J. (1997). A. Cultivo da batata (*Solanum tuberosum* L.) Brasília: **Embrapa Hortaliças**, 1997. 36p.
- Machida-Hirano, R. (2015). Diversity of potato genetic resources, **Breeding Science** 65: 26-40.
- MAE. (2014). Perfil do distrito de Chimbonila-Lichinga, província de Niassa. Maputo: **Ministério da Administração Estatal**.
- Martinho A. C. Xavier P. R. et al. (2018). Manual de manejo da cultura da batata, edição - Instituto de Investigação Agrária de Moçambique - IIAM. Maputo p. 6.
- Matsuda, F., Morino, K., Miyashita, M., & Miyagawa, H. (2003). Metabolic flux analysis of the phenylpropanoid pathway in wound-healing potato tuber tissue using stable isotope-labeled tracer and LC-MS spectroscopy. **Plant and Cell Physiology**, 44(5), 510-517.
- Murashige T; Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum** 15: 473-497.
- Motte, H., Vereecke, D., Geelen, D., & Werbrouck, S. (2014). The molecular path to *in vitro* shoot regeneration. **Biotechnology Advances**, 32(1), 107-121.
- Neto, Margarida Sobral. (2018). – La difusión del cultivo de la patata en Portugal, Siglos XVI- XIX. **Obratório de História Moderna**. 27: 113-138.
- Obendorf, R. L., & Wettlaufer, S. H. (1984). Precocious Germination during *In Vitro* Growth of Soybean Seeds. **Plant physiology**, 76(4), 1024–1028.
- Oliveira L. V., Saconato C. H. e Fonseca I. C. B. (2003). Influência de fonte e concentração de carboidrato no crescimento vegetativo e enraizamento *in vitro* de *Ocimum vadicolum*. **Semina: Ciências Agrárias**, 24(2), 265–272
- Oliveira, C. M., Zambon, C. R., & Boas, A. V. (2013). Efeito de reguladores de crescimento na micropropagação *in vitro* de batata doce. **Global Science and Technology**, 6 (03), 108-115.
- Pasqual, M. (2001). Cultura de tecidos vegetais. **Lavras-MG: UFLA/FAEPE**, V.1, 74p.
- Peralta, I. E., Knapp, S., & Spooner, D. M. (2005). New Species of Wild Tomatoes (*Solanum* Section *Lycopersicon*: Solanaceae) from Northern Peru. **Systematic Botany**, 30(2), 424-434.
- Pereira, E. J., Roque, J. L., de Sousa, B. S., das Neves, J. S. F., de Souza, M. L., Porto, J. M. P., & Braga, F. T. (2021). Reguladores vegetais e sacarose na germinação *In Vitro* de licuri (*Syagrus coronata* (Mart.) Becc). **Brazilian Journal of Development**, 7(2), 18812-18825.
- Pereira, J. E. S., & Fortes, G. R. D. L. (2003). Protocolo para produção de material propagativo de batata em meio líquido. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 38, 1035-1043

- Pereira, J. E. S., França, R. B. D., Dantas, A. C. D. M., & Fortes, G. R. (2005). Influência do número de gemas, presença ou ausência de folhas e posição do explante na multiplicação *in vitro* da batata. **Horticultura Brasileira**, 23, 86-89.
- Postma, J. M., Roberts, J. L. & Hollenberg, L. (2009). **Química no Laboratório**. (5ª ed.) Barueri, SP: Manole, 546 p.
- R. Development Core Team. (2023). R: a language and environment for statistical computing. [https://cran-r-c3sl.ufpr.br/](https://cran.r-c3sl.ufpr.br/)
- Rezende, R. K. S. (2008). **Organogênese *in vitro* de batata (*Solanum tuberosum* L.) cultivar Atlantic visando transformação genética**. Doutorado em Agronomia Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais.
- Rhoades, R. Da Agricultura à Cultura: Uma viagem fantástica. Graves, C. (org). (2001). batata, tesouro dos Andes. Da agricultura à cultura. C.Sepulturas. Lima, Peru: **Centro Internacional da Batata (CIP)** 2001 http://www.cipotato.org/publications/books/potato_treasure_andes_online/23_fantastic_voyage.asp
- Sampaio E., E. Sã F., J e Souza S. A. et al., (2018). Influencia da sacarose na conservação *in vitro* de espécies silvestres do género manihot. **12º jornadas Científicas – Embrapa Mandioca e fruticultura**.
- Sinclair T. R., Purcell L. C., Sneller C. H. (2004). Crop transformation and the challenge to increase yield potential. **Trends Plant Sci.** 9 (2), 70–75.
- Spooner, D. M., McLean, K., Ramsay, G., Waugh, R., & Bryan, G. J. (2005). A single domestication for potato based on multilocus amplified fragment length polymorphism genotyping. **PNAS**, 102 (41) 14694 – 14699.
- Tegen H., Mohammed W. (2016). The role of plant tissue culture to supply disease free planting materials of major horticultural crops in Ethiopia. **J. Biology. Agric. Healthcare**. 6 (1), 122–129.
- Thorpe, T. et al. (2008). The components of plant tissue culture media II: organic additions, osmotic and pH effects, and support systems. In: GEORGE, E.F. et al. Plant propagation by tissue culture. 3.ed. **Netherland: Springer**, V.1, 501p.
- Vilvert, E., Stridh, L., Andersson, B. et al. (2022) Evidence based disease control methods in potato production: a systematic map protocol. **Environ Evid** 11, 6.
- Winhelmann, M. C., Tedesco, M., Lucchese, J. R., Fior, C. S., & Schafer, G. (2019). Propagação *in vitro* de *Angelonia integerrima*. **Rodriguésia**, 70.
- Yaseen, M., Ahmad, T., Sablok, G., Standardi, A., & Hafiz, I. A. (2013). Role of carbon sources for *in vitro* plant growth and development. *Molecular biology reports*, 40, 2837-2849.
- Zhang, L., Brown, C. R., Culley, D., Baker, B., Kunibe, E., Denney, H., Smith, C., Ward, N., Beavert, T., Coburn, J., Pavek, J. J., Dauenhauer, N., & Dauenhauer, R. (2009). Inferred origin of several Native American potatoes from the Pacific Northwest and Southeast Alaska using SSR markers. **Euphytica**, DOI 10.1007/s10681-009-0092-4.