

O HIDROGEL PODE SER UMA ALTERNATIVA AO USO DE ÁGAR
EM CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS?

KEZIA MORAES VIEIRA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE

DARCY RIBEIRO

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
MARÇO – 2018

O HIDROGEL PODE SER UMA ALTERNATIVA AO USO DE ÁGAR EM CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS?

KEZIA MORAES VIEIRA

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 Produção Vegetal.

Orientadora: Prof^a. Virginia Silva Carvalho

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
MARÇO – 2018

FICHA CATALOGRÁFICA

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pela autora.

V658

Vieira, Kezia Moraes.

O hidrogel pode ser uma alternativa ao uso de ágar em cultura de tecidos vegetais?
/ Kezia Moraes Vieira. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2018.

147 f. : il.

Bibliografia: 107 - 133.

Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, 2018.
Orientadora: Virginia Silva Carvalho.

1. Meio de cultura alternativo. 2. Agente geleificante de baixo custo. 3. Propriedades químicas e físicas. 4. Fisiologia de crescimento in vitro. 5. Espécies vegetais. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 630

O HIDROGEL PODE SER UMA ALTERNATIVA AO USO DE ÁGAR
EM CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS?

KEZIA MORAES VIEIRA

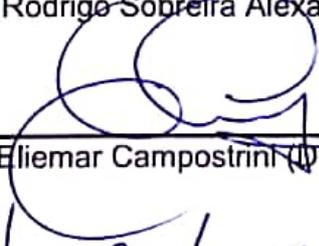
Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.

Aprovada em 01 de março de 2018

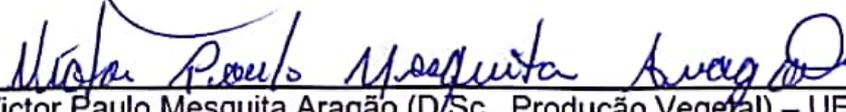
Comissão Examinadora



Prof. Rodrigo Sobreira Alexandre (D.Sc., Fitotecnia) – UFES



Prof. Eliemar Campostrini (D.Sc., Produção Vegetal) – UENF



Victor Paulo Mesquita Aragão (D.Sc., Produção Vegetal) – UENF



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

Dedico,

Ao Eterno, por ser tão zeloso com a minha existência;

À minha querida mãe, Dalza, por seu enorme amor, zelo e sabedoria;

À minha querida irmã, Polyanna, por todo cuidado, amizade e amor;

Ao meu pai, Jurandy, por todo amor e compreensão;

A vocês eu dedico sempre o melhor de mim.

*"Você tem que ter uma crença tremenda no
que está fazendo e simplesmente perseverar."*

Howard Schultz

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal e ao Laboratório de Fitotecnia, pela oportunidade de realização deste curso;

A CAPES pela concessão da bolsa de estudos e a FAPERJ pela bolsa “Aluno Nota 10”;

À minha orientadora Virginia pela parceria, conselhos e o valioso conhecimento transmitido. Cresci muito ao seu lado. Agradeço imensamente a oportunidade de ter vivido esses anos de aprendizagem!

Ao Ramon Moraes pela oportunidade de dar seguimento a uma ideia tão interessante como a deste trabalho. Obrigada por isso!

Aos companheiros de laboratório: Renan, Willian, Kelly, Rafael, Andressa, Roberta, Grasiela, Renato, Roberto, Clarissa, Luísa, Eduardo Crespo e Naiara pela ajuda em tantas atividades na bancada, convívio diário, aprendizado e bons momentos que tivemos. Obrigada meus queridos!

À minha querida família, Dalza, Polyanna, Jurandy, Jandira e Matheus por terem tanta paciência comigo, por terem me compreendido em tantos momentos de ausência, por terem me telefonado e visitado fazendo com que eu me sentisse parte de um corpo familiar. Eu os amo muito!

De forma especial, agradeço a minha querida mãe e irmã, Dalza e Poly, sem vocês eu nada seria. Obrigada por tanto amor. Meu caminho sempre foi observado com muito zelo por vocês. Amo vocês mais que a mim mesma!

Ao meu querido namorado, Diego Corona, por tanto companheirismo, parceria, paciência e amor. A pesquisa fica muito mais interessante quando somos parceiros! Obrigada por ser tão especial comigo!

Aos meus queridos e verdadeiros amigos: Danilo Baroni, Willian Gomes, Renan Carrari, Kelly Ramos, Ariane Cardoso e Gustavo Lima, pela amizade sincera e apoio. Obrigada por todas as discussões científicas e filosóficas que tivemos, pelos ótimos momentos que compartilhamos, os sorrisos sem economia, nossos encontros, as lembranças que registramos e a história que construímos juntos!

Aos meus queridos “conselheiros” de laboratório: Rafael Walter e Andressa Leal, por terem compartilhado comigo suas experiências e terem, por várias vezes, me indicado o melhor caminho a seguir. Obrigada por isso!

Aos grandes professores que contribuíram para este trabalho: Claudio Marciano pelos conselhos, disponibilidade, atenção e colaboração. Ao Marcus Vinícius Sandoval Paixão pela boa vontade e parceria, e por ceder equipamentos para análises das plantas. Ao Eliemar Campostrini, Almy Cordeiro, Claudio Marciano e Prof. Ângelo, por ceder equipamentos para as análises. Ao Gonçalo Apolinário de Souza Filho por ceder as sementes de *Arabidopsis thaliana* e vidrarias, e por disponibilizar a bolsista de Iniciação Científica, Karine, para me ensinar todos os protocolos para o cultivo *in vitro* da espécie;

Ao Saú por me ensinar e ajudar com as análises no WinRHIZO. Ao Sr. Accácio pela análise química do hidrogel. A Rozane por me ajudar com as análises de área foliar;

Ao engenheiro agrônomo William, do Centro de Análises da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), *campus* Dr. Leonel Miranda por toda paciência, colaboração e conhecimento investido para que fosse possível analisar o hidrogel mesmo não tendo uma metodologia específica para tal;

A Hidroplan® por fornecer o hidrogel usado nesta pesquisa;

Ao Eterno por brotar em mim a coragem, vontade e perseverança diante de tantos obstáculos.

SUMÁRIO

RESUMO	ix
ABSTRACT	xi
1.INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1 Meios de cultura.....	4
2.2 Hidrogel.....	6
2.3 Ágar	9
2.4 Aspectos sobre a cultura do pimentão.....	11
2.5 Aspectos sobre a cultura da batata-doce.....	14
2.6 Aspectos sobre a <i>Arabidopsis thaliana</i>	16
3. OBJETIVOS	19
3.1 Geral	19
3.2 Específicos.....	19
4.TRABALHOS	21
4.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICA E QUÍMICA DOS AGENTES GELEIFICANTES DE MEIO DE CULTURA: HIDROGEL HYDROPLAN-EB® E ÁGAR BACTERIOLÓGICO VETEC®	21
RESUMO	21
ABSTRACT	22
INTRODUÇÃO	24
MATERIAL E MÉTODOS.....	25

Descrição dos agentes geleificantes.....	25
Análise química dos agentes geleificantes	25
Análise de nutrientes totais.....	26
Análises de sais solúveis	26
Propriedade química e física dos agentes geleificantes solubilizados em água desionizada.....	28
Teste I – Análise de pH dos agentes geleificantes solubilizados em água desionizada.....	28
Teste II – pH do hidrogel solubilizado em água desionizada acidificada	29
Teste III – Retenção de água dos agentes geleificantes pelo método do tensiômetro	29
Propriedades químicas e físicas dos agentes geleificantes solubilizados em solução de sais minerais de Murashige e Skoog (MS)	31
Experimento I – Meios de cultura solubilizados em solução de sais de MS (Murashige e Skoog, 1962) com pH ajustado para 5,8 – autoclavagem por 20 minutos	31
Experimento II – Meios de cultura com diferentes concentrações de hidrogel solubilizadas em solução de sais de MS (Murashige e Skoog, 1962) com diferentes valores de pH – autoclavados por 20 minutos	32
Experimento III – Meios de cultura com diferentes concentrações de hidrogel solubilizado em solução de sais de MS (Murashige e Skoog, 1962) com diferentes valores de pH submetidos a esterilização química	33
Experimento IV – Esterilização física do hidrogel e do tubo de ensaio e esterilização química do meio de cultura	34
Experimento V – Esterilização física do hidrogel e do meio de cultura em recipientes separados.....	35
RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
Análise química dos agentes geleificantes	36
Análise de nutrientes totais.....	36
Análise de sais solúveis.....	38
Propriedade química e física dos agentes geleificantes solubilizados em água desionizada.....	39
Teste I – Análise de pH dos agentes geleificantes solubilizados em água desionizada.....	39

Teste II – pH do hidrogel solubilizado em água desionizada acidificada	40
Teste III – Retenção de água dos agentes geleificantes pelo método do tensiômetro	42
Propriedades químicas e físicas dos agentes geleificantes solubilizados em solução de sais minerais de Murashige e Skoog (MS)	44
Experimento I – Meios de cultura com diferentes agentes geleificantes solubilizados em solução de sais de MS com pH ajustado para 5,8 – autoclavagem por 20 minutos	45
Experimento II – Meios de cultura com diferentes concentrações de hidrogel solubilizado em solução de sais de MS com diferentes valores de pH – autoclavados por 20 minutos	47
Experimento III – Meios de cultura com diferentes concentrações de hidrogel solubilizado em solução de sais de MS com diferentes valores de pH submetidos a esterilização química	51
Experimento IV – Esterilização física do hidrogel e recipiente, e esterilização química do meio de cultura	54
Experimento V – Esterilização física do hidrogel e tubo de ensaio, e esterilização física do meio de cultura em recipientes separados	56
CONCLUSÕES	58
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
4.2 HIDROGEL HYDROPLAN-EB® COMO AGENTE GELEIFICANTE DE MEIO DE CULTURA NO CULTIVO <i>in vitro</i> DE ESPÉCIES VEGETAIS	62
RESUMO	62
ABSTRACT	63
INTRODUÇÃO	65
MATERIAL E MÉTODOS	67
Experimento I: Hidrogel como agente geleificante de meio de cultura no cultivo <i>in</i> <i>vitro</i> de pimentão	67
Material Vegetal	67
Fase I – Germinação <i>in vitro</i> de sementes de pimentão ‘Casca Dura ‘Ikeda’ ...	67
Fase II – Crescimento <i>in vitro</i> de plântulas de pimentão ‘Casca Dura Ikeda’ ...	68
Fase III – Aclimatização de plantas de pimentão ‘Casca Dura Ikeda’ provenientes do crescimento <i>in vitro</i>	70

Experimento II: Hidrogel como agente geleificante de meio de cultura no cultivo <i>in vitro</i> de batata-doce	70
Material Vegetal	70
Fase I – Cultivo <i>in vitro</i> do acesso UENF 1937.....	71
Fase II – Aclimatização de plantas de batata-doce provenientes do cultivo <i>in vitro</i>	72
Experimento III: Hidrogel como agente geleificante de meio de cultura no cultivo <i>in vitro</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i>	73
Material Vegetal	73
Fase I – Germinação e crescimento <i>in vitro</i> de sementes de <i>A. thaliana</i> (Columbia-0).	73
Descrição das análises realizadas nos experimentos.....	74
Análises Estatísticas	76
RESULTADOS E DISCUSSÃO	76
Experimento I: Hidrogel como agente geleificante de meio de cultura no cultivo <i>in vitro</i> de pimentão.....	76
Fase II – Crescimento <i>in vitro</i>	76
Fase III – Aclimatização	84
Experimento II: Hidrogel como agente geleificante de meio de cultura no cultivo <i>in vitro</i> de batata-doce	88
Fase I – Crescimento <i>in vitro</i>	88
Fase II – Aclimatização.....	92
Experimento III: Hidrogel como agente geleificante de meio de cultura na germinação e crescimento <i>in vitro</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i>	93
CONCLUSÃO	95
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	95
5. RESUMO E CONCLUSÃO	104
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	107

RESUMO

VIEIRA, Kezia Moraes, M.Sc., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, março de 2018. O hidrogel pode ser uma alternativa ao uso de ágar em cultura de tecidos vegetais? Orientadora: D.Sc. Virginia Silva Carvalho. Conselheiro: D.Sc. Cláudio Roberto Marciano.

As biofábricas e os laboratórios de biotecnologia utilizam o cultivo *in vitro* para diferentes aplicações. Esse fato reforça a importância dos estudos sobre a qualidade dos meios de cultura e a possibilidade de reduzir os investimentos com o preparo desses meios. Dentre os possíveis materiais alternativos ao ágar tem-se o hidrogel que apresenta potencial para geleificação e menor custo de obtenção. O objetivo com esta pesquisa foi definir um protocolo de preparo de meio de cultura tendo o hidrogel como agente geleificante em substituição ao ágar. Em seguida, com o protocolo definido, testá-lo em cultivos de diferentes espécies vegetais, adotando-se como modelos experimentais o pimentão (*Capsicum annuum* var *annuum* L.), a batata-doce (*Ipomoea batatas* L.) e a *Arabidopsis thaliana*. Quanto à composição química, o hidrogel apresentou menores teores totais de micronutrientes e elevados teores totais de nitrogênio, potássio e enxofre, em relação ao ágar. O hidrogel apresentou ainda teores elevados de potássio e sódio solúveis. Os cátions solubilizados pelo hidrogel reduziram o potencial osmótico nos meios de cultura. O hidrogel apresentou tendência a manter o pH em uma faixa entre 6,0 e 7,0 dos géis formados em água desionizada e em sais de MS, independente da concentração. Os géis de hidrogel

responderam a acidificação e tornaram-se mais ácidos. Porém, ao submeter os géis acidificados a autoclavagem houve aumento no pH para uma faixa entre 7,0 e 8,5. A esterilização química mostrou ser uma alternativa à autoclavagem dos meios contendo hidrogel. O poder de intumescimento do hidrogel pode reduzir com a redução do pH da solução de sais e alterar a textura e a coloração do meio de cultura. À medida que se aumenta a concentração de hidrogel no meio de cultura, aumenta-se a condutividade elétrica. Foi possível definir um protocolo de preparo de meio de cultura utilizando o hidrogel. A concentração foi de 24 g L⁻¹ de hidrogel, pH da solução de sais de MS em 1,5 e esterilização por meio da autoclavagem separadamente do hidrogel em pó e do meio de cultura contendo os sais de MS líquido. Entre os meios propostos, o ágar proporcionou melhores resultados no cultivo de *C. annuum* var *annuum* L. (pimentão), *I. batatas* L. (batata-doce) e *A. thaliana*. O meio de cultura contendo hidrogel e pH da solução em 1,5 tem potencial para ser utilizado no cultivo *in vitro* de pimentão. Nas condições dessa pesquisa, não é recomendado o uso do hidrogel no cultivo *in vitro* de batata-doce. O meio de cultura contendo hidrogel e pH da solução em 5,8 tem potencial para ser utilizado no cultivo *in vitro* de *A. thaliana*. Ainda são necessários mais estudos e modificações no meio de cultura para que as espécies vegetais possam ser cultivadas *in vitro* em meios de cultura contendo o hidrogel.

ABSTRACT

VIEIRA, Kezia Moraes, M.Sc., State University of North Fluminense Darcy Ribeiro, march, 2018. Can Hydrogel be an alternative to the use of agar in plant tissue culture? Advisor: D.Sc. Virginia Silva Carvalho. Counselor: D.Sc. Cláudio Roberto Marciano.

Biofactories and biotechnology laboratories use *in vitro* culture for different applications. This fact reinforces the importance of studies on the quality of culture media and the possibility of reducing investments through the preparation of these means. Among the possible alternative materials to the agar is the hydrogel that presents potential for gelification and lower cost of obtaining. The objective of this research was to define a protocol for the preparation of culture medium having the hydrogel as a gelling agent instead of agar. Then, with the protocol defined, test it on crops of different plant species, using as experimental models the sweet pepper (*Capsicum annuum var annuum* L.), sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) and *Arabidopsis thaliana*. As for the chemical composition, the hydrogel had lower total micronutrient contents and high total nitrogen, potassium and sulfur contents, in relation to agar. The hydrogel also had high levels of soluble potassium and sodium. The cations solubilized by the hydrogel reduced the osmotic potential in the culture media. The hydrogel showed a tendency to maintain the pH in a range between 6.0 and 7.0 of the gels formed in deionized water and in MS salts, regardless of concentration. The hydrogel gels responded to acidification and became more acidic. However, when subjecting the acidified gels to autoclaving, there was an increase in pH for a range between 7.0 and 8.5. Chemical

sterilization was shown to be an alternative to autoclaving the hydrogel containing media. The swelling power of the hydrogel can be reduced by reducing the pH of the salt solution and altering the texture and chlorination of the culture medium. As the hydrogel concentration increases in the culture medium, the electrical conductivity is increased. It was possible to define a protocol for the preparation of culture medium using the hydrogel. The concentration was 24 g L⁻¹ hydrogel, pH of the MS salts solution at 1.5 and sterilization by autoclaving separately the hydrogel powder and the culture medium containing the liquid MS salts. Among the proposed media, agar yielded better results in the cultivation of *C. annuum* var *annuum* L. (sweet pepper), *I. potatoes* L. (sweet potato) and *A. thaliana*. The culture medium containing hydrogel and pH of the solution in 1.5 has potential to be used in the *in vitro* cultivation of sweet pepper. Under the conditions of this research, the use of the hydrogel in the *in vitro* cultivation of sweet potatoes is not recommended. The hydrogel containing culture medium and pH of the solution at 5.8 has potential to be used in the *in vitro* cultivation of *A. thaliana*. Further studies and modifications in the culture medium are still necessary so that plant species can be cultured *in vitro* in culture media containing the hydrogel.

1. INTRODUÇÃO

A cultura de tecidos vegetais, dentre outras aplicações, vem sendo utilizada em todo o mundo para a propagação em larga escala de muitas espécies de plantas. Várias biofábricas foram criadas resultando na produção comercial de mudas de várias espécies economicamente importantes (Jain-Raina e Babbar, 2011). Além das biofábricas, muitos laboratórios de biotecnologia utilizam o cultivo *in vitro* em diferentes áreas para aplicações como, testar a eficiência de óleos essenciais, cultivar células animais e vegetais, induzir embriogênese, estudar a biologia de microrganismos, auxiliar programas de melhoramento de plantas com práticas de conservação de germoplasma *in vitro* e cultivo e resgate de embriões, dentre várias outras (Castro et al., 2010; Patel e Krishnamurthy, 2013; Cavalieri et al., 2015; Vettorazzi et al., 2017; Walter et al., 2018). Esse fato reforça a importância dos estudos em relação à qualidade dos meios de cultura e à possibilidade de reduzir os custos com relação ao preparo desses meios.

Nos cultivos *in vitro*, a composição do meio de cultura tem importante função nas respostas de crescimento das células e tecidos. Os meios de cultura semissólidos, comumente utilizados na cultura de tecidos vegetais, são compostos, geralmente, por macro e micronutrientes, vitaminas, fonte de energia e agente geleificante (Braga et al., 2010).

O ágar é o agente geleificante mais utilizado nos meios de cultura para tecidos vegetais, animais e de microrganismos (Faria et al., 2002). Porém, todo ágar consumido nos laboratórios e biofábricas do Brasil é importado (Pereira et al., 2013), o que o torna o componente mais dispendioso do meio de cultura

(Fialho et al., 2011; Pereira et al., 2013). Meios de cultura modificados com outro agente geleificante representam uma alternativa vantajosa para o cultivo *in vitro*, pois há a possibilidade de redução de custos e permitir maior disponibilidade de materiais alternativos ao ágar.

Dentre os possíveis materiais alternativos ao ágar, têm-se o hidrogel que apresenta capacidade de formar géis e menor custo de obtenção. O hidrogel é um polímero que absorve grande quantidade de água e não deforma a sua estrutura. É biocompatível e possui baixa toxicidade. Apresenta consistência elastomérica, que minimiza o atrito entre os tecidos e o hidrogel, e alta permeabilidade que permite o fluxo de fluídos pelo hidrogel devido à alta porosidade (Tavakol et al., 2016). É rígido o suficiente para manter o explante bem posicionado. É obtido facilmente em diferentes formas e apresenta incorporação e liberação controlada de soluções. Estas características possibilitam a utilização do hidrogel em diversas vias de administração em sistemas de liberação controlada (Saravanan et al., 2007; Aouada e Mattoso, 2009).

Os efeitos do hidrogel são verificados nas diversas aplicações na agricultura, tais como, condicionantes de solo, pesticidas, agroquímicos, artigos veterinários e biosensores (Bajpai e Giri, 2003; Winzenburg et al., 2004; Aouada et al., 2008; Lopes et al., 2010; Chang e Zhang, 2011; Ullah et al., 2015; Garnica-Palafoxa e Sánchez-Arévalo, 2016).

Como componente de meio de cultura, Moraes (2015) testou diferentes concentrações de hidrogel na micropropagação de abacaxizeiro 'Gold' e determinou a concentração de 22,5 g L⁻¹ como a que proporcionou o desenvolvimento das plantas de abacaxizeiro sem prejuízos à morfologia e fisiologia das plantas cultivadas, podendo, assim, ser utilizado em substituição ao ágar.

No entanto, o hidrogel apresenta propriedades que podem interferir na utilização como agente geleificante de meio de cultura. Alguns estudos mostram que a liberação de sais solúveis em sistemas de plantios resultou em fitotoxicidade para as plantas (Bowman et al., 1990; Navroski et al., 2016). Tal fato deve ser observado, uma vez que a liberação de sais solúveis pode interferir no balanço final de nutrientes do meio de cultura. Além disso, ainda não é conhecido o efeito do pH do hidrogel sobre o pH do meio de cultura, bem como, se o hidrogel é uma substância estável que não sofre alterações quando submetido a processos de

esterilização. Diante do exposto, nota-se a necessidade do estudo das propriedades químicas e físicas do hidrogel. Para isso, o conhecimento das respostas do hidrogel ao ser solubilizado em água desionizada e em sais minerais é de fundamental importância.

Sendo assim, o objetivo com o presente estudo foi definir um protocolo de preparo de meio de cultura tendo o hidrogel como agente geleificante alternativo ao ágar. Em seguida, com o protocolo definido, testar o meio de cultura contendo hidrogel no cultivo de diferentes espécies vegetais, adotando-se como modelos experimentais o pimentão (*Capsicum annuum* var *annuum* L.), a batata-doce (*Ipomoea batatas* L.) e a *Arabidopsis thaliana*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Meios de cultura

Os meios de cultura fornecem substâncias essenciais para o crescimento dos explantes e também participam do controle do padrão de desenvolvimento *in vitro*. O mais usado no cultivo *in vitro* da maioria das espécies é o meio de cultura de Murashige e Skoog (MS), desenvolvido em 1962 (Trivedi et al., 2015). Entretanto, algumas modificações podem ser feitas no chamado meio básico, para otimizar metodologias que propiciem o melhor desenvolvimento da espécie estudada. O meio MS é composto por macronutrientes, micronutrientes, vitaminas de White e fonte de carbono (Murashige e Skoog, 1962) (Tabela 1).

O agente geleificante deve ser escolhido com muito cuidado com relação à natureza e concentração, bem como, utilizado na concentração ideal para reduzir a evaporação e manter o explante bem posicionado (Pereira-Netto et al., 2012). Em altas concentrações, pode promover a elevação do potencial osmótico do meio, dificultando a difusão dos nutrientes para os explantes e, por consequência, reduzir o crescimento do explante. Em baixas concentrações, pode maximizar as perdas de água do meio (Barrueto-Cid, 2001). O ágar é o agente geleificante mais utilizado e é empregado em concentrações que variam de 4 a 10 g L⁻¹ (Trivedi et al., 2015; Nogueira et al., 2015; Oliveira et al., 2015; Pereira et al., 2015; Vettorazzi et al., 2017).

Tabela 1 – Composição do meio MS (Murashige e Skoog, 1962).

Sais do Meio MS (Murashige e Skoog, 1962)		
Natureza	Componentes	Concentração (mg L ⁻¹)
Macronutrientes	KNO ₃	1.900,000
	NH ₄ NO ₃	1.650,000
	MgSO ₄ .7H ₂ O	370,000
	KH ₂ PO ₄	170,000
	CaCl ₂ .2H ₂ O	440,000
	FeSO ₄ .7H ₂ O	27,850
	Na ₂ EDTA.2H ₂ O	37,250
Micronutrientes	MnSO ₄ .4H ₂ O	22,300
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,600
	H ₃ BO ₃	6,200
	KI	0,830
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,250
	CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025
Vitaminas de White	Piridoxina	0,500
	Ácido nicotínico	0,500
	Glicina	2,000
	Tiamina	0,100
Fonte de carbono	Sacarose	30.000,000
	Myo-inositol	100,000

Fonte: Adaptado de Murashige e Skoog (1962).

A consistência do meio de cultura depende da concentração e da qualidade do ágar utilizado, do pH, da concentração de sais e da presença de outras substâncias como o carvão ativado, os quais interferem na geleificação (Chagas et al., 2009; Nogueira et al., 2015).

O pH é um fator determinante e de grande importância para o meio de cultura, influenciando na disponibilidade de nutrientes, fitorreguladores e no grau de solidificação do ágar (Chagas et al., 2009; Nogueira et al., 2015). Se bem

ajustado, o pH pode promover maior e melhor aproveitamento dos nutrientes pelo explante (Chagas et al., 2009).

Os efeitos do pH influenciam, por exemplo, na utilização das fontes de nitrogênio, em que, valores de pH mais baixos dificultam a utilização do amônio, enquanto, valores mais altos diminuem a utilização do nitrato (Caldas, Haridasan e Ferreira, 1990). O pH afeta também a força gel do ágar, sendo que um decréscimo do pH diminui essa força. O conteúdo de açúcar tem um efeito considerável sobre o gel de ágar, pois o seu aumento resulta em um gel com maior dureza, porém com menor coesão (Jarro, 2010).

Para o adequado crescimento da maioria das espécies vegetais, é aconselhável que o pH seja ajustado entre 5 e 6,5 (Aloufa, 2003; Caovila et al., 2016). Durante o desenvolvimento do explante, o pH do meio de cultura se altera à medida que diferentes íons são absorvidos e os produtos metabólicos são excretados para o meio. O processo de autoclavagem e a estocagem também acidificam os meios de cultura (Caovila et al., 2016).

2.2 Hidrogel

Os hidrogéis são conhecidos e citados na literatura como polímeros superabsorventes, hidroretentores e hidropolímeros. São comumente definidos como uma rede de polímeros tridimensionais capazes de absorver grandes volumes de água em sua estrutura sem se dissolver, absorvendo de 100 a 500 vezes a própria massa (Chang e Zhang, 2011; Kono e Fujita; 2012, Brito et al., 2013). Essas redes poliméricas podem ser formadas por um monômero, sendo chamadas de homopolímeros, ou vários monômeros, os copolímeros (Aouada e Mattoso, 2009).

Os hidrogéis apresentam baixa toxicidade, são biocompatíveis, baixo custo, alta durabilidade no ambiente de intumescimento e armazenamento, biodegradabilidade elevada, transparente e capacidade de re-intumescimento (Saravanan et al., 2007; Aouada e Mattoso, 2009; Ahmed, 2013; Tavakol et al., 2016).

A capacidade de retenção dos hidrogéis está vinculada aos grupos hidrofílicos presentes na estrutura química, sendo eles -OH-, -CONH-, -COO- e -SO₂H-. Já a capacidade de expansão está relacionada ao fenômeno osmótico

responsável pelo transporte do solvente para o interior do hidrogel, que é contrabalanceado por uma força elástica retrativa (Yonezawa et al., 2017).

Quanto à origem, os hidrogéis podem ser classificados como naturais, sintéticos ou, ainda, uma combinação de ambos, e quanto ao método de reticulação, são classificados em químicos ou físicos (Chang e Zhang, 2011).

Os géis naturais podem ser de dois tipos, à base de polissacarídeos ou à base de polipeptídeos (proteínas) (Ahmed, 2013). Os principais representantes dessa classe de géis são os obtidos a partir da celulose, da quitina e alginato (Chang e Zhang, 2011; Gonsalves et al., 2011; Food Ingredients Brasil, 2013).

Quanto aos géis sintéticos, os mais industrialmente utilizados são os derivados de ácido acrílico (AA) e os sais de sódio e potássio. Esses hidrogéis possuem longa vida útil, elevada capacidade de absorção de água e resistência do gel. Além disso, são estáveis nas condições de oscilações bruscas de temperaturas (Ahmed, 2013).

Os hidrogéis químicos são obtidos por meio da reticulação química – ligações covalentes – em um processo irreversível, ou seja, quando obtidos, as redes poliméricas não podem ser quebradas (Aouada e Mattoso, 2009; Chang e Zhang, 2011).

Os hidrogéis físicos são aqueles oriundos de interações físicas como forças de Van Der Waals ou ligações de hidrogênio. São considerados géis temporários, uma vez que sua estrutura pode ser prejudicada por fatores como alterações de pH, de temperatura e contato com soluções salinas (Aouada e Mattoso, 2009; Silva et al., 2009; Chang e Zhang, 2011).

As características dos géis são fortemente relacionadas com a interação com a água, que ocorre por formação de ligações de hidrogênio (Brito et al., 2013). Quando os hidrogéis entram em contato com um meio aquoso as cadeias poliméricas intumescem por meio do aprisionamento do líquido na sua estrutura, expandindo o volume. Nesse momento ocorre um fenômeno osmótico que direciona o solvente para o interior do hidrogel até que se atinja o equilíbrio (Khan et al., 2009, Chang e Zhang, 2011).

O processo de intumescimento é governado por fatores físicos e externos. Mudanças de pH, força iônica, temperatura, composição da solução, são alguns dos fatores externos que interferem no processo de absorção de água pelo gel (Brito et al., 2013). Alguns fatores físicos, como presença de forças de coesão,

grupos hidrofílicos, baixa densidade de reticulação e flexibilidade da cadeia do polímero são favoráveis ao processo de intumescimento. A presença de grupos hidrofóbicos, maior densidade de reticulação e a presença de íons desfavorecem a absorção do gel (Brito et al., 2013).

Os hidrogéis depois de intumescidos dependem de alguns fatores para se degradarem e iniciarem a liberação do princípio ativo, tais como pH (Zhao et al., 2010; Wang e Han, 2011) e temperatura (Alvarez-Lorenzo e Concheiro, 2002).

Os hidrogéis a base de acrilamida são sintéticos e foram sintetizados pela primeira vez na década de 50. Por volta dos anos 70, a patente do produto expirou e uma empresa britânica aprimorou as propriedades do hidrogel, elevando a capacidade de intumescimento de 20 para 40 vezes e, posteriormente, de 40 para 400 vezes (Yonezawa et al., 2017).

O hidrogel (Hydroplan-EB®) é um polímero de poliacrilamida superabsorvente especialmente desenvolvido para agricultura. Quando imerso em água chega a absorver de 200 a 400 vezes sua massa e aumenta o tamanho em até 100 vezes. Todavia, a capacidade de absorção e liberação varia em função do tamanho do grânulo e das condições do meio. O hidrogel HyC é um sólido granulado que apresenta grânulos finos, coloração branca, inodoro e insolúvel em água. Na tabela 2 estão resumidas as propriedades físicas e químicas do hidrogel.

Tabela 2 – Resumo das propriedades do hidrogel HyC

Propriedades	Hidrogel
Aparência	Pó branco fino
Granulometria	Mesh 35
Conteúdo de Umidade	10 %
Absorção de água	370 cm ³ g ⁻¹
Absorção com 1.000 µg g ⁻¹ de NaCl	200 cm ³ g ⁻¹
Materiais orgânicos estranhos	0
Materiais insolúveis estranhos	0
pH	5,0 a 9,0

Tabela 2 – Cont.

Propriedades	Hidrogel
Força gel (sol 1,5% a 20° C)	-
Viscosidade (sol 1,5% a 20° C)	-
Ponto de fusão	-
Ponto de geleificação	-
Solubilidade	Insolúvel em água
Característica Iônica	Aniônico

Fonte: Adaptado de Folha de Informações Técnicas Hydroplan-EB – HyC (2003).

Tem-se estudado a aplicação do hidrogel na agricultura (Chang e Zhang, 2011; Ullah et al., 2015). Nas pesquisas, sua eficiência tem sido testada com relação à utilização na forma de condicionador de solo (Marques e Bastos, 2010; Lopes et al., 2010). Porém, é possível que haja outras aplicações na agricultura que explorem o potencial hídrico deste material, como a cultura de tecidos vegetais.

2.3 Ágar

Os meios de cultura semissólidos normalmente são solidificados com ágar. Aspectos relacionados à natureza biológica e de produção do ágar têm provocado consideráveis variações na qualidade (Praiboon et al., 2006; Kumar e Fotedar, 2009; Yousefi et al., 2013). Essas variações podem ser significativas para o sucesso do cultivo *in vitro*.

Quimicamente, o ágar é considerado um polissacarídeo complexo, constituído por agarpectina e agarose. A agarpectina é um polissacarídeo ácido que contém grupos sulfato, ácido pirúvico e ácido D-glucurônico conjugado com agarobiose. A agarose é um polissacarídeo neutro com uma estrutura de unidades repetidas do dissacarídeo agarobiose. A agarose é o polissacarídeo responsável pelo poder de geleificação (Arvizu- Higuera et al., 2008; Wu et al., 2009).

Esses polissacarídeos são obtidos a partir de espécies de algas vermelhas, especialmente das ordens Gracilariales e Gelidiales, pertencentes ao

filo Rhodophyta, (Villanueva et al., 2010; Ganesan et al., 2015; Rhein-Knudsen et al., 2015). Os gêneros *Gelidium* e *Gracilaria* são os responsáveis pela maior parte da produção de ágar no mundo, 44% e 53%, respectivamente; sendo apenas, uma pequena porção (3%) extraída de algas como a *Gelidiella* e *Pterocladia* (Marinho-Soriano e Bourret, 2005).

As espécies do gênero *Gracilaria* são consideradas as mais importantes fontes de ágar em nível mundial. Isso se deve à facilidade em cultivá-las, uma vez que apresentam rápido crescimento e menor custo de aquisição, sendo cultivadas em escala comercial em vários países e regiões do mundo, e à maior disponibilidade no meio ambiente (Villanueva et al., 2010). No entanto, os géis produzidos por esse gênero são tipicamente mais fracos e de menor qualidade quando comparados aos géis extraídos a partir de espécies do gênero *Gelidium*, sendo necessário um pré-tratamento alcalino para melhorar as propriedades (Yoshimura, 2006; Kumar e Fotedar, 2009).

O rendimento, os conteúdos de agarose e agarpectina e a capacidade de geleificação do ágar são influenciados pela espécie de alga, estação do ano, época de colheita, estágio do ciclo de vida, condições de extração e processamento, aspecto fisiológico da alga e fatores ambientais (Florêncio et al., 2012).

O ágar possui algumas características que justificam o fato de ser o agente geleificante mais utilizado em meios de cultura. Algumas dessas características são, a capacidade de permanecer sólido em temperatura próxima a 40°C, de se manter estável sob temperaturas de esterilização (121°C) e de não apresentar toxicidade para a maioria dos organismos. Além disso, é uma substância fisiologicamente inerte, isto é, pouquíssimas bactérias possuem enzimas capazes de digeri-lo (Ferreira, 2015). Na tabela 3 estão resumidas as propriedades físicas e químicas do ágar.

Tabela 3 – Resumo das propriedades do ágar

Propriedades	Ágar
Aparência	Pó amarelado
Granulometria	Mesh 100

Tabela 3 – Cont.

Propriedades	Ágar
Umidade	Máx. 18%
Absorção de água	Máx. 75 cm ³ g ⁻¹
Materiais orgânicos estranhos	Máx. 1,0%
Materiais insolúveis estranhos	Máx. 1,0%
pH	6,8 a 7,0
Força gel (sol 1,5% a 20° C)	700 a 1.000 g cm ⁻³
Viscosidade (sol 1,5% a 20° C)	1.000 a 10.000 g cm ⁻¹ s ⁻¹
Ponto de fusão	85 - 95° C
Ponto de geleificação	32 - 45° C
Solubilidade	Água em ebulição

Fonte: Adaptado de Jarro (2010).

O ágar, quando no estado semissólido não permite trocas gasosas com a superfície, especialmente com o oxigênio, o que pode ser visto como uma desvantagem na utilização em cultivos *in vitro* (Ferreira, 2015).

2.4 Aspectos sobre a cultura do pimentão

As pimentas e pimentões (*Capsicum* spp.) têm como centro de origem as Américas, destacando-se as regiões tropicais e subtropicais (Reifschneider, 2000). O gênero *Capsicum* se originou na Bolívia Sul-Central, possuindo como ancestral comum a espécie *Capsicum chacoense*, que posteriormente se dispersou para os Andes e região Amazônica (Moscone et al., 2007). Devido às atividades marítimas de navegação de portugueses e espanhóis, bem como, a de pássaros migratórios, houve a dispersão mundial das espécies nativas (Andrews, 1995; Ribeiro e Reifschneider, 2008).

O Brasil é considerado um dos grandes centros de diversidade do gênero, pois abriga espécies domesticadas, semidomesticadas e silvestres (Moscone et al., 2007, Sudré et al., 2010). O País contempla o maior número de espécies silvestres, e a região Sudeste, apresenta-se como o principal centro de diversidade no Brasil (Reifschneider, 2000).

As espécies do gênero *Capsicum* pertencem à Família Solanaceae (Andrews, 1995) e 35 delas foram identificadas. Dessas 35 espécies, apenas cinco são domesticadas, *Capsicum annuum*, *C. baccatum*, *C. chinense*, *C. frutescens* e *C. pubescens*, e as demais, semidomesticadas ou silvestres (Rêgo et al., 2012; Carrizo et al., 2013).

As espécies que compõem este gênero estão distribuídas em três complexos gênicos: o complexo *C. annuum*, que reúne as espécies *C. annuum* var *annuum*, *C. chinense*, *C. frutescens* (formas domesticadas), *C. annuum* var *glabriusculum*, *C. chacoense* e *C. galapagoense*; o complexo *C. baccatum*, que reúne *C. baccatum* var. *pendulum* (forma domesticada), *C. baccatum* var. *baccatum*, *C. praetermissum*, *C. tovarii*, *C. umbilicatum*; e o complexo *C. pubescens*, que reúne *C. pubescens* (forma domesticada) e *C. cardenasii*, *C. eximium* (Martins et al., 2010; Carrizo et al., 2013).

A espécie *C. annuum* é a mais cultivada e de maior variabilidade dentro do gênero *Capsicum* (Casali e Couto, 1984; Carvalho e Bianchetti, 2008). Além disso, a espécie engloba as principais variedades conhecidas e cultivadas no mundo (Reifschneider, 2000). Esta espécie é representada por pimentões, pimentas para páprica e pimentas como jalapeño, cayena, serrano, cereja, entre outras, além de variedades ornamentais (Büttow et al., 2010). Poucas espécies têm uso tão universal quanto as pimentas do gênero *Capsicum* (Reifschneider et al., 2015).

Dentre as características mais importantes das espécies do gênero *Capsicum* tem-se a ampla variabilidade de formas, cores e tamanhos de frutos e a presença da pungência, sendo esta uma característica exclusiva (Carvalho et al. 2003; Dias et al., 2013). As plantas apresentam flores hermafroditas e autógamas, entretanto, verifica-se a ocorrência da polinização cruzada realizada por agentes polinizadores, podendo, dessa forma, ser classificadas como intermediárias ou alógamas facultativas (Bosland e Votava, 2000; Rêgo et al., 2012). A espécie *C. annuum* compreende os pimentões, as pimentas doces e a maioria das pimentas ornamentais. Devido à expressão econômica é a espécie mais cultivada e estudada.

Dentre os tipos varietais de *C. annuum*, o pimentão (*C. annuum* var *annuum*) destaca-se como sendo o de maior importância econômica no Brasil. As principais características dessa variedade são presença de uma flor por nó, corola

branca e ausência de manchas na corola, anteras azuis, frutos com grande variabilidade de cores, tamanhos, formas e com polpa firme (Viñals et al., 1996).

A cultura do pimentão é encontrada em todos os estados brasileiros, principalmente nos Estados de São Paulo, Minas Gerais, Goiás, Ceará, Bahia e Rio Grande do Sul, (Reifschneider et al., 2015). No Brasil, a área cultivada anualmente com pimentão está em torno de 13 mil hectares, com produção de aproximadamente 290 mil toneladas (Marouelli e Silva, 2012). Em São Paulo, no ano de 2016, a área cultivada com pimentão foi de 2,46 mil hectares, atingindo a produção de 91,6 mil toneladas, com produtividade média de 37 toneladas por hectare (IEA, 2018). Nesse mesmo ano, foram comercializadas mais de 49 mil toneladas pelo CEAGESP-SP (Agriannual, 2017).

Os pimentões são plantas de fácil cultivo, vigorosas e produtivas, representando uma das espécies de pimenta mais conhecidas e difundidas no mundo (Embrapa, 2007). Geralmente, são cultivadas como anuais, no entanto, são plantas perenes (Bosland, 1996). É uma cultura muito empregada por pequenos e médios produtores, apresentando, dessa forma, significativa importância para a agricultura familiar no Brasil (Costa e Henz, 2007).

Diversas pesquisas têm sido realizadas, envolvendo, em sua maioria, o *Capsicum annuum* var *annuum* (pimentão), possivelmente pela sua importância econômica e pelas dificuldades de cultivo a que está sujeito, como, por exemplo, a suscetibilidade às doenças e pragas (Rêgo et al., 2003; Azevedo et al., 2006; Blat et al., 2007).

No âmbito da cultura de tecidos vegetais, várias técnicas têm sido aplicadas à cultura do pimentão. Lantos et al. (2009), Ferrie e Caswell (2011), Kim et al. (2013) e Lantos et al. (2012) aplicaram a técnica de cultura de micrósporos isolados para a tentativa de obtenção de duplo-haploides em pimentão. Com o mesmo objetivo, a técnica de cultura de anteras tem sido amplamente utilizada (Arnedo Andre´s et al., 2004; Irikova et al., 2011; Parra-Vega, 2013; Todorova et al., 2013; Nowaczyk et al., 2015a; Nowaczyk et al., 2015b; Ari et al., 2016). Walter (2015) e Walter et al. (2018) aplicaram a técnica de resgate de embriões provenientes de cruzamentos incompatíveis de *C. annuum* spp. visando sua utilização em programas de melhoramento genético. O cultivo *in vitro* é muito utilizado em estudos das propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias da capsaicina, substância que confere a pungência exclusiva do gênero *Capsicum*

(Srinivasan, 2016), bem como, em estudos relacionados aos teores de carotenoides e outros compostos presentes em frutos de plantas pertencentes a este gênero (Pugliese et al., 2014).

2.5 Aspectos sobre a cultura da batata-doce

Acredita-se que o centro de origem da batata-doce (*Ipomoea batatas* L.) seja na América, apesar de ainda não ter sido confirmado (Roullier et al., 2013). A América Central é apontada como o centro primário de diversidade e o Brasil, centro secundário de diversidade da espécie (Haung e Sun, 2000; Borges et al., 2009).

A batata-doce pertence à família botânica Convolvulaceae, que agrupa cerca de 45 gêneros e aproximadamente 1.000 espécies. Dentre elas, a batata-doce é a de maior importância econômica (Silva et al., 2008; Senanayake et al., 2013). As plantas dessa espécie pertencem à Classe Magnoliopsida; são herbáceas, com crescimento geralmente rasteiro; alógamas; autoincompatíveis e propagadas vegetativamente (Jones, 1967; Thompson et al., 1997; Daros et al., 2002).

A batata-doce é a sétima cultura alimentar mais produzida no mundo e a quinta mais importante em países em desenvolvimento depois do arroz, trigo, milho e mandioca (Shekhar et al., 2015). A China é o país que mais produz batata-doce (Zhang et al., 2009; FAO, 2012). Na América Latina, o Brasil é o principal produtor, atingindo em 2014 uma produção de 525,8 mil toneladas (Anuário Brasileiro de Hortaliças, 2016). A espécie é cultivada em todas as regiões brasileiras, com maior presença nas regiões Sul, Sudeste e Nordeste e ocupa o quarto lugar entre as hortaliças mais consumidas pela população brasileira (IBGE, 2014).

O cultivo da batata-doce apresenta vantagens como baixo custo de produção, facilidade de propagação e cultivo, rusticidade, ampla adaptação a diversas condições edafoclimáticas, ciclo curto, colheita prolongada, alta produtividade, cobertura vegetal como proteção do solo contra a erosão e alto valor nutricional (Loebenstein, 2009; Zhang et al., 2009; Khoury et al., 2015). Apesar dessas vantagens, a modernização da agricultura e mudanças nos

hábitos alimentares da população contribuiu para a perda da diversidade genética da batata-doce (Cardoso et al., 2011).

Técnicas de cultura de tecidos vegetais têm sido empregadas na cultura da batata-doce como, a micropropagação (Câmara et al., 2013), a conservação *in vitro* de germoplasma (Arrigoni-Blank et al., 2014; Vettorazzi et al., 2017) e a limpeza clonal (Fernandes, 2013).

No Estado do Rio de Janeiro, 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. O trabalho incluiu a coleta de cultivares tradicionais mantidas por esses agricultores. As cultivares coletadas foram catalogadas, enumeradas e caracterizadas quanto aos aspectos morfológicos, agrônômicos e moleculares no Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal da UENF (Moulin et al., 2014).

Vettorazzi et al. (2017) determinaram um protocolo para conservação *in vitro* dos 30 acessos de batata-doce coletados por Moulin et al. (2012) na Região Norte do Estado do Rio de Janeiro, o que possibilitou a implantação de uma coleção de germoplasma de batata-doce *in vitro* na UENF, para fins de conservação dos recursos genéticos de variedades pertencentes aos municípios da região.

Dentre os 30 acessos, o UENF 1937 foi coletado no Município de São João da Barra - RJ e conservado *in vitro* na coleção de germoplasma da UENF. Segundo Moulin et al. (2014), esse acesso apresenta raízes com massa média variando entre 154 e 261 g; comprimento intermediário (± 12 a 17 cm) e baixo teor de sólidos solúveis ($\pm 8,8$ °BRIX).

Quanto às características morfológicas do acesso UENF 1937, tem-se que as folhas apresentam tamanho pequeno (<8 cm), formato elíptico e três lóbulos lanceolados profundos. As folhas quando maduras apresentam coloração verde e, quando imaturas, verde com bordos roxos. A coloração do pecíolo é completamente roxa. Já as raízes, são longas com curvaturas e não apresentam defeitos na superfície. A coloração da pele e da polpa é branca de intensidade intermediária (Vettorazzi, 2016).

2.6 Aspectos sobre a *Arabidopsis thaliana*

A *Arabidopsis thaliana* é descrita como uma planta anual pertencente à família Brassicaceae, que inclui plantas como a couve-flor, rabanete e mostarda. A espécie foi descoberta no século XVI, em 1577, na Alemanha e foi descrita pela primeira vez por Johannes Thal no período em que os estudos de botânica e taxonomia vegetal ganhavam maior visibilidade (Meinke et al., 1998). As pesquisas utilizando a *A. thaliana* foram avançando de modo a aliar a genética com as ferramentas de biologia molecular, alavancando a popularidade da espécie a partir da década de 80.

No ano 2000, foi alcançado o sequenciamento completo do DNA genômico do ecótipo Col-0, sendo, então, a *A. thaliana* a primeira planta e o terceiro organismo multicelular com genoma completamente sequenciado (Initiative, 2000). A partir disso, diversas informações como estrutura, expressão e produtos gênicos, mapa do genoma, marcadores genéticos se tornaram disponíveis (The Arabidopsis Information Resource – TAIR – www.arabidopsis.org) à comunidade científica (Huala et al., 2001).

Quanto à origem da *A. thaliana*, é nativa da Eurásia Ocidental, sendo uma espécie de planta colonizadora e pioneira em ambiente de solos pedregosos e rasos. A espécie pode ser encontrada ainda em ambientes pobres em nutrientes, arenosos e em habitats florestais (Mitchell-Olds et al., 2006) e se encontra distribuída por vários continentes principalmente nas regiões temperadas do hemisfério norte (Meinke et al., 1998; Krämer, 2015).

A *A. thaliana* não é uma planta de interesse econômico, entretanto, algumas das suas características a tornam um modelo experimental para estudos biológicos. O ciclo de vida dessa espécie se inicia com a germinação, formação da roseta, florescimento até a maturação das primeiras sementes, durando entre cinco e seis semanas (Figura 1) (Meinke et al., 1998).

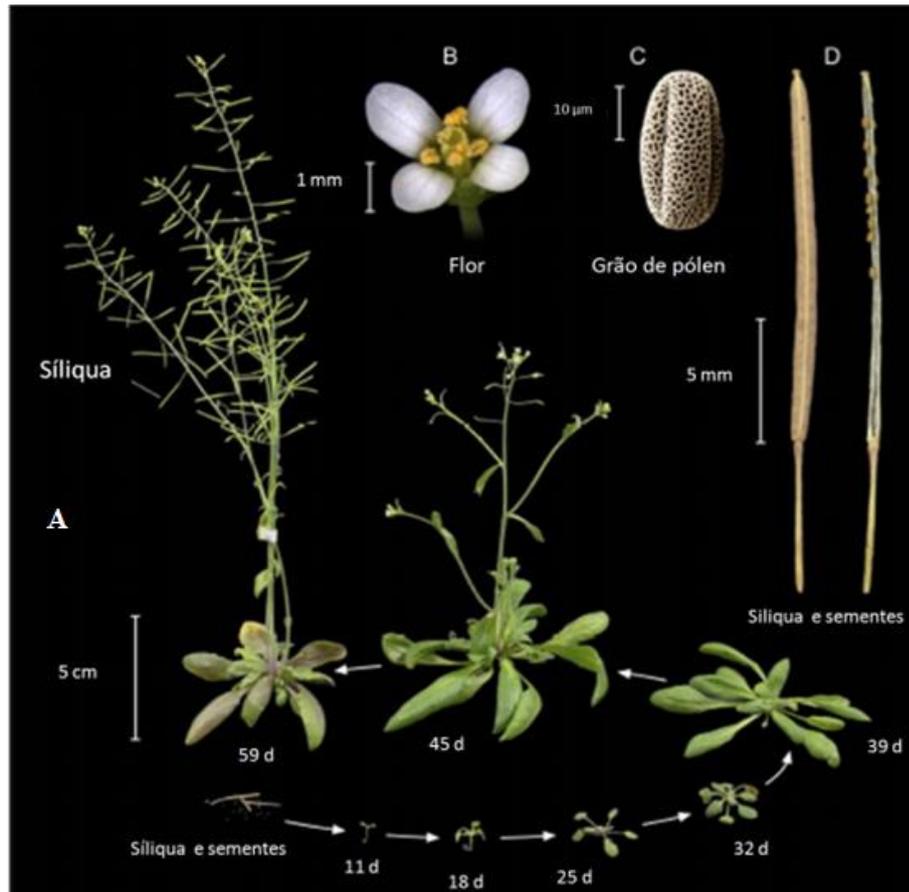


Figura 1 – Ciclo de vida de *A. thaliana*. (A) Ecótipo Col-0 em diferentes estádios do ciclo de vida: desde a semente até a plântula (11 dias), passando pelo crescimento vegetativo (39 dias) e, por fim, alcançando a fase reprodutiva (45 dias). (B) Estrutura floral, (C) Micrografia eletrônica de varredura do grão de pólen, (D) Síliquas maduras e sementes. Adaptado de Krämer (2015).

A espécie apresenta alta fecundidade atingindo produção de até 10.000 sementes por planta. O porte reduzido facilita o cultivo e o crescimento em condições controladas, seja em solo ou em meio definido. Trata-se de uma planta bastante exigente em umidade e luminosidade. As flores são pequenas e contêm anteras e pistilos, o que favorece a autofecundação (Page e Grossniklaus, 2002).

Ao longo dos anos, a *A. thaliana* vem sendo utilizada como modelo para estudos em diversas áreas da Biologia Vegetal, como na investigação de vias envolvidas no controle do desenvolvimento vegetal (Desbrosses et al., 2009), ação hormonal e vias de sinalização em resposta às condições ambientais (Meinke et al., 1998), dentre outros aspectos.

Várias pesquisas empregam técnicas de cultura de tecidos vegetais para estudos dos aspectos genéticos, bioquímicos e fisiológicos da *A. thaliana*. O

cultivo *in vitro* é uma das ferramentas utilizadas para auxiliar nos estudos das rotas metabólicas e regulatórias das espécies. Dentre esses estudos, destacam-se os estudos das vias de sinalização, transcrição e expressão de proteínas, vias de sinalização que regulam a floração, respostas a estresses bióticos e abióticos e identificação e seleção de mutantes (Borém et al., 2005; Carrer et al., 2010; Abe et al., 2014; Sreekanta et al., 2015).

A rapidez e a facilidade com que os experimentos com *A. thaliana* são realizados permitem um enorme avanço nos campos de genética, desenvolvimento vegetal, biologia celular, fisiologia e metabolismo (Krämer, 2015). Muitos campos de estudos têm expandido os conhecimentos por meio da utilização desta planta (Brady et al., 2007; Endo et al., 2014).

Neste sentido, os modelos vegetais de fácil cultivo permitem a observação rápida de respostas a estímulos, garantindo a possibilidade de testar hipóteses. Cavalini et al. (2004), citaram como modelos o tomate, a ervilha, o milho, o arroz e *Arabidopsis thaliana*. Nesse mesmo sentido, pode-se incluir o pimentão e a batata-doce como modelo experimental para estudos biológicos.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Criar um protocolo de utilização do hidrogel em alternativa ao uso de ágar em meio de cultura no cultivo *in vitro* de pimentão 'Casca Dura Ikeda', batata-doce UENF 1937 e *Arabidopsis thaliana* ecótipo Col-0.

3.2 Específicos

- Determinar a composição química do hidrogel e do ágar;
- Verificar a presença de sais solúveis no hidrogel e no ágar;
- Determinar um método de esterilização do meio contendo hidrogel;
- Determinar o pH da solução de sais de MS para o meio de cultura contendo hidrogel;
- Determinar a concentração de hidrogel a ser empregada no meio de cultura;
- Verificar as respostas biométricas e fisiológicas das plantas de pimentão 'Casca Dura Ikeda', batata-doce UENF 1937 e *Arabidopsis thaliana* Col-0 cultivadas nos meios de cultura contendo hidrogel e comparar com as cultivadas com ágar ao final da etapa *in vitro*;
- Verificar as respostas biométricas das plantas de pimentão 'Casca Dura Ikeda' e batata-doce UENF 1937 cultivadas nos meios de cultura contendo

hidrogel e comparar com as cultivadas com ágar ao final da fase de aclimatização.

4. TRABALHOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICA E QUÍMICA DOS AGENTES GELEIFICANTES DE MEIO DE CULTURA: HIDROGEL HYDROPLAN-EB® E ÁGAR BACTERIOLÓGICO VETEC®

RESUMO

O ágar é o componente mais dispendioso do meio de cultura no cultivo *in vitro* de plantas. Em proposta à substituição do ágar, tem-se o hidrogel que é uma substância capaz de formar gel e solidificar o meio, é transparente e com custo inferior ao ágar. No entanto, pouco se conhece sobre as propriedades químicas e físicas deste material. Diante disto, o objetivo com o trabalho foi investigar as propriedades químicas e físicas do hidrogel HyC Hydroplan-EB® para substituir o ágar no meio de Murashige e Skoog (MS). Para isso foram realizadas análises químicas dos agentes geleificantes, estudos das propriedades do ágar e do hidrogel solubilizados em água e solubilizados na solução de sais de Murashige e Skoog (MS). Nas análises químicas, investigou-se o teor de nutrientes totais e de sais solúveis. Nos estudos das propriedades do ágar e do hidrogel solubilizados em água foram feitos experimentos para determinar o pH, CE e retenção de água

dos agentes geleificantes em diferentes concentrações. Nos estudos das propriedades do ágar e do hidrogel solubilizados na solução de sais MS foram realizados cinco experimentos com o intuito de determinar a concentração de hidrogel a ser empregada nos meios de cultura e o pH da solução de sais. A análise de nutrientes totais mostrou que o hidrogel possui menores teores para a maioria dos macros e micronutrientes, exceto para o nitrogênio, potássio e enxofre. Porém, os teores de nitrogênio e enxofre não influenciaram na composição salina dos sais do meio MS. Quanto aos géis formados da solubilização do hidrogel e ágar em água desionizada (pH 5,7), o aumento da concentração dos agentes geleificantes não interferiu no pH dos géis formados. O pH dos géis de hidrogel variou entre 6,85 e 7,21 e o dos géis de ágar, entre 4,87 e 5,40. Quanto aos meios de cultura formados da solubilização dos agentes geleificantes em solução de sais de MS (pH 5,8), houve alcalinização, após a autoclavagem, dos meios com hidrogel em função do aumento da concentração. O meio contendo ágar não apresentou alteração de pH em função da autoclavagem. Quanto a CE, nos meios contendo hidrogel a CE aumentou em função do aumento da concentração. A CE dos meios com hidrogel é superior a CE do meio com ágar. Meios contendo hidrogel, nas diferentes concentrações, submetidos à acidificação tornaram-se alcalinos após a autoclavagem. A esterilização química do meio de cultura contendo hidrogel não modificou o pH final do meio. A concentração de hidrogel para solidificar o meio de cultura deve ser de 24 g L⁻¹. O pH da solução de sais do meio MS deve ser 1,5 para que, após a autoclavagem, o meio apresente pH igual a 5,5. A autoclavagem do hidrogel não hidratado deve ser feita separadamente da solução de sais do meio MS, a 121° C, 1,0 atm e 15 minutos.

ABSTRACT

Agar is the most expensive component of the culture medium in *in vitro* plant culture. In the proposal for the substitution of agar, the hydrogel is a gel

capable of solidifying the medium, it is transparent and cost less than agar. However, little is known about the chemical and physical properties of this material. In view of this, the aim of the work was to investigate the chemical and physical properties of the HyC Hydroplan-EB[®] hydrogel to replace the agar in Murashige and Skoog (MS) medium. For this, chemical analyzes of the gelling agents, water and solubilized agar and water solubility studies were performed and solubilized in the Murashige and Skoog (MS) salts solution. In the chemical analyzes, the content of total nutrients and soluble salts was investigated. In the studies of water solubilised agar and water properties experiments were performed to determine the pH, EC and water retention of the gelling agents in different concentrations. In the studies of the properties of the agar and the hydrogel solubilized in the solution of MS salts, five experiments were carried out in order to determine the concentration of hydrogel to be used in the culture media and the pH of the salt solution. The analysis of total nutrients showed that the hydrogel has lower contents for most macros and micronutrients, except for nitrogen, potassium and sulfur. However, the nitrogen and sulfur contents did not influence the saline composition of the MS medium salts. As for the gels formed from the solubilization of the hydrogel and agar in deionized water (pH 5.7), the increased concentration of the gelling agents did not interfere with the pH of the formed gels. The pH of the hydrogel gels varied between 6.85 and 7.21 and that of the agar gels, between 4.87 and 5.40. As for the culture media formed from the solubilization of the gelling agents in MS salts solution (pH 5.8), the media with hydrogel was alkalized after the autoclaving, as a function of the concentration increase. The medium containing agar did not change pH as a function of autoclaving. As for the EC, in the hydrogel media the EC increased as the concentration increased. The EC of the hydrogel media is higher than the CE of the medium with agar. Means containing hydrogel, at different concentrations, subjected to acidification became alkaline after autoclaving. Chemical sterilization of the hydrogel containing culture medium did not modify the final pH of the medium. The concentration of hydrogel to solidify the culture medium should be 24 g L⁻¹. The pH of the MS medium salt solution should be 1.5 so that, after autoclaving, the medium shows pH equal to 5.5. The autoclaving of the non-hydrated hydrogel should be done separately from the solution of salts of the MS medium, at 121 °C, 1.0 atm and 15 minutes.

INTRODUÇÃO

As propriedades de um agente geleificante são de elementar importância na composição do meio de cultura. A partir dessas propriedades são garantidas as condições necessárias ao crescimento do explante como: a firmeza do gel, capacidade de retenção de água, disponibilidade de nutrientes, toxicidade, esterilidade do meio, dentre outras (Khan et al., 2009; Tavakol et al., 2016).

As principais propriedades a serem inicialmente investigadas ao se propor um agente geleificante alternativo são a composição química, presença de íons livres quando solubilizado, toxicidade causada por esses íons livres ou por outras substâncias, potencial hidrogênico (pH), capacidade de retenção e resistência à penetração (Khan et al., 2009; Debrassi et al., 2011; Gui et al., 2013; Yu et al., 2013; Matalanis e McClements, 2013; Bardajee e Hooshyar, 2014). Essas propriedades ajudam na inferência da resposta do agente geleificante quando for utilizado para o cultivo de células, sejam elas vegetais ou animais (Khan et al., 2009; Chang e Zhang, 2011).

Para avaliar essas propriedades algumas metodologias analíticas podem ser adotadas. A análise da condutividade elétrica (CE) é adotada para quantificar íons livres na solução, a análise de pH para inferir sobre a disponibilidade de nutrientes, o teste do tensiômetro para determinar a resistência à difusão de água e nutrientes para o explante, a microscopia eletrônica de varredura para averiguar a porosidade do gel, o teste de penetração para averiguar a resistência do material, entre outras (Chang e Zhang, 2011; Bardajee e Hooshyar, 2014; Santos et al., 2016).

As respostas dos agentes geleificantes podem ser diferentes conforme o solvente utilizado para solubilizá-los. Primeiramente, para obter informações das respostas do agente geleificante sem interferência de outras substâncias, o ideal é solubilizá-lo em água desionizada (Chang e Zhang, 2011). No entanto, essas propriedades podem não ser as mesmas quando os agentes geleificantes forem

incorporados ao meio de cultura. Considerando que a solução de sais do meio MS (Murashige e Skoog, 1962) é o solvente dos agentes geleificantes no meio de cultura, torna-se de extrema importância realizar um estudo solubilizando o ágar (testemunha) e o hidrogel em solução de sais do meio MS.

O conhecimento das respostas dos agentes geleificantes possibilita verificar a ocorrência de mudanças quando solubilizados em solução salina e, ou, nutritiva. Todas essas respostas auxiliam nas tomadas de decisões a respeito da necessidade de modificação no protocolo de preparo de meio de cultura usual (Bardajee e Hooshyar, 2014; Ullah et al., 2015). As modificações podem ser em relação à concentração necessária para solidificar o meio de cultura, pH do meio, teor de sais e método de esterilização. Nesse sentido, conhecer as propriedades físicas e químicas do hidrogel e do ágar solubilizados em água desionizada e em solução de sais do meio MS torna-se de fundamental importância.

Assim exposto, o objetivo com este trabalho foi estudar as propriedades químicas e físicas do hidrogel para definir a concentração a ser utilizada para solidificar o meio de cultura, o pH da solução de sais do meio MS e a forma de esterilização do meio de cultura.

MATERIAL E MÉTODOS

Descrição dos agentes geleificantes

O ágar utilizado nas análises e experimentos foi da marca Vetec[®], Lote DCBD3003V, fabricado em 27 de agosto de 2015. O hidrogel utilizado foi da marca Hydroplan-EB[®], de granulometria fina, denominado pela empresa de HyC.

Análise química dos agentes geleificantes

O ágar e o hidrogel foram submetidos às análises químicas de nutrientes totais e de sais solúveis para quantificação dos níveis totais de macro e micronutrientes e para os nutrientes solúveis, respectivamente.

Análise de nutrientes totais

A análise de nutrientes totais foi realizada no Departamento de Nutrição Mineral de Plantas do LFIT da UENF e teve por objetivo quantificar os teores totais de nitrogênio (N), fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca), magnésio (Mg), enxofre (S), boro (B), ferro (Fe), zinco (Zn), manganês (Mn), cobre (Cu), molibdênio (Mo) e níquel (Ni).

Na determinação do teor de N total por meio da digestão sulfúrica, usou-se 0,2 g de cada amostra para 1,5 mL de ácido sulfúrico (95-98%). Para as amostras de hidrogel foram necessários 2 mL de peróxido de hidrogênio (30%) para clarear o extrato, enquanto que no ágar não foi necessário. A leitura do extrato foi feita segundo o método de Nessler (Jackson, 1965).

Os teores de P, K, Ca, Mg, S, B, Fe, Zn, Mn, Cu, Mo e Ni foram determinados após digestão nítrico-perclórica das amostras em bloco digestor (Peters, 2005). Adotou-se para a digestão nítrica 0,2 g de cada amostra, 3 mL de ácido nítrico (65%) e 3 mL de peróxido de hidrogênio (30%). Após a digestão, completou-se com ácido nítrico (2,6%) o volume do extrato no tubo até obter 10 mL de volume final. No extrato resultante, os teores de Ca, Mg, Cu, Fe, Mn, Zn, Mo, B e Ni foram determinados por espectrofotometria de emissão atômica (ICPE-9000, Shimadzu); o K por fotometria de chama; o P por colorimetria; o S por turbidimetria.

Análises de sais solúveis

As análises de sais solúveis foram realizadas no Centro de Análises da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), *campus* Dr. Leonel Miranda. Foram analisadas cinco concentrações de hidrogel (1, 2, 3, 4 e 5 g L⁻¹) e

seis de ágar (5, 6, 7, 8, 9 e 10 g L⁻¹), com três repetições cada e diluídas em 150 mL de água desionizada.

As amostras foram filtradas em unidade de filtração a vácuo descartável, marca Kasvi, substituindo-se o filtro original pelo filtro de Whattman nº. 42. A pressão negativa foi aplicada por meio de bomba de vácuo. As amostras de hidrogel foram analisadas nessas concentrações devido à impossibilidade de filtragem em concentrações mais altas. As amostras de ágar foram analisadas nessas concentrações por serem usualmente utilizadas nos meios de cultura para tecidos vegetais.

Foi possível quantificar os teores de N, K, sódio (Na), Ca e Mg. Para a determinação dos teores de K, Na, Ca e Mg empregou-se a metodologia do Centro de Análises da UFRRJ para análise de água. Na determinação dos teores de K e Na, os filtrados foram submetidos diretamente à leitura no fotômetro de chama (B462, Micronal). Na determinação dos teores de Ca e Mg, adicionou-se 1 mL da amostra a 25 mL de cloreto de lantânio concentrado a 0,1% e a leitura foi realizada por meio do espectrofotômetro de absorção atômica (55B). A determinação do teor de N foi a partir da metodologia de análise de resíduo líquido que emprega a digestão sulfúrica para extração e o método de Kjeldahl para determinação do teor de N.

O método clássico Kjeldahl compreende duas etapas: (1) digestão da amostra em ácido sulfúrico concentrado para converter nitrogênio orgânico (Norg) a íon amônio (N-NH₄⁺) e (2) determinação do N-NH₄⁺ digerido, após destilação com álcali. O sulfato de amônio resultante da digestão é aquecido com uma base, desprendendo amônia (NH₃), cuja reação pode ser representada pela equação: $\text{NH}_4^+ + \text{OH}^- \rightleftharpoons \text{NH}_3 + \text{H}_2\text{O}$. A amônia é então recolhida em uma solução ácida, e a espécie N-NH₄⁺ determinada por colorimetria, eletrodo íon seletivo ou titulação com solução padrão ácida (Verma et al., 2007; Bolado-Rodríguez et al., 2010).

Propriedade química e física dos agentes geleificantes solubilizados em água desionizada

Teste I – Análise de pH dos agentes geleificantes solubilizados em água desionizada

O teste foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC) com 12 tratamentos e três repetições. Os tratamentos referem-se a seis concentrações de hidrogel (5,0; 7,0; 10,5; 15,0; 17,5 e 22,5 g L⁻¹) e seis concentrações de ágar (1,5; 3,5; 5,0; 7,0; 10,5 e 13 g L⁻¹). Cada repetição foi composta de um frasco (65x125mm) contendo o agente geleificante solubilizado em 150 mL de água desionizada.

As concentrações de ágar foram estabelecidas em função das comumente utilizadas nos cultivos *in vitro*, extrapolando valores inferiores e superiores a elas. Já as concentrações de hidrogel foram escolhidas conforme a percepção da concentração necessária para geleificar 150 mL de água, considerando também, as concentrações adotadas por Moraes (2015) na micropropagação de abacaxizeiro 'Gold'.

A água desionizada teve o pH aferido em triplicata, apresentando média aritmética das três leituras igual a 5,7. Após a absorção completa da água pelos grânulos de hidrogel o pH foi aferido diretamente nos géis, a temperatura de 21,5° C. Todas as aferições de pH foram realizadas por meio de pHmetro Hanna® (HI 2210-01).

Os dados foram submetidos às pressuposições de normalidade e homogeneidade. Em seguida, realizou-se a análise de variância (ANOVA). Os dados foram comparados pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando o software SISVAR versão 5.6 (Ferreira, 2011).

A partir desses resultados, definiu-se o experimento seguinte, cujo objetivo foi acidificar a água desionizada e observar a resposta dos géis formados pelo hidrogel.

Teste II – pH do hidrogel solubilizado em água desionizada acidificada

Com os resultados do teste anterior foi possível observar a necessidade de reduzir o pH da água desionizada para que o gel apresentasse pH mais ácido e ideal para o cultivo de plantas (próximo de 5,5). Para isso, definiu-se as concentrações de hidrogel e os valores de pH com base nos resultados anteriores.

O teste foi conduzido em DIC, com quatro tratamentos e três repetições. Os tratamentos referem-se a diferentes concentrações de hidrogel combinadas com água acidificada em diferentes níveis, sendo: T1 - 5,0 g L⁻¹ de hidrogel e pH da água desionizada ajustado para 2,5; T2 - 7,0 g L⁻¹ de hidrogel e pH da água desionizada ajustado para 3,0; T3 - 10,5 g L⁻¹ de hidrogel e pH da água desionizada ajustado para 3,5 e T4 - 15 g L⁻¹ de hidrogel e pH da água desionizada ajustado para 2,0. Cada repetição foi composta por um frasco (65x125mm) contendo o agente geleificante solubilizado em 150 mL de água desionizada. O pH foi aferido diretamente nos géis por meio de pHmetro Hanna® (HI 2210-01), à temperatura de 23,2° C.

Os dados foram submetidos às pressuposições de normalidade e homogeneidade. Em seguida, realizou-se a análise de variância (ANOVA). As médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando o software SISVAR versão 5.6 (Ferreira, 2011).

Teste III – Retenção de água dos agentes geleificantes pelo método do tensiômetro

O teste de retenção pelo método do tensiômetro visou determinar a capacidade de retenção de água dos agentes geleificantes em diferentes concentrações.

O teste foi conduzido em DIC, em esquema fatorial duplo 12x8, com três repetições. O fator 1 refere-se a 12 formulações de géis (1,5 g L⁻¹ de ágar; 3,5 g L⁻¹ de ágar; 5,0 g L⁻¹ de ágar; 7,0 g L⁻¹ de ágar; 10,5 g L⁻¹ de ágar; 13,0 g L⁻¹ de ágar; 5,0 g L⁻¹ de hidrogel; 7,0 g L⁻¹ de hidrogel; 10,5 g L⁻¹ de hidrogel; 15,0 g L⁻¹ de hidrogel; 17,0 g L⁻¹ de hidrogel; 22,5 g L⁻¹ de hidrogel) e o fator 2, a oito tempos

de retenção (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 23 horas). Cada repetição foi representada por um frasco, em que a concentração do agente geleificante foi hidratada em 250 mL de água desionizada.

Um tensiômetro foi introduzido em cada frasco contendo o gel e mantido por 23 horas à temperatura média de 22° C. Para evitar a perda de água por evaporação, o frasco foi vedado com filme plástico mantendo um furo por onde o tensiômetro foi introduzido (Figura 1).



Figura 1 – Teste de retenção de água pelo método do tensiômetro. A – Aferição da tensão por meio de tensímetro diretamente no tensiômetro. B – Ilustração dos tensiômetros inseridos nos frascos contendo gel.

No tempo zero, foi exercida uma tensão em cada tensiômetro e imediatamente em seguida, a tensão foi aferida por meio de tensímetro digital, marca Blumat modelo HID07. A cada hora, durante seis horas a partir do tempo zero, a tensão em cada tensiômetro foi monitorada. Na 23^a hora, a tensão em cada tensiômetro foi monitorada pela última vez.

Os dados foram submetidos às pressuposições de normalidade e homogeneidade. Em seguida, realizou-se a análise de variância (ANOVA). Os

dados qualitativos foram comparados pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade e os dados quantitativos, pela análise de regressão, utilizando o software SISVAR versão 5.6 (Ferreira, 2011).

Propriedades químicas e físicas dos agentes geleificantes solubilizados em solução de sais minerais de Murashige e Skoog (MS)

Experimento I – Meios de cultura solubilizados em solução de sais de MS (Murashige e Skoog, 1962) com pH ajustado para 5,8 – autoclavagem por 20 minutos

O experimento foi conduzido em DIC, em esquema fatorial duplo 6x2 com um tratamento adicional, com três repetições, sendo cada repetição um frasco (65x125 mm) com 50 mL de meio de cultura. O fator 1 foi representado por seis concentrações de hidrogel (16, 18, 20, 22 e 24 g L⁻¹) e o fator 2, por dois períodos de aferição de pH do meio (antes e após a autoclavagem). O tratamento adicional (testemunha) correspondeu ao meio de cultura com 8 g L⁻¹ de ágar.

Os meios de cultura foram preparados com 100% dos sais minerais de MS e vitaminas de White (Murashige e Skoog, 1962), 30 g L⁻¹ de sacarose, 100 mg L⁻¹ de myo-inositol e o pH da solução ajustado para 5,8 antes da adição dos agentes geleificantes.

Devido às propriedades do hidrogel, verificou-se a impossibilidade de solubilizá-lo na solução antes de vertê-la nos frascos. Por este motivo, o hidrogel foi pesado em porções individuais correspondente a cada frasco, depositado no frasco e por fim, foram adicionados 50 mL da solução com pH já ajustado em cada frasco. O hidrogel absorveu toda a porção líquida do meio formando um gel.

O pH dos meios de cultura foi aferido antes de serem autoclavados, à temperatura de 23,8° C. Foram feitas três aferições em cada frasco. Em seguida, os meios foram autoclavados a 1,0 atm de pressão e 121° C, por 20 minutos. Após a autoclavagem, os meios foram armazenados na sala de cultivo durante 48 horas para que perdessem o calor da autoclavagem e atingisse estabilidade de suas propriedades.

Após esse período foram aferidos o pH e a CE diretamente nos meios de cultura em ambiente não estéril. Foram feitas três aferições em cada frasco. O condutímetro e o pHmetro utilizados em todas as aferições desse e dos demais experimentos foi o Lutron® (CD-4301) e Hanna® (HI 2210-01), respectivamente. Os dados foram submetidos às pressuposições de normalidade e homogeneidade. Em seguida, realizou-se a análise de variância (ANOVA). Os dados foram comparados pela análise de regressão, utilizando o software SISVAR versão 5.6 (Ferreira, 2011).

Este experimento foi realizado, de modo que todos os meios tivessem o pH ajustado para 5,8. Visto que, nestas condições, as concentrações de hidrogel apresentaram tendência de manter o pH alcalino após a autoclavagem, não foi possível identificar a concentração que proporcionasse ao meio um pH na faixa de 4,5 a 5,5. Desse modo, implementou-se o experimento 2, em que foram feitas alterações nos valores de pH da solução de sais antes da adição do hidrogel.

Experimento II – Meios de cultura com diferentes concentrações de hidrogel solubilizadas em solução de sais de MS (Murashige e Skoog, 1962) com diferentes valores de pH – autoclavados por 20 minutos

O experimento foi conduzido em DIC no esquema fatorial triplo 5x5x2 com um tratamento adicional, para a variável pH do meio. Para a variável condutividade elétrica, o esquema foi em fatorial duplo 5x5. O fator 1 correspondeu aos diferentes valores de pH na solução de sais (5,8; 3,0; 2,5; 2,0 e 1,5), o fator 2, às diferentes concentrações de hidrogel (16; 18; 20; 22 e 24 g L⁻¹) e o fator 3, ao período de aferição do pH do meio (antes e depois da autoclavagem). O tratamento adicional (testemunha) correspondeu ao meio de cultura solidificado com 8 g L⁻¹ de ágar e pH da solução de sais em 5,8. Foram utilizadas três repetições, em que cada uma foi representada por um frasco (65x125 mm) contendo 50 mL de meio de cultura. Os valores de pH foram definidos a partir de ensaios já realizados, que indicaram que o hidrogel tende a aumentar o pH do meio.

Os meios de cultura foram preparados com 100% dos sais minerais de MS e vitaminas de White (Murashige e Skoog, 1962), 30 g L⁻¹ de sacarose e 100

mg L⁻¹ de myo-inositol. A concentração de hidrogel obedeceu ao estabelecido para cada tratamento e o pH da solução de sais foi ajustado antes da adição do hidrogel por meio do pHmetro Hanna® (HI 2210-01).

O pH dos meios de cultura foi aferido antes de serem autoclavados, à temperatura de 23,5° C. Foram feitas três aferições em cada frasco. Em seguida, os meios foram autoclavados a 1,0 atm de pressão e 121° C, por 20 minutos. Após a autoclavagem, os meios foram armazenados na sala de cultivo durante 48 horas para que perdessem o calor da autoclavagem e atingisse estabilidade de suas propriedades. Após esse período foram aferidos o pH e a CE diretamente nos meios de cultura em ambiente não estéril. Foram feitas três aferições em cada frasco.

Os dados foram submetidos às pressuposições de normalidade e homogeneidade. Em seguida, realizou-se a análise de variância (ANOVA). Os dados qualitativos foram comparados pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade e os dados quantitativos, pela análise de regressão, utilizando o software SISVAR versão 5.6 (Ferreira, 2011).

Experimento III – Meios de cultura com diferentes concentrações de hidrogel solubilizado em solução de sais de MS (Murashige e Skoog, 1962) com diferentes valores de pH submetidos à esterilização química

Este experimento foi realizado com intuito de averiguar se a esterilização química altera as propriedades de pH e CE do meio de cultura. Para isso, decidiu-se adotar apenas os valores de pH 2,0 e 1,5, visto que foram os que mais se aproximaram do objetivo a ser alcançado.

O experimento foi conduzido em DIC, no esquema fatorial duplo 5x2 com tratamento adicional e três repetições. Cada repetição foi representada por um frasco (65x125 mm) contendo 50 mL de meio de cultura. O fator 1 correspondeu a cinco concentrações de hidrogel (16, 18, 20, 22 e 24 g L⁻¹), o fator 2, a dois valores de pH na solução de sais (2,0 e 1,5), o tratamento adicional (testemunha), ao meio de cultura contendo 8 g L⁻¹ de ágar e pH da solução de sais em 5,8.

Os meios de cultura foram preparados com 100% dos sais minerais de MS e vitaminas de White (Murashige e Skoog, 1962), 30 g L⁻¹ de sacarose, 100

mg L⁻¹ de myo-inositol e o pH da solução ajustado para 5,8 antes da adição dos agentes geleificantes.

A esterilização do meio de cultura foi realizada por meio da adição de 0,0003% de hipoclorito de sódio (NaClO). Essa concentração foi adotada seguindo a metodologia de Teixeira et al. (2006). Nos meios de cultura contendo ágar, a solução de NaClO foi adicionada após o ágar ter sido fundido e inserido na solução de sais com o pH ajustado. Já nos meios contendo hidrogel, foi adicionada à solução de sais após aferir o pH e antes de adicioná-la ao hidrogel.

O pH e a CE foram aferidos diretamente nos meios de cultura em ambiente não estéril. Foram feitas três aferições em cada frasco. Os dados foram submetidos às pressuposições de normalidade e homogeneidade. Em seguida, realizou-se a análise de variância (ANOVA). Os dados qualitativos foram comparados pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade e os dados quantitativos, pela análise de regressão, utilizando o software SISVAR versão 5.6 (Ferreira, 2011).

Experimento IV – Esterilização física do hidrogel e do tubo de ensaio e esterilização química do meio de cultura

Este experimento foi montado para averiguar a possibilidade de autoclavar o hidrogel, de modo a facilitar o preparo dos meios de cultura mantendo o pH na faixa de 5,5. Para isso, autoclavou-se o hidrogel em pó, ou seja, não hidratado.

O experimento foi conduzido em DIC em esquema fatorial duplo 3x2, cujo fator 1 correspondeu a três valores de pH na solução de sais (2,0; 1,5 e 1,0) e o fator 2, a duas concentrações de hidrogel (22 e 24 g L⁻¹). Utilizaram-se três repetições de cada tratamento, sendo cada repetição representada por um tubo de ensaio (25x150 mm) contendo 10 mL de meio de cultura. As concentrações 22 e 24 g L⁻¹ foram fixadas em função de terem proporcionado géis mais consistentes em relação às demais concentrações.

Os meios de cultura foram preparados com 100% dos sais minerais de MS e vitaminas de White (Murashige e Skoog, 1962), 30 g L⁻¹ de sacarose, 100 mg L⁻¹ de myo-inositol e o pH da solução ajustado, conforme os tratamentos,

antes da adição do hidrogel. O hidrogel foi pesado e depositado em tubos de ensaio. Os tubos com o hidrogel em pó foram vedados e autoclavados a 1,0 atm de pressão e 121° C por 15 minutos.

A esterilização foi realizada por meio da adição de 0,0003% de NaClO à solução de sais após aferir o pH e antes de adicioná-la ao hidrogel. Ao final da autoclavagem o meio de cultura esterilizado com solução de NaClO foi vertido nos tubos contendo hidrogel estéril.

O pH foi aferido diretamente nos meios de cultura em ambiente não estéril após 48 horas. Foram feitas três aferições em cada tubo. Os dados foram submetidos às pressuposições de normalidade e homogeneidade. Em seguida, realizou-se a análise de variância (ANOVA). Os dados foram comparados pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade utilizando o software SISVAR versão 5.6 (Ferreira, 2011).

Experimento V – Esterilização física do hidrogel e do meio de cultura em recipientes separados

Este experimento visou possibilitar o uso apenas da esterilização física no preparo de meios de cultura utilizando o hidrogel como agente geleificante. Visto que a autoclavagem do hidrogel hidratado resulta em valores alcalinos de pH, pretendeu-se autoclavar o hidrogel, em pó, separadamente do meio de cultura.

O experimento foi conduzido em DIC, em esquema fatorial duplo 3x2, cujo fator 1 correspondeu a três valores de pH da solução de sais (2,0; 1,5 e 1,0), e o fator 2, a duas concentrações de hidrogel (22 e 24 g L⁻¹). Utilizaram-se cinco repetições de cada tratamento, sendo cada repetição representada por um tubo de ensaio (25x150 mm) contendo 10 mL de meio de cultura.

Os meios de cultura foram preparados com 100% dos sais minerais de MS e vitaminas de White (Murashige e Skoog, 1962), 30 g L⁻¹ de sacarose, 100 mg L⁻¹ de myo-inositol e o pH da solução ajustado, conforme os tratamentos, antes da adição do hidrogel. O hidrogel foi pesado e depositado em tubos de ensaio. Os tubos com o hidrogel em pó foram vedados e a solução foi preparada em um recipiente separado.

A solução e os tubos contendo o hidrogel foram autoclavados a 1,0 atm de pressão e 121° C por 15 minutos. Ao final da autoclavagem o meio de cultura foi vertido nos tubos contendo hidrogel estéril. O pH foi aferido diretamente nos meios de cultura em ambiente não estéril após 48 horas. Foram feitas três aferições em cada tubo.

Os dados foram submetidos às pressuposições de normalidade e homogeneidade. Em seguida, realizou-se a análise de variância (ANOVA). As médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando o software SISVAR versão 5.6 (Ferreira, 2011).

O tratamento que apresentou o pH, após a autoclavagem, próximo ao pH do meio contendo ágar, foi o tratamento adotado para o preparo do meio de cultura contendo hidrogel. Sendo assim, o resultado deste teste indicou o pH e a concentração a serem utilizados no protocolo de preparo do meio de cultura contendo hidrogel para o cultivo *in vitro* de diferentes espécies vegetais.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Análise química dos agentes geleificantes

Análise de nutrientes totais

Os minerais analisados foram B, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni, Zn, N, Ca, K, Mg, P e S. Os teores de cada mineral foram obtidos por meio de digestão, ou seja, são provenientes da estrutura química da substância como também dos minerais trocáveis (Tabela 1).

A análise de nutrientes totais mostrou que o hidrogel apresenta em sua composição química menores teores de micronutrientes quando comparado ao ágar. Para os macronutrientes, o hidrogel apresentou maiores teores de N, K e S, sendo o N o nutriente de maior expressão (136,88 g Kg⁻¹) (Tabela 1).

O ágar, por sua vez, apresentou maiores teores de B, Fe, Mn e Zn. Com relação aos macronutrientes, apresentou-se mais rico apenas em Ca (Tabela 1).

Tabela 1 – Teores dos micros e macronutrientes extraídos por meio de digestão dos agentes geleificantes

Macronutrientes	Ágar	Hidrogel
	g Kg ⁻¹	
N	0,54	136,88
Ca	2,86	0,01
K	0,17	19,3
Mg	0,32	0,01
P	0,03	0,01
S	2,19	5,69
Micronutrientes	Ágar	Hidrogel
	mg Kg ⁻¹	
B	8,11	0,44
Cu	0,83	0,22
Fe	204,72	50,9
Mn	10,01	0,35
Mo	0,05	0,02
Ni	0,19	0,13
Zn	41,91	0,62

Acredita-se que o elevado teor de N esteja relacionado à estrutura química dos hidrogéis de poliacrilamida (poli (2-propenamida)), um monômero cuja estrutura química apresenta grupos livres de NH₂ (Figura 2).

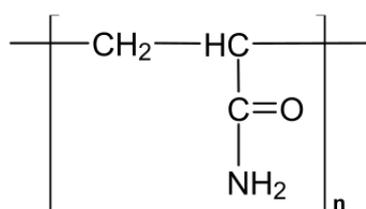


Figura 2 – Composição química de um monômero de acrilamida.

Considerando os teores de minerais fornecidos no meio de cultura de Murashige e Skoog (1962), acredita-se que os minerais presentes no hidrogel, com exceção do nitrogênio, apresentam baixos teores e não atuam como fonte de nutrientes, o que poderia causar o desequilíbrio nutricional no meio de cultura. No entanto, os teores de nitrogênio foram elevados, considerando-se, desta forma, a necessidade de averiguar se estes são estruturais ou solúveis.

Análise de sais solúveis

Nas substâncias analisadas foi possível quantificar apenas os teores de N, K, Na, Ca e Mg (Tabela 2), devido à dificuldade de obter os filtrados e, conseqüentemente, obter o volume de líquido necessário para realizar as análises.

Tabela 2 – Teores de potássio (K⁺), sódio (Na⁺), cálcio (Ca²⁺), magnésio (Mg²⁺) e nitrogênio (N) solúveis no ágar e no hidrogel (HyC) nas diferentes concentrações

Identificação	K ⁺	Na ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	N ^{**}
	mg/dm ³				kg/m ³
1 g L ⁻¹ HyC	14,20	7,67	0,00	0,00	0,00
2 g L ⁻¹ HyC	43,00	8,05	0,00	0,04	0,14
3 g L ⁻¹ HyC	44,20	8,05	1,04	0,09	0,00
4 g L ⁻¹ HyC	79,60	13,57	5,72	0,15	0,70
5 g L ⁻¹ HyC	74,20	12,19	5,20	0,15	0,42
5 g L ⁻¹ Ágar	6,00	10,81	12,22	0,26	0,14
6 g L ⁻¹ Ágar	1,80	5,29	13,52	0,26	0,14
7 g L ⁻¹ Ágar	3,00	5,29	15,86	0,31	0,28
8 g L ⁻¹ Ágar	4,20	6,67	18,20	0,36	0,14
9 g L ⁻¹ Ágar	0,60	6,67	20,02	0,42	0,07
10 g L ⁻¹ Ágar	1,80	8,05	22,88	0,47	0,00

** O Nitrogênio foi analisado por meio da metodologia de resíduo líquido.

Na análise de sais solúveis foi possível observar que o excesso de N verificado na análise de nutrientes totais tratava-se de um elemento químico estrutural do monômero de acrilamida e não de um nutriente disponível. Dessa

forma, não se verificou a necessidade de balanceamento estequiométrico dos sais do meio de Murashige e Skoog (1962) para esse nutriente.

Em contrapartida, observou-se que os teores de K e Na solúveis são mais elevados no hidrogel do que no ágar. Comparando as duas análises nutricionais, pode-se perceber que grande parte do teor de K presente no hidrogel é facilmente disponibilizada ao ser solubilizado. É possível que na concentração de 24 g L⁻¹ de hidrogel (utilizada para o cultivo *in vitro*) as concentrações de K e Na estejam ainda mais elevadas.

O teor total de K fornecido pelo meio de Murashige e Skoog (1962) é 783,91 mg por litro de meio de cultura na forma de nitrato de potássio (KNO₃) e dihidrogenofosfato de potássio (KH₂PO₄). Já o total de sódio fornecido é de 4,64 mg por litro de meio de cultura na forma de sódio EDTA (Na₂EDTA.2H₂O) e molibdato de sódio (Na₂MoO₄.2H₂O). Considerando esses valores, o teor de potássio fornecido pelo hidrogel pode ser tóxico às plantas quando utilizado na concentração de 24 g L⁻¹. Já o sódio ultrapassa o fornecido por Murashige e Skoog desde a dosagem mais baixa de hidrogel analisada (1 g L⁻¹).

Propriedade química e física dos agentes geleificantes solubilizados em água desionizada

Teste I – Análise de pH dos agentes geleificantes solubilizados em água desionizada

Houve diferença entre os agentes geleificantes, em que o hidrogel proporcionou valores de pH superiores ao ágar, variando em uma faixa entre 6,8 e 7,2. Já os géis com ágar apresentaram valores de pH mais baixos variando em uma faixa entre 4,8 e 5,4. Não houve diferença entre as concentrações de cada agente geleificante sobre o pH dos géis (Tabela 3).

Os géis de hidrogel apresentaram pH neutro independente do aumento da concentração e os géis de ágar apresentaram pH levemente ácido. Esses resultados sugerem um poder de tamponamento desses materiais. Logo, pode-se

dizer que o aumento da concentração não interfere na resposta de pH do hidrogel e do ágar quando solubilizados em água desionizada (pH 5,7) (Tabela 3).

Tabela 3 – Resposta do pH em função das concentrações de hidrogel (HyC) e ágar solubilizados em água desionizada (pH 5,7)

Agente Geleificante	Concentração (g L ⁻¹)	pH Géis
HyC	5,0	7,21a
HyC	7,0	7,17a
HyC	10,5	6,96a
HyC	15,0	6,94a
HyC	17,0	6,98a
HyC	22,5	6,85a
Ágar	1,5	4,87b
Ágar	3,5	5,33b
Ágar	5,0	5,33b
Ágar	7,0	5,17b
Ágar	10,5	5,40b
Ágar	13,0	5,02b
CV (%)	4,14	

Médias seguidas de mesma letra na coluna não se diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

O pH adequado para o cultivo de plantas varia entre 4,5 e 5,5. O pH neutro reduz a disponibilidade de nutrientes. Diante dessa informação e considerando os resultados expressos na tabela 3, notou-se a necessidade de estudar a redução do pH em géis contendo hidrogel.

Teste II – pH do hidrogel solubilizado em água desionizada acidificada

Houve diferença entre as composições dos géis, em que foi possível perceber o efeito da redução do pH da água sobre o pH do gel. A concentração de 15 g L⁻¹ de hidrogel associada ao pH ajustado para 2,0 foi a que apresentou pH final do gel mais ácido (dentro da faixa desejável), seguida da concentração de 5,0 g L⁻¹ associada ao pH da água em 2,5 (Tabela 4).

A acidificação da água desionizada possibilitou a obtenção de géis de hidrogel com pH ligeiramente mais ácido do que os géis de hidrogel do Teste I (entre 6,85 e 7,21). Independente da concentração, valores mais baixos de pH podem proporcionar géis com pH mais ácidos.

Tabela 4 – Respostas de pH e características do gel em função das diferentes concentrações de hidrogel e da acidificação da água desionizada

Agente Geleificante	Concentração (g L ⁻¹)	pH Água	pH Gel	Características Gel
Hidrogel	5,0	2,5	6,20 ab	Gel de baixa viscosidade e translúcido
Hidrogel	7,0	3,0	6,57 ab	Gel intermediário e translúcido
Hidrogel	10,5	3,5	6,83 a	Gel de alta viscosidade e translúcido
Hidrogel	15,0	2,0	5,68 b	Gel de alta viscosidade e translúcido
CV (%)		5,15		

Médias seguidas de mesma letra na coluna não se diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (p<0,05).

Com relação às características de coloração e viscosidade dos géis, as maiores concentrações (10,5 e 15,0 g L⁻¹) apresentaram géis com características mais desejáveis para um meio de cultura, mostrando-se altamente viscosos e com maior capacidade de manter o explante bem posicionado. Essa característica é bastante interessante devido ao fato de que meios mais viscosos impedem que o explante fique submerso no gel e tenha problemas com hiperhidricidade. As menores concentrações (5,0 e 7,0 g L⁻¹) associadas a pHs ácidos proporcionaram meios mais líquidos.

A partir desses resultados, observou-se que o pH interfere nas propriedades do hidrogel, reduzindo a força gel à medida que o meio se torna mais ácido. Além disso, com a necessidade de alteração no pH observou-se que adotar concentrações abaixo de 10 g L⁻¹ de hidrogel é inviável. Considerando o

fato de ser necessário aumentar a concentração de hidrogel, tornou-se importante avaliar a retenção de água, visto que meios mais concentrados e compactos dificultam a difusão de água e nutrientes para os explantes.

Teste III – Retenção de água dos agentes geleificantes pelo método do tensiômetro

Não houve normalidade para os dados de retenção de água. Por esse motivo, os dados da variável tensão (kPa) foram transformados em raiz quadrada de $(Y+1)$. Sendo assim, verificou-se diferença entre as composições dos géis e os tempos de retenção. Apenas os géis de hidrogel nas concentrações de 15, 17 e 22,5 g L⁻¹ diferiram dos demais, apresentando maior capacidade de retenção de água. Com relação ao tempo, percebeu-se uma tendência de redução na retenção ao longo do tempo de avaliação (Figura 3).

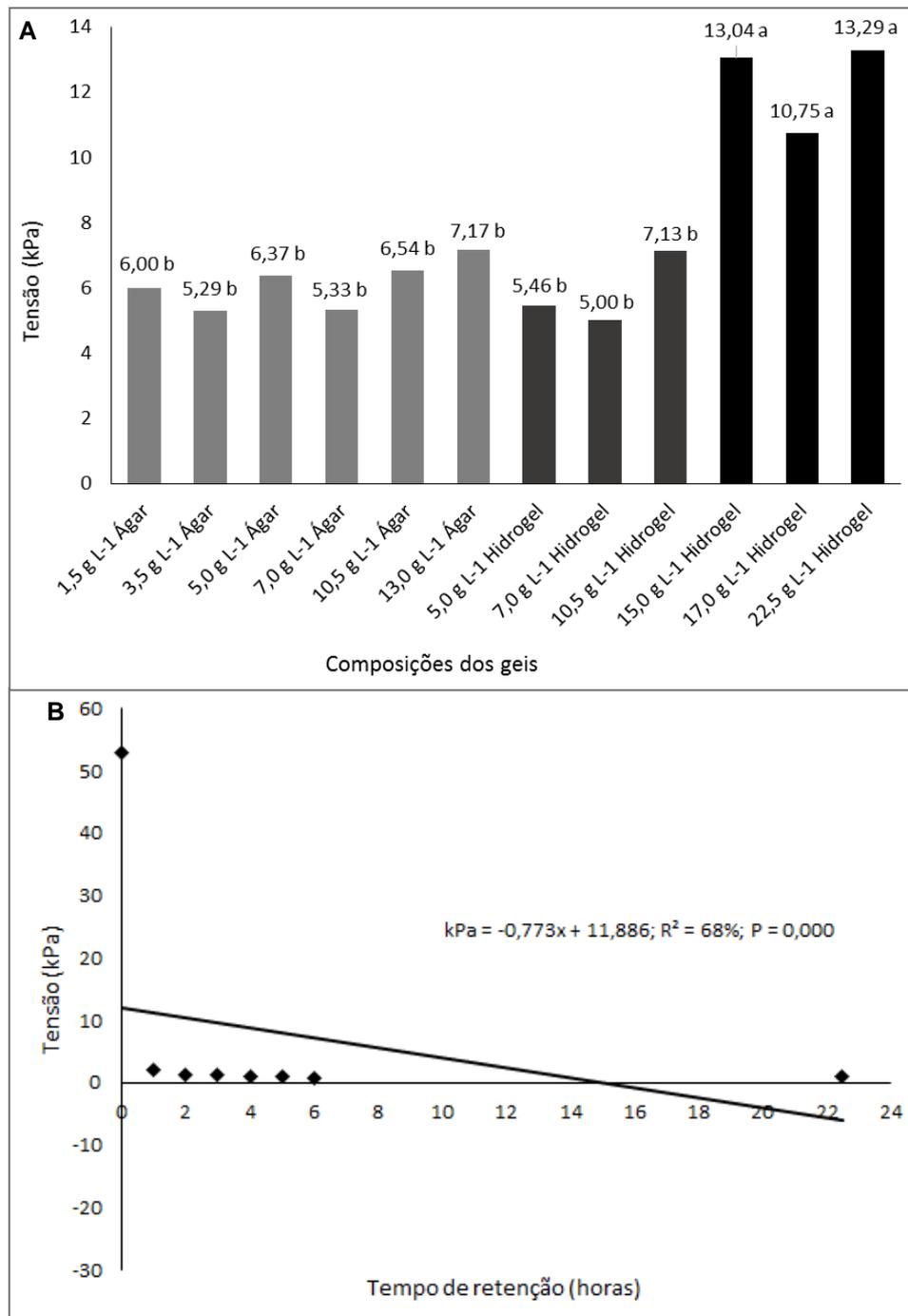


Figura 3 – (A) Capacidade de retenção de água das diferentes composições de géis (CV 36,91%) pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). (B) Capacidade de retenção de água das diferentes composições de géis ao longo do tempo, avaliada por meio da tensão (kPa) pelo teste F ($p < 0,01$).

Navroski et al. (2016) avaliando a incorporação do hidrogel ao substrato na produção de mudas de *Eucalyptus dunnii* Maiden, observaram que a retenção de água nas tensões de 1,0; 5,0 e 10 kPa no substrato contendo 6 g L⁻¹ de

hidrogel foi superior quando comparado ao substrato sem hidrogel. Esse resultado corrobora os resultados dessa pesquisa, visto que géis de hidrogel apresentaram maior retenção de água nas concentrações mais elevadas (15,0, 17,0 e 22,5 g L⁻¹).

Plantas cultivadas a campo estão sujeitas ao elevado déficit de pressão de vapor da atmosfera que promove altas tensões no xilema permitindo o transporte de água do solo/substrato para a planta (Oliveira et al., 2014; Fatichi et al., 2014). Dessa forma, a retenção de água pelo hidrogel se mostra uma vantagem para plantas cultivadas a campo, visto que, estas apresentam tensão no xilema suficiente para absorver a água retida pelo hidrogel.

Considerando a aplicação do hidrogel no meio de cultura, acredita-se que não é desejável que o meio retenha fortemente a água, de maneira que a planta necessite exercer grandes tensões para absorver água e sais minerais do meio de cultura. Plantas cultivadas *in vitro* estão submetidas a condições de umidade relativa do ar próxima a 100%, tendo, dessa forma, baixas taxas de evapotranspiração, baixa tensão no xilema e, conseqüentemente, pouca absorção de água do meio de cultura (Xião et al., 2011).

A retenção de água pelo meio de cultura pode ser prejudicial a depender do tipo de explante, visto que, o explante pode não possuir raízes e, ou xilema formados, estando dependente do transporte passivo de água. Esse transporte de água para o explante só ocorrerá se houver maior concentração de solutos no explante do que no meio de cultura. Considerando a concentração de sais minerais e sacarose do meio de cultura MS (Murashige e Skoog, 1962), tem-se que o meio é mais concentrado que o espaço intracelular, e por esse motivo, o conteúdo da água intracelular é removido por gradiente osmótico (Flores et al., 2013).

Propriedades químicas e físicas dos agentes geleificantes solubilizados em solução de sais minerais de Murashige e Skoog (MS)

Experimento I – Meios de cultura com diferentes agentes geleificantes solubilizados em solução de sais de MS com pH ajustado para 5,8 – autoclavagem por 20 minutos

Houve diferença significativa para interação entre o período de aferição e concentrações de hidrogel, em que os meios autoclavados apresentaram valores de pH superiores aos meios não autoclavados. Apesar do aumento das concentrações de hidrogel, o pH do meio tendeu a se manter constante antes da autoclavagem. O mesmo não ocorreu após a autoclavagem, em que o aumento da concentração tendeu a alcalinizar o pH dos meios de cultura em até 18%. A alcalinização do pH foi de 12,8, 14,3, 15,1, 18,0 e 17,9% para as concentrações de 16, 18, 20, 22 e 24 g L⁻¹ de hidrogel, respectivamente. O meio de cultura contendo ágar não apresentou diferença entre os períodos de aferição de pH (Figura 4).

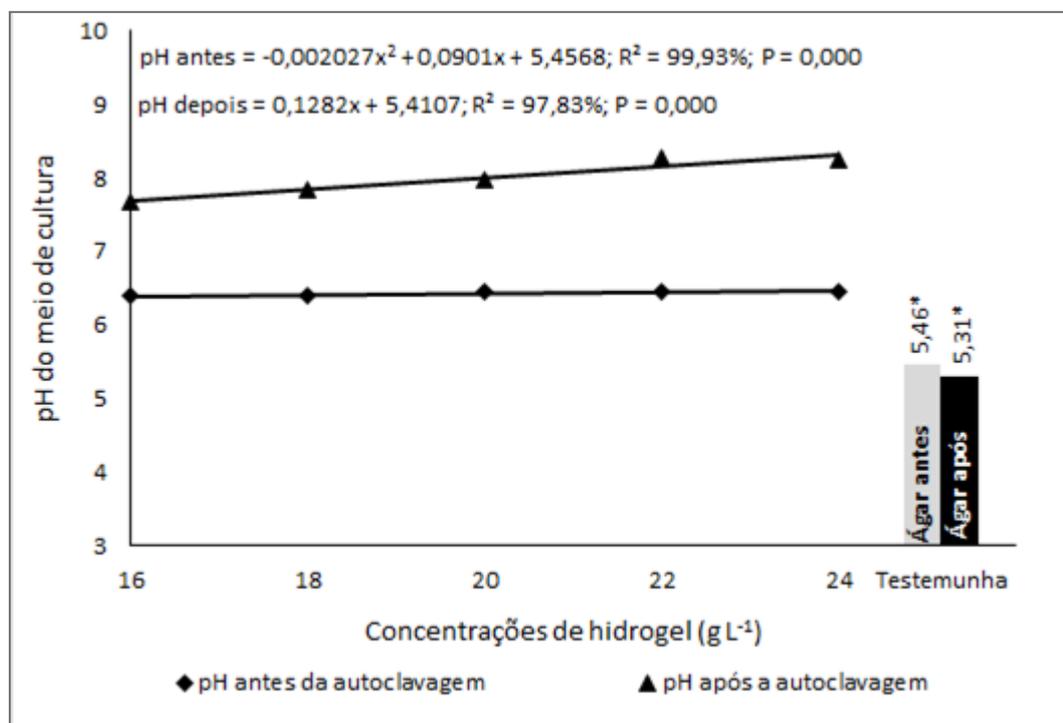


Figura 4 - pH dos meios de cultura em função do aumento da concentração de hidrogel antes e após a autoclavagem em comparação ao meio contendo ágar (testemunha) antes e após a autoclavagem, pelo teste F ($p < 0,01$). * diferença significativa a nível de 1% de probabilidade entre a testemunha e meios contendo hidrogel.

Com relação à condutividade elétrica, houve diferença entre as concentrações de hidrogel, em que foi possível perceber a tendência ao aumento da CE em função do aumento da concentração de hidrogel. Os meios contendo hidrogel apresentaram CE superior ao ágar (Figura 5).

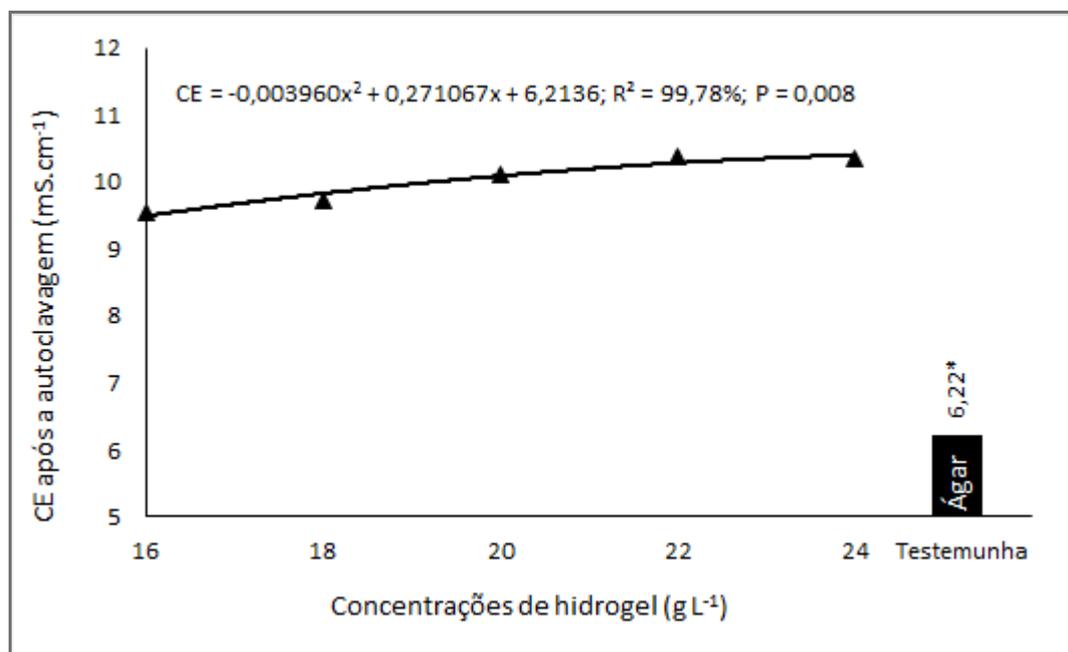


Figura 5 - Condutividade elétrica dos meios de cultura em função do aumento da concentração de hidrogel após a autoclavagem em comparação com o meio contendo ágar (testemunha), pelo teste F ($p < 0,01$). * diferença significativa a nível de 1% de probabilidade entre a testemunha e meios contendo hidrogel.

Quanto ao pH dos meios de cultura, os resultados demonstraram que o hidrogel ao ser solubilizado com os sais de MS demonstrou um poder de tamponamento antes da autoclavagem, ou seja, apesar do aumento da concentração o pH tende a manter uma faixa de 6,4. Após a autoclavagem, os meios contendo hidrogel apresentaram aumento nos valores de pH, variando entre 7,6 na concentração de 16 g L⁻¹ e 8,2 na concentração de 24 g L⁻¹. Esses resultados mostram expressiva alcalinização dos meios em função da autoclavagem, passando de 6,4, antes da autoclavagem, para 8,2, após a autoclavagem.

O meio contendo ágar apresentou-se mais ácido do que o meio contendo hidrogel antes e após a autoclavagem, 5,46 e 5,31, respectivamente. O meio contendo ágar se manteve na faixa de pH considerada adequada para o cultivo *in vitro*, entre 4,5 e 5,5, independente da autoclavagem.

Quanto a CE, os meios contendo ágar apresentaram menor quantidade de íons livres ($6,22 \text{ mS.cm}^{-1}$) quando comparado aos meios contendo hidrogel. À medida que se aumentou a concentração de hidrogel no meio de cultura aumentou-se a condutividade elétrica. Este fato pode estar relacionado com o aumento do fornecimento de potássio e sódio solúveis pelo hidrogel. Sendo assim, maiores concentrações de hidrogel tendem a disponibilizar maiores teores de sais solúveis.

Nas condições deste experimento, não foi possível determinar uma concentração de hidrogel que proporcionasse ao meio um pH entre 4,5 e 5,5 após a autoclavagem. Desse modo, implementou-se o experimento 2, que analisou o efeito da acidificação da solução de sais sobre o pH final do meio contendo hidrogel.

Experimento II – Meios de cultura com diferentes concentrações de hidrogel solubilizado em solução de sais de MS com diferentes valores de pH – autoclavados por 20 minutos

Houve diferença significativa para a interação entre o pH da solução de sais e o período de aferição do pH dos meios de cultura, assim como, para a interação entre concentrações de hidrogel e período de aferição do pH (Figura 6).

Soluções de sais com pH mais elevado proporcionaram meios com pH mais elevado, antes da autoclavagem. No entanto, quando o pH da solução de sais atingiu o valor de 5,8 o meio tendeu a tornar-se mais ácido novamente. Tal resposta se manteve após a autoclavagem, porém, os meios tornaram-se alcalinos perdendo-se o efeito da acidificação. O aumento da concentração de hidrogel proporcionou alcalinização dos meios após a autoclavagem. O ágar não apresentou alteração de pH em função da autoclavagem, mantendo-se na faixa adequada para o cultivo de plantas (Figura 6).

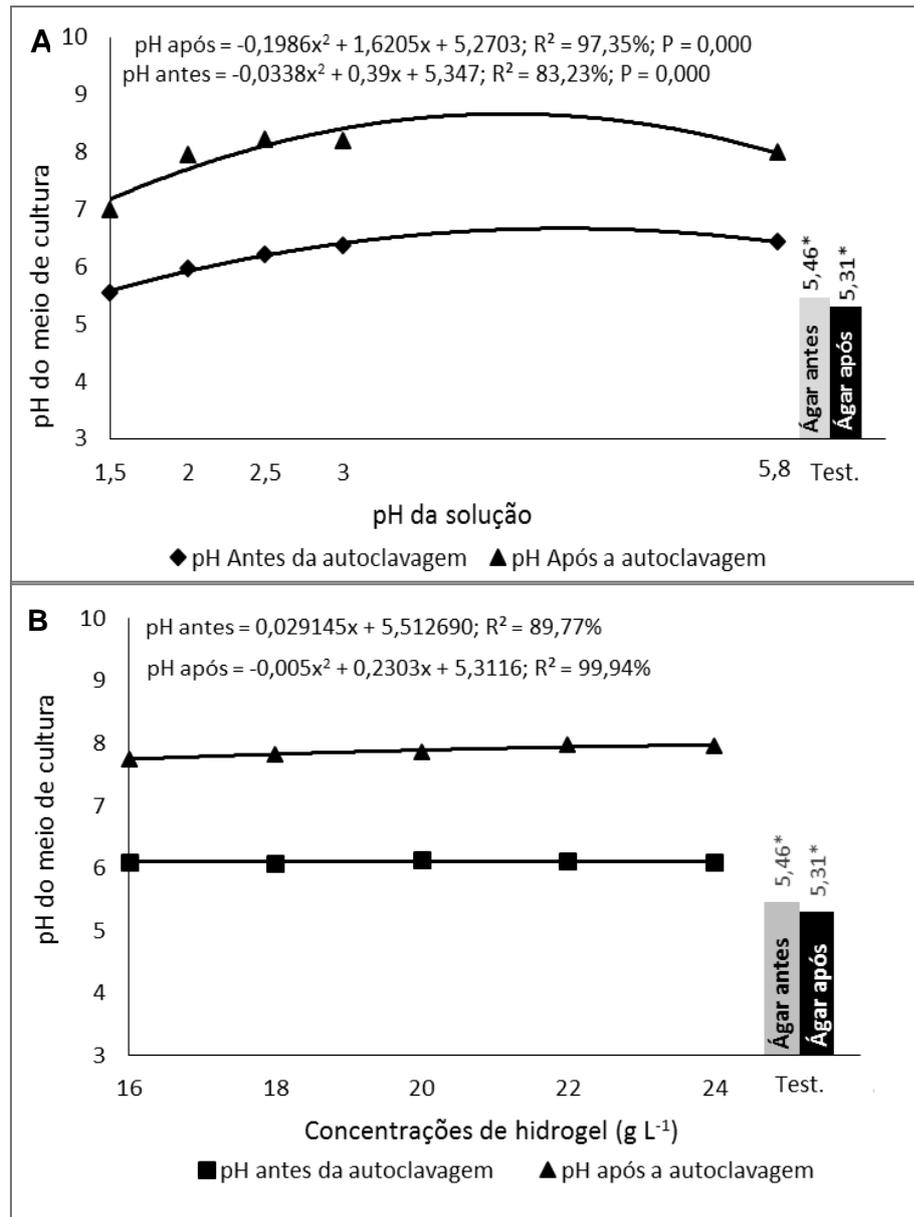


Figura 6 - pH antes e após a autoclavagem dos meios de cultura em função da acidificação da solução de sais de MS (A) e do aumento da concentração de hidrogel (B), pelo teste F ($p < 0,01$). * diferença significativa a nível de 1% de probabilidade entre a testemunha e meios contendo hidrogel.

Com relação a CE, houve diferença significativa para o pH da solução de sais e concentrações de hidrogel, em que foi possível perceber que a acidificação da solução de sais e o aumento da concentração de hidrogel tendem a aumentar a CE (Figura 7).

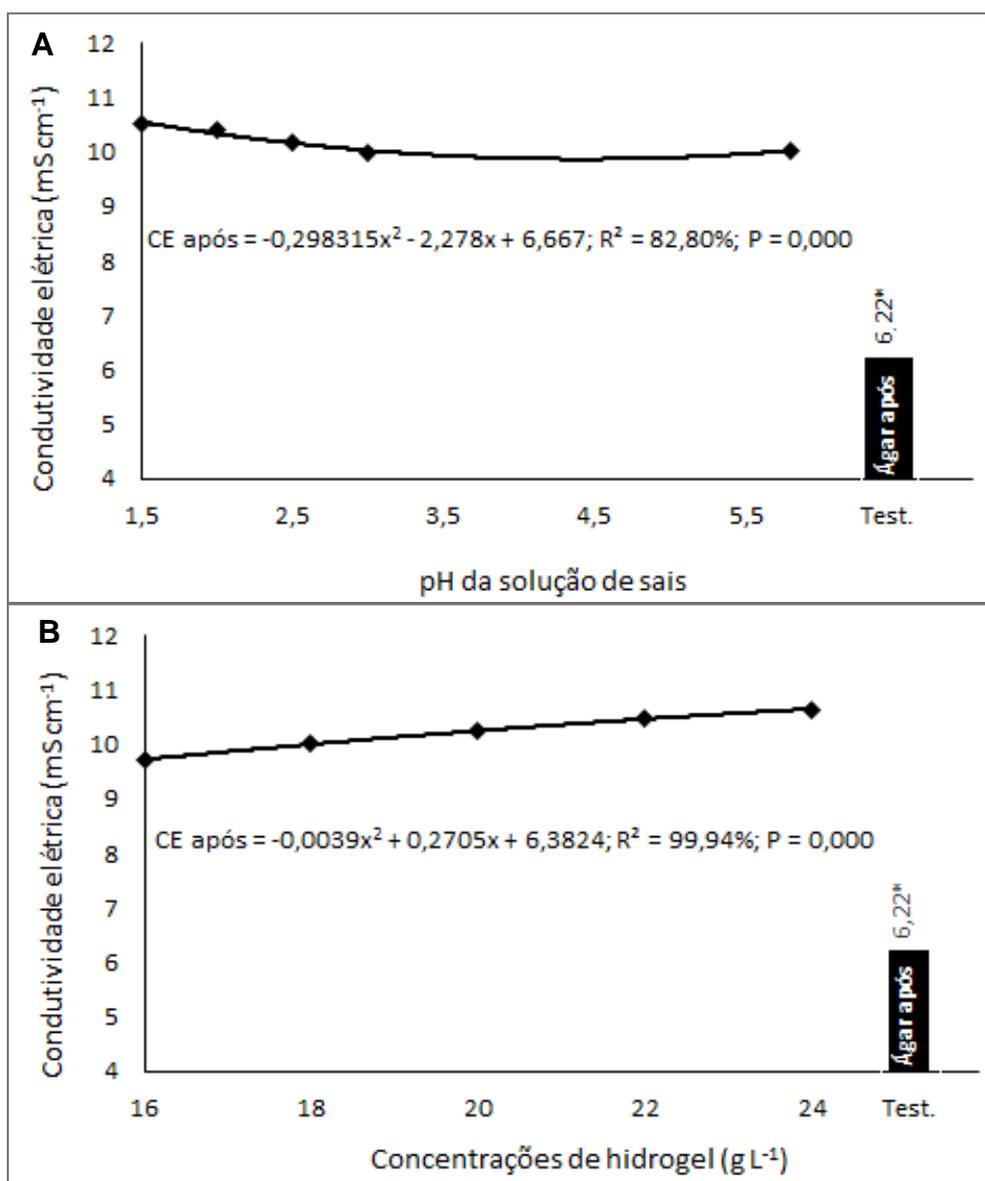


Figura 7 – CE dos meios de cultura após a autoclavagem em função do pH da solução de sais (A) e concentrações de hidrogel (B), pelo teste F ($p < 0,01$). * diferença significativa a nível de 1% de probabilidade entre a testemunha e meios contendo hidrogel.

A acidificação da solução de sais causou efeito sobre o pH dos meios antes da autoclavagem, uma vez que meios preparados com sais ajustados para 5,8 apresentam pH final de 6,4 (Figura 4). Porém, após a autoclavagem, o hidrogel demonstrou um potencial de tamponamento fazendo com que os meios retomassem o pH a uma faixa neutra a alcalina. Sendo assim, não foi possível obter meios com pH na faixa desejável (5,5) quando submetidos a autoclavagem. Dessa forma, mais uma vez foi possível observar o tamponamento do hidrogel em

resposta a autoclavagem. O pH da solução de sais ajustado para 1,5 proporcionou meio de cultura com pH inferior comparado aos demais pHs da solução de sais. Isso indica, de forma preliminar, o potencial do uso desse pH na solução de sais para reduzir o pH final do meio de cultura.

Os meios autoclavados por 20 minutos apresentaram coloração amarelada com bordas amarronzadas, sugerindo que tenha ocorrido queimadura/caramelização dos meios. Por esse motivo, o tempo de autoclavagem foi reduzido para 15 minutos, na expectativa de evitar tal fenômeno.

Considerando o efeito do pH sobre a disponibilidade de nutrientes é possível que nas concentrações solubilizadas com solução ajustada para 1,5, o pH final dos meios (6,9) tenha favorecido a disponibilidade de nutrientes solúveis como o potássio, cálcio, magnésio e nitrogênio, e com isso, resultado em aumento da CE (Figura 8). O contrário foi observado nos demais meios, que apresentaram pH final entre 7,9 e 8,2 (Figura 8).

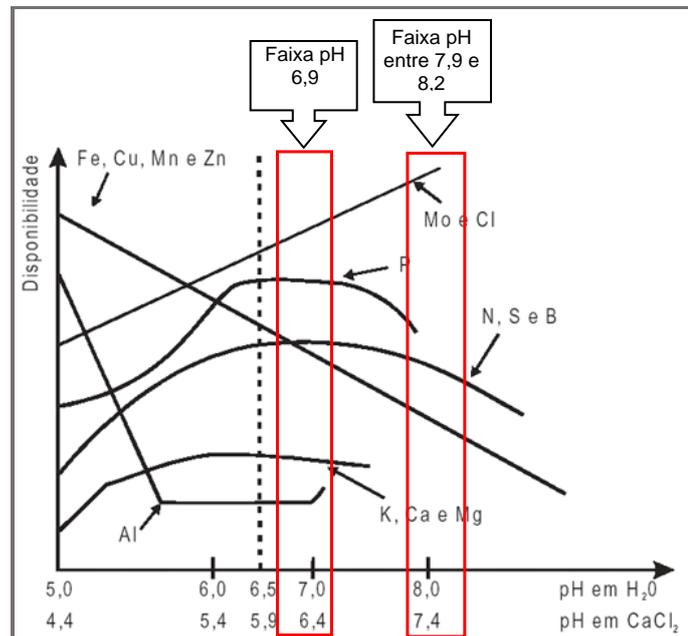


Figura 8 – Efeito do pH na disponibilidade de nutrientes em função do pH. (Malavolta, 1979).

Diante dos resultados é possível afirmar que o hidrogel hidratado não é uma substância estável sob condições de autoclavagem. Algumas de suas propriedades podem apresentar alterações devido à autoclavagem, como o pH.

Esse fato pode ser explicado com base na composição química do monômero acrilamida. A acrilamida, molécula base da cadeia de poliacrilamida, é obtida por meio da hidratação da molécula de acrilonitrila, a partir da quebra de ligações *pi* existentes entre carbono e nitrogênio de sua cadeia (Ferreira, 2016). A poliacrilamida é a união de diversas moléculas de acrilamida após ter a ligação *pi* quebrada entre os carbonos dois e três de sua cadeia (Choi et al., 2015). Dessa forma, as redes de poliacrilamida podem ser consideradas flexíveis, ou seja, facilmente modificadas por processos como a hidrólise.

Associada à hidrólise, a alta temperatura proporcionada pela autoclavagem pode ter influenciado as modificações observadas nos meios de cultura. Pesquisas mostraram que a acrilamida pode ser obtida naturalmente em alimentos ricos em monossacarídeos (glicose e frutose) quando submetidos a temperaturas acima de 120° C (Rosén e Hellenäs, 2002; EFSA, 2015; Wenzl et al., 2007; Capuano e Fogliano, 2011).

O meio MS é rico em dissacarídeo, a sacarose, e com o processo de autoclavagem a sacarose é quebrada em monossacarídeos, que por consequência, pode ter sido transformada em acrilamida, uma molécula sensível a hidrólise e a altas temperaturas. Sendo assim, é possível que a autoclavagem do hidrogel hidratado tenha causado modificações na estrutura química das moléculas.

Portanto, a adição do hidrogel ao meio de cultura antes da esterilização por autoclavagem não é indicada, sendo necessária a investigação de outros métodos ou protocolos de esterilização de meios contendo hidrogel.

Experimento III – Meios de cultura com diferentes concentrações de hidrogel solubilizado em solução de sais de MS com diferentes valores de pH submetidos à esterilização química

Para o hidrogel, não houve interação entre os fatores sobre o pH final do meio de cultura e CE. No entanto, houve diferença significativa das concentrações

sobre o pH do meio e CE, em que se observou pouca variação do pH do meio e uma tendência de aumento da CE em função do aumento das concentrações de hidrogel. Para o ágar, o pH e a CE se mantiveram constantes com média de 5,28 e 6,94 mS.cm⁻¹, respectivamente (Figuras 9).

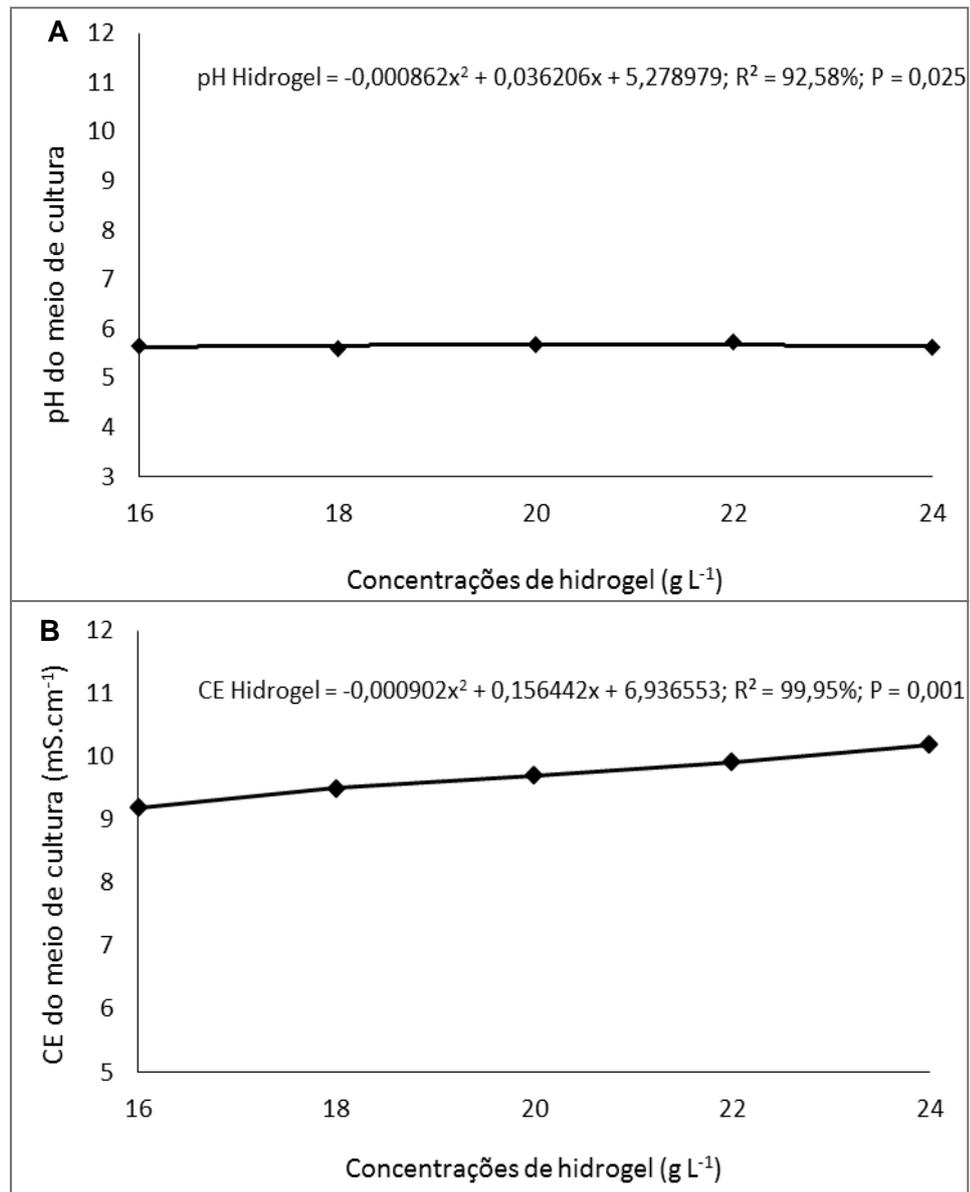


Figura 9 - Resposta de pH (A) e CE (B) dos meios de cultura submetidos à esterilização química em função das concentrações de hidrogel, pelo teste F ($p < 0,05$).

Houve diferença significativa do pH da solução de sais sobre o pH e CE dos meios de cultura, em que o meio contendo ágar e pH da solução ajustado para 5,8 apresentou o pH mais ácido, seguido do meio contendo hidrogel e pH da solução ajustado para 1,5. A maior CE foi verificada no meio com pH da solução ajustado para 1,5 e a menor, no meio contendo ágar (Tabela 5).

Tabela 5 - pH e CE dos meios de cultura esterilizados quimicamente em função da acidificação da solução de sais de MS

Tratamentos	pH Meio de Cultura	CE Meio de Cultura
pH Solução Sais 5,8 (Ágar)	5,28 c	6,94 c
pH Solução Sais 1,5 (Hidrogel)	5,44 b	9,80 a
pH Solução Sais 2,0 (Hidrogel)	5,86 a	9,60 b
CV (%)	1,69	0,63

Médias seguidas de mesma letra na coluna não se diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p < 0,01$).

Os meios esterilizados quimicamente responderam a acidificação. Conforme aconteceu no experimento anterior (Experimento II) nos meios não autoclavados, o pH da solução de sais ajustado para 2,0 manteve o pH final do meio próximo de 6,0, enquanto que os meios com pH da solução ajustado para 1,5 apresentaram pH próximo de 5,5. O meio contendo ágar esterilizado quimicamente apresentou pH de 5,28 e quando esterilizado por autoclavagem, apresentou pH de 5,4. Isso indica que a esterilização química não interfere no pH final do meio de cultura, podendo, assim, ser utilizado para esterilizar meios com hidrogel.

Com esses resultados pode-se afirmar que a esterilização química foi eficiente em manter o pH do meio próximo de 5,5 em todas as concentrações analisadas quando o pH da solução de sais é ajustado para 1,5. No entanto, as concentrações que mantiveram os meios sem alterações de coloração e viscosidade (dados não publicados) foram as concentrações de 22 e 24 g L⁻¹. Por esse motivo, definiu-se que essas concentrações são as mais adequadas para os meios de cultura e, assim, passou-se a utilizar nos próximos experimentos apenas essas concentrações.

A eficiência da esterilização química pode ser explicada em função do hidrogel não ter sido hidratado e em seguida submetido a altas temperaturas. Dessa forma, infere-se que a hidrólise só é prejudicial às propriedades do hidrogel quando associada a altas temperaturas. Contudo, deve-se investigar o efeito da temperatura sobre o hidrogel quando este ainda não tenha sido hidratado.

Quanto à condutividade elétrica, houve efeito das concentrações sobre a CE nos dois valores de pH avaliados, em que à medida que se aumentou a concentração de hidrogel, aumentou-se a CE dos meios.

Foi possível observar que os meios mais ácidos apresentaram maiores valores de CE. Isso mostra que, assim como na esterilização física, na esterilização química a acidificação da solução de sais proporciona maior presença de íons livres no meio, indicando maior disponibilidade de nutrientes.

Comparativamente, os valores de CE na esterilização química foram menores em todas as concentrações e valores de pH analisados quando comparados com as mesmas concentrações e valores de pH dos meios esterilizados por autoclavagem (Figura 7A e 7B). Desse modo, mais uma vez, reafirma-se que o hidrogel não é uma substância estável sob condição de autoclavagem.

Com relação à eficiência da esterilização química no controle microbiano, não foi verificado crescimento microbiano nos meios de cultura durante as 24 horas antes dos frascos serem abertos em ambiente não estéril para análise de pH e CE.

A esterilização química não alterou as características dos meios contendo hidrogel quando o pH da solução de sais foi ajustado para 2,0 e 1,5. Considerando os benefícios da esterilização química, pensou-se em reduzir o pH da solução para 1,0, a fim de tentar obter meios com pH mais baixos (próximos de 5,0). Ainda, com o intuito de otimizar o protocolo de preparo de meios contendo hidrogel, resolveu-se testar a esterilização física do hidrogel em grânulos. Para isso, seguiu-se com o experimento IV.

Experimento IV – Esterilização física do hidrogel e recipiente, e esterilização química do meio de cultura

Houve efeito dos fatores isolados pH da solução de sais de MS e concentrações de hidrogel sobre o pH final dos meios de cultura. Foi possível observar que quanto menor o pH da solução de sais, menor é o pH final do meio de cultura. Apenas a solução de sais com pH ajustado para 1,5 proporcionou ao meio pH próximo ao desejado (próximo de 5,5). A concentração de 24 g L⁻¹ proporcionou ao meio o pH próximo de 5,5, assim como, a solução de sais com pH ajustado para 1,5 (Tabela 6).

Tabela 6 - pH dos meios de cultura contendo hidrogel em função da esterilização física do hidrogel e esterilização química da solução de sais acidificada

pH Solução de Sais MS	pH Meio de Cultura
1,0	3,42c
1,5	5,67b
2,0	6,31a
CV (%)	4,77
Concentração de Hidrogel (g L ⁻¹)	pH Meio de Cultura
22	4,99b
24	5,27a
CV (%)	4,77

Médias seguidas de mesma letra na coluna não se diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Os resultados observados nesse experimento fornecem indicativos da concentração e pH na solução de sais a serem utilizados no protocolo de preparo de meio contendo hidrogel. Além disso, esses resultados mostram que a esterilização do hidrogel por meio da autoclavagem é possível, desde que o hidrogel não seja hidratado antes da autoclavagem.

A autoclavagem do hidrogel em pó revelou um ligeiro aumento no pH final com relação aos meios nessas mesmas concentrações e pHs no experimento de esterilização química (Tabela 5). Mas, os valores finais de pH dos meios deste experimento são inferiores aos dos meios autoclavados de forma convencional (Figura 6A e 6B).

Os meios ajustados para 2,0 apresentaram pH final de 6,3. Já os meios ajustados para 1,5, o pH final foi de 5,6, o mais próximo do desejável. Os meios

com pH ajustado para 1,0, apresentaram pH final de 3,4, mais ácido do que o desejável (Tabela 6).

Nos meios de cultura com pH ajustado para 1,0 observou-se a ocorrência da estratificação de fases, sendo uma fase amorfa na parte inferior do tubo de ensaio e uma fase líquida na parte superior. Esse fato pode ser explicado pela influência do pH sobre o intumescimento do hidrogel. O processo de intumescimento é governado por fatores físicos e externos. Entre outros fatores, a mudança de pH é apontada por Brito et al. (2013) como um dos fatores externos que interferem no processo de absorção do gel. Sendo assim, solventes muito ácidos reduzem a capacidade de geleificar e por esse motivo, o pH de 1,0 foi prejudicial para a geleificação do hidrogel.

Experimento V – Esterilização física do hidrogel e tubo de ensaio, e esterilização física do meio de cultura em recipientes separados

Houve interação entre os fatores concentração de hidrogel e pH da solução de sais sobre o pH final do meio de cultura. Os meios com pH ajustado para 1,0 apresentaram estratificação de fase conforme no experimento IV, além de coloração amarelada. Os meios com pH ajustado para 1,5 apresentaram pH de 5,84 na concentração de 22 g L⁻¹ e 5,59 na concentração de 24 g L⁻¹. Os meios com pH ajustado para 2,0 apresentaram pH elevado nas concentrações analisadas (Tabela 7).

Tabela 7 – Resposta de pH dos meios contendo hidrogel à esterilização física do hidrogel e da solução de sais separadamente

Concentração Hidrogel (g L ⁻¹)	pH Meio de Cultura		
	pH Solução Sais MS		
	1,0	1,5	2,0
22	4,71 bB	5,84 aA	5,88 aA
24	5,42 aB	5,58 aB	6,21 aA
CV (%)	5,06		

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não se diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (p<0,01).

Os meios com o pH da solução de sais ajustado para 1,0, assim como no experimento IV, não apresentaram geleificação completa, tendo o meio uma fase líquida e outra amorfa. O meio com o pH da solução de sais ajustado para 2,0 apresentou pH final elevado. O meio com 24 g L⁻¹ de hidrogel e pH de sais ajustado para 1,5 apresentou o pH final mais próximo do desejável, 5,5, além disso, a concentração de 24 g L⁻¹ proporcionou meios mais consistentes do que a concentração de 22 g L⁻¹.

Os resultados mostraram que a utilização dos meios contendo hidrogel cujo pH da solução de sais foi ajustado para 1,0 é inviável para o cultivo *in vitro* de plantas nas condições deste trabalho, uma vez que não formaram meios consistentes. Isso se deve ao baixo pH que reduz a capacidade de intumescimento do gel (Brito et al., 2013).

O hidrogel ao ser hidratado sofre hidrólise, quebra das ligações entre os carbonos da cadeia, causando modificações em sua estrutura química. Essa nova molécula formada após a hidrólise da molécula de acrilamida associada ao excesso de temperatura é a causa das modificações de pH, coloração e consistência dos meios contendo hidrogel. Já na autoclavagem do hidrogel ainda em pó, ou seja, não hidratado, a hidrólise não ocorre e, conseqüentemente, não há mudanças na estrutura química da acrilamida.

A autoclavagem do hidrogel não hidratado separadamente da solução de sais mostrou-se uma alternativa viável para meios contendo hidrogel, de modo a manter o pH na faixa desejável, com alterações na coloração e consistência aceitáveis. Sendo assim, pode-se definir como protocolo de preparo de meio de cultura contendo hidrogel, a autoclavagem de hidrogel em pó e solução de sais separadamente, com duração de apenas 15 minutos; pH da solução de sais de MS ajustado para 1,5; e concentração de hidrogel de 24 g L⁻¹.

CONCLUSÕES

- A análise de nutrientes totais mostrou que o hidrogel possui menores teores para a maioria dos macros e micronutrientes, exceto para o nitrogênio, potássio e enxofre, em comparação com o ágar;
- Os teores de potássio e sódio solúveis são mais elevados no hidrogel do que no ágar;
- Os teores de sais solúveis no hidrogel influenciaram a composição salina dos meios;
- O pH dos agentes geleificantes dissolvidos em água desionizada não é influenciado pelas concentrações;
- A CE no hidrogel tende a aumentar com o aumento da concentração, e é superior ao ágar;
- O pH da solução de sais ajustado para 1,0 reduz a capacidade de geleificação do hidrogel e modifica a consistência do meio de cultura;
- Géis de hidrogel com concentrações acima de 15 g L⁻¹ apresentam maiores retenções de água quando comparados com os géis de hidrogel menos concentrados e com os géis de ágar nas diferentes concentrações;
- Foi possível determinar a concentração de 24 g L⁻¹ de hidrogel para solidificar o meio;
- O pH da solução de sais do meio MS foi determinado em 1,5 para que após a autoclavagem, o meio com hidrogel apresentasse pH igual a 5,5;
- A autoclavagem do hidrogel deve ser feita separadamente da solução de sais do meio MS, a 121° C, 1,0 atm por 15 minutos. O hidrogel não deve ser hidratado antes da autoclavagem.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bardajee, G.R.; Hooshyar, Z. (2014). One-pot synthesis of biocompatible superparamagnetic iron oxide nanoparticles/ hydrogel based on salep: Characterization and drug delivery. *Carbohydrate Polymers*, 101:741–751.
- Bolado-Rodríguez, S., García-Sinovas, D. e Álvarez-Benedí, J. (2010). Application of pig slurry to soils. Effect of air stripping treatment on nitrogen and TOC leaching. *Journal of environmental management*, 91 (12):2594-2598.
- Capuano, E., Fogliano, V. (2011). Acrylamide and 5-hydroxymethylfurfural (HMF): A review on metabolism, toxicity, occurrence in food and mitigation strategies. *LWT-Food Science and Technology*, 44 (4):793-810.
- Chang, C., Zhang, L. (2011). Cellulose-based hydrogels: Present status and application prospects. *Carbohydrate Polymers*, 84 (1):40-53.
- Choi, J.M., Han, S.S., Kim, H.S. (2015). Industrial applications of enzyme biocatalysis: current status and future aspects. *Biotechnology advances*, 33 (7):1443-1454.
- Debrassi, A., Bürger, C., Rodrigues, C.A., Nedelko, N., S'lawska-Waniewska, A., Dłuzewski, P., Sobczak, K., Grenech, J-M. (2011). Synthesis, characterization and *in vitro* drug release of magnetic N-benzyl-O-carboxymethylchitosan nanoparticles loaded with indomethacin. *Acta Biomaterialia*, 7:3078–3085.
- EFSA – European Food Safety Authority (2015). Scientific opinion on acrylamide in food, *EFSA Journal*, 13 (6): 4104 p.
- Fatichi, S., Leuzinger, S., Körner, C. (2014). Moving beyond photosynthesis: from carbon source to sink-driven vegetation modeling. *New Phytologist*, 201 (4): 1086-1095.

- Ferreira, I.M. (2016). Imobilização do fungo *Penicillium citrinum* CBMAI 1186 e lipase de *Pseudomonas fluorescens* em biopolímeros para aplicações em biocatálise. Tese (Doutorado em Ciências) – São Carlos – SP, Universidade de São Paulo – USP, 369p.
- Flores, R., Uliana, S.C., Pimentel, N., Garlet, T.M.B. (2013). Sacarose e sorbitol na conservação *in vitro* de *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken (Amaranthaceae). *Journal of Biotechnology and Biodiversity*, 4 (3):192-199.
- Gui, R., Wan, A., Jin, H., Li, H., Zhou, C. (2013). Amphiphilic polymer-template synthesis and pH-triggered phase transfer of luminescent silver nanocrystals. *Materials Letters*, 96:20-23.
- Khan, F., Tare, R.S., Oreffo, R., Bradley, M. (2009). Versatile biocompatible polymer hydrogels: scaffolds for cell growth. *Angewandte Chemie International Edition*, 48 (5):978-982.
- Matalanis, A., McClements, D.J. (2013). Hydrogel microspheres for encapsulation of lipophilic components: Optimization of fabrication and performance. *Food Hydrocolloids*, 31:15-25.
- Navroski, M.C., Araújo, M.M., Cunha, F.S., Berghetti, Á.L.P., Pereira, M.O. (2016). Redução da adubação e melhoria das características do substrato com o uso do hidrogel na produção de mudas de *Eucalyptus dunnii* Maiden. *Ciência Florestal*, 26 (4):1155-1165.
- Oliveira, R.S., Eller, C.B., Bittencourt, P.R.L., Mulligan, M. (2014). The hydroclimatic and ecophysiological basis of cloud forest distributions under current and projected climates. *Annals of Botany*, 113 (6):909–920.
- Rosén, J., Hellenäs, K. E. (2002). Analysis of acrylamide in cooked foods by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Analyst*, 127 (7):880-882.

- Santos, R., Barros, A.A.G., Graça, D.C.S., Cardoso, G. (2016). Obtenção e avaliação de nutriente de nitrogênio em plantio de quiabeiro (*Abelmoschus esculentus* L Maench). *Revista Técnico-Científica do CREA-PR*, 1-9.
- Tavakol, M., Vasheghani-Farahani, E., Mohammadifar, M.A., Soleimani, M., Hashemi-Najafabadi, S. (2016). Synthesis and characterization of an *in situ* forming hydrogel using tyramine conjugated high methoxyl gum tragacanth. *Journal of biomaterials applications*, 30 (7):1016-1025.
- Teixeira, S.L., Ribeiro, J.M., Teixeira, M.T. (2006). Influence of NaClO on nutrient medium sterilization and on pineapple (*Ananas comosus* cv Smooth cayenne) behavior. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 86 (3):375-378.
- Ullah, F., Othman, M.B.H., Javed, F., Ahmad, Z., Akil, H.M.D. (2015). Classification, processing and application of hydrogels: A review. *Materials Science and Engineering: C*, 57:414-433.
- Verma, P., Rastogi, R.K., Ramakumar, K.L. (2007). Determination of trace amounts of nitrogen in uranium based samples by ion chromatography (IC) without Kjeldahl distillation. *Analytica chimica acta*, 596 (2):281-284.
- Yu, S., Wu, G., Gu, X., Wang, J., Wang, Y., Gao, H., Ma, J. (2013). Magnetic and pH-sensitive nanoparticles for antitumor drug delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 103:15-22.
- Wenzl, T., Lachenmeier, D.W., Gökmen, V. (2007). Analysis of heat-induced contaminants (acrylamide, chloropropanols and furan) in carbohydrate-rich food. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 389 (1), 119-137.

4.2 HIDROGEL HYDROPLAN-EB® COMO AGENTE GELEIFICANTE DE MEIO DE CULTURA NO CULTIVO *in vitro* DE ESPÉCIES VEGETAIS

RESUMO

Biofábricas e muitos laboratórios de biotecnologia utilizam o cultivo *in vitro* para diferentes aplicações em diferentes áreas. Esse fato reforça a importância dos estudos sobre a qualidade dos meios de cultura e a possibilidade de reduzir os investimentos com relação ao preparo desses meios. O hidrogel é um polímero hidroretentor, que dentre outras propriedades, é capaz de formar géis. Portanto, a utilização do hidrogel pode ser uma alternativa viável para o cultivo *in vitro* de espécies vegetais. Diante do exposto, objetivou-se com a realização deste trabalho avaliar a eficiência do hidrogel como alternativa ao uso de ágar no cultivo *in vitro* de pimentão, batata-doce e *Arabidopsis thaliana*. O pimentão, a batata-doce e *A. thaliana* foram cultivados em três meios de cultura que constituíram os três tratamentos (T1 - meio com os sais de MS solidificados com 8 g L⁻¹ de ágar e pH ajustado para 5,8; T2 - meio com os sais de MS solidificados com 24 g L⁻¹ de hidrogel e pH ajustado para 5,8; T3 - meio com os sais de MS solidificados com 24 g L⁻¹ de hidrogel e pH ajustado para 1,5). O estudo foi dividido em três experimentos. O experimento I referiu-se ao cultivo *in vitro* de pimentão, o experimento II, de batata-doce e o experimento III, de *A. thaliana*. Ao final da fase *in vitro* foram avaliados os aspectos biométricos e fisiológicos nos experimentos

com pimentão e batata-doce, e com *A. thaliana*, apenas aspectos biométricos. Ao final da fase de aclimatização foram avaliados os aspectos biométricos do pimentão e da batata-doce. Na fase *in vitro*, o hidrogel não proporcionou condições superiores ao ágar para o crescimento vegetativo e qualidade fisiológica de plantas de pimentão. Comparando os meios contendo hidrogel, o meio com pH 1,5 proporcionou melhores resultados do que com pH 5,8. Na aclimatização do pimentão, a sobrevivência foi a mesma entre as plantas cultivadas com ágar e com hidrogel-pH 1,5. As melhores respostas de crescimento do pimentão na aclimatização foram obtidas nas plantas cultivadas com hidrogel-pH 1,5. No cultivo *in vitro* de batata-doce, os meios contendo ágar proporcionaram maior sobrevivência do que os meios contendo hidrogel. O ágar proporcionou condições superiores ao hidrogel para o crescimento vegetativo e qualidade fisiológica de plantas de batata-doce. De forma geral, o hidrogel com pH 5,8 proporcionou melhores resultados quando comparado com o hidrogel com pH 1,5 no cultivo *in vitro* de batata-doce. Na aclimatização da batata-doce, apenas uma planta cultivada em meio contendo hidrogel-pH 5,8 sobreviveu. Nenhuma planta cultivada em hidrogel-pH 1,5 sobreviveu à fase de aclimatização. No cultivo *in vitro* de *A. thaliana*, o meio contendo ágar proporcionou a maior sobrevivência. O hidrogel proporcionou médias iguais ao ágar para número de folha e diâmetro de roseta. O hidrogel com pH 5,8 proporcionou melhores resultados quando comparado com o hidrogel com pH 1,5 no cultivo de *A. thaliana*. A substituição do ágar pelo hidrogel em meios de cultura é dependente da espécie, do tipo de explante e das condições de cultivo.

ABSTRACT

Biofactories and many biotechnology laboratories use *in vitro* culture for different applications in different areas. This fact reinforces the importance of studies on the quality of culture media and the possibility of reducing investments in the preparation of these media. The hydrogel is a water absorbing polymer,

which, among other properties, is capable of forming gels. Therefore, the use of the hydrogel may be a viable alternative for the *in vitro* cultivation of plant species. In view of the above, the objective of this work was to evaluate the hydrogel efficiency as an alternative to the use of agar in the *in vitro* cultivation of sweet pepper, sweet potato and *Arabidopsis thaliana*. Sweet potato and *A. thaliana* were cultivated in three culture media constituting the three treatments (T1 - medium with MS salts solidified with 8 g L⁻¹ of agar and pH adjusted to 5.8; T2 - medium with the MS salts solidified with 24 g L⁻¹ hydrogel and pH adjusted to 5.8; T3 - medium with the MS salts solidified with 24 g L⁻¹ hydrogel and pH adjusted to 1.5). The study was divided into three experiments. The experiment I referred to the *in vitro* culture of sweet pepper, experiment II of sweet potato and the experiment III, of *A. thaliana*. At the end of the *in vitro* phase the biometric and physiological aspects were evaluated in the experiments with sweet pepper and sweet potato, and with *A. thaliana*, only biometric aspects. At the end of the acclimatization phase, the biometric aspects of sweet pepper and sweet potato were evaluated. In the *in vitro* phase, the hydrogel did not provide superior conditions to the agar for vegetative growth and physiological quality of pepper plants. Comparing the media containing hydrogel, the medium at pH 1.5 provided better results than at pH 5.8. In chili acclimatization, survival was the same between plants cultivated with agar and hydrogel pH 1.5. The best growth responses of chili in acclimatization were obtained in plants cultivated with pH 1.5 hydrogel. In *in vitro* sweet potato cultivation, agar mediums provided higher survival than the hydrogel containing media. The agar provided conditions superior to the hydrogel for the vegetative growth and physiological quality of sweet potato plants. In general, the hydrogel at pH 5.8 provided better results when compared to the hydrogel at pH 1.5 in the *in vitro* culture of sweet potatoes. In acclimatization of sweet potato, only one plant grown in medium containing pH 5.8 hydrogel survived. No plant grown in hydrogel-pH 1.5 survived the acclimatization phase. In the *in vitro* culture of *A. thaliana*, the medium containing agar provided the greatest survival. The hydrogel provided averages equal to the agar for leaf number and rosette diameter. The hydrogel at pH 5.8 provided better results when compared to the pH 1.5 hydrogel in *A. thaliana* culture. The replacement of the hydrogel agar in culture media is dependent on the species, the explant type and the culture conditions.

INTRODUÇÃO

A expansão da produção comercial de mudas por meio da propagação *in vitro* é prejudicada principalmente pelo elevado custo das plantas regeneradas. Esse fato é explicado pela exigência de mão de obra altamente especializada, reagentes e equipamentos de custo elevado, alto gasto de energia e necessidade de estrutura específica para a realização dos procedimentos. Depois da mão de obra, os reagentes que compõem os meios de cultura, especialmente o ágar, contribuem significativamente para o aumento do custo de mudas produzidas *in vitro* (Ezekiel, 2010; Pereira et al., 2013). Desse modo, as biofábricas mostram a tendência de buscar sistemas que utilizem outros agentes geleificantes, cujo objetivo, é reduzir custos e otimizar os protocolos de preparo dos meios de cultura (Faria et al., 2006).

Na mesma lógica, a busca por esses meios de cultura também atrai a atenção dos laboratórios de biotecnologia que utilizam o cultivo *in vitro* para diferentes aplicações, como testar a eficiência de óleos essenciais, cultivar células animais e vegetais, estudar a biologia de microrganismos, auxiliar o melhoramento de plantas com práticas de conservação *in vitro* de germoplasma e cultivo e resgates de embriões, dentre várias outras.

Nesse contexto, pesquisas têm sido feitas com o intuito de investigar novos compostos que possuam propriedades vantajosas e, ou, menor custo de obtenção para a substituição parcial ou total do ágar como amido, alginato, carragenana, isubgol, xantana e hidrogel (Babbar e Jain, 1998; Naik e Sarkar, 2001; Babbar e Jain, 2006; Lucyszyn et al., 2005; Norziah et al., 2006; Lucyszyn et al., 2007; Cigdem et al., 2008; Li et al., 2008; Chan et al., 2009; Pereira-Netto et al., 2012; Pereira et al., 2013; Vidigal et al., 2014; Moraes, 2015; Oliveira et al., 2015; Pereira et al., 2015; Rhein-Knudsen et al., 2015).

Moraes (2015) testou o hidrogel como agente geleificante alternativo para substituição total do ágar na micropropagação de abacaxizeiro 'Gold'. Esse autor utilizou três granulometrias (fina HyC, média HyB e grossa HyA) e três concentrações (20,0; 22,5 e 25,0 g L⁻¹) de hidrogel e verificou que o meio

composto por 22,5 g L⁻¹ de hidrogel fino pode ser utilizado na micropropagação do abacaxizeiro 'Gold' sem prejuízo às mudas formadas ao final da aclimatização.

A utilização do hidrogel como agente geleificante pode resultar em melhoria no crescimento das plantas cultivadas *in vitro* devido às suas propriedades de liberação controlada de água e sais minerais, fornecendo-os às plantas conforme suas exigências (Saravanan et al., 2007; Aouada e Mattoso, 2009; Vidigal et al., 2014).

Sua utilização pode, ainda, ser vantajosa por se tratar de um componente de fácil obtenção e baixo custo, uma vez que o investimento em um quilograma de hidrogel (Hydroplan[®]) é 98,37% inferior ao investimento em um quilograma de ágar bacteriológico (A5306, Sigma Aldrich[®]) (Cotação de hidrogel realizada na Hydroplan[®] e de ágar no website da Sigma Aldrich[®] - jan/2018).

Considerando apenas o investimento nos agentes geleificantes, excluindo-se o investimento com relação aos demais insumos e mão de obra, para preparar um litro de meio de cultura contendo 6 g L⁻¹ de ágar o investimento é de R\$ 22,06 e do meio contendo 24 g L⁻¹ de hidrogel, de R\$ 1,44. A redução do custo ao utilizar o hidrogel é possível não somente pelo menor valor de aquisição, mas também pelas modificações necessárias no protocolo para adequar seu uso, como a não utilização de micro-ondas para fundir o agente geleificante.

Um protocolo de utilização do hidrogel como agente geleificante de meio de cultura foi criado, de maneira que o meio com hidrogel preservasse características semelhantes ao meio contendo ágar. Para verificar os efeitos do meio de cultura contendo hidrogel torna-se necessário o emprego de plantas cujas respostas de regeneração *in vitro* sejam conhecidas e o protocolo de cultivo *in vitro* esteja bem definido, como tipo de explante, meio de cultura, fitorregulador e condição de incubação. Neste estudo, utilizaram-se três espécies: *Capsicum annum var annum* L. (pimentão), *Ipomoea batatas* L. (batata-doce) e *Arabidopsis thaliana*.

O pimentão é uma espécie muito estudada no programa de Genética e Melhoramento de Plantas da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF). A espécie apresenta ciclo curto e protocolo de crescimento *in vitro* bem definido. Por esses motivos, essa espécie foi empregada no estudo.

A batata-doce é uma planta que já está estabelecida *in vitro* e disponível na coleção de germoplasma *in vitro* da UENF. Devido à facilidade de

multiplicação e alta capacidade de regeneração *in vitro*, esta espécie foi empregada para testar a eficiência do meio de cultura solidificado com hidrogel.

A *A. thaliana* foi empregada por apresentar ciclo de vida curto, permitindo a rápida verificação da resposta aos tratamentos. Várias pesquisas empregando a espécie são realizadas no Centro de Biociências e Biotecnologia da UENF, o que garante maior facilidade em obter o material vegetal.

Apesar de o hidrogel apresentar características que podem favorecer o desenvolvimento vegetal *in vitro*, são incipientes os estudos a respeito do seu uso para a cultura de tecidos vegetais. Assim sendo, objetivou-se com a realização deste trabalho avaliar a eficiência do hidrogel como alternativa ao uso de ágar no cultivo *in vitro* de pimentão, batata-doce e *A. thaliana*.

MATERIAL E MÉTODOS

Experimento I: Hidrogel como agente geleificante de meio de cultura no cultivo *in vitro* de pimentão

Material Vegetal

Foram utilizadas sementes comerciais de *C. annuum* var *annuum* L. pimentão 'Casca Dura Ikeda', provenientes da Feltrin®, Lote 0009501310000340, com 90% de germinação e 99,9% de pureza, conforme as especificações do fabricante.

Fase I – Germinação *in vitro* de sementes de pimentão 'Casca Dura Ikeda'

Em câmara de fluxo laminar, sementes maduras de *C. annuum* var *annuum* L., pimentão 'Casca Dura Ikeda', foram desinfestadas por um minuto em

álcool 70% (v/v), posteriormente, imersas em 100 mL de solução de hipoclorito de sódio (NaClO) a 0,7% com adição de duas gotas de Tween 20 por 15 minutos. Após esse procedimento, as sementes foram lavadas por três vezes em água desionizada e autoclavada durante 5, 10 e 10 minutos, respectivamente.

As sementes desinfestadas foram colocadas para germinar em placas de Petri (ø80mm), 30 sementes por placa, contendo 25 mL de meio de cultura composto por metade da concentração dos sais minerais do meio MS, vitaminas de White (Murashige e Skoog, 1962), 100 mg L⁻¹ de myo-inositol, 5 g L⁻¹ de sacarose, solidificado com 7 g L⁻¹ de ágar (Vetec®), pH ajustado para 5,8 e autoclavado por 15 minutos a 121° C e 1,0 atm de pressão.

As sementes inoculadas foram levadas para sala de crescimento à temperatura média de 27±2° C e mantidas durante sete dias em ambiente com ausência de luz para iniciarem a germinação. Posteriormente, foram transferidas para luz, com fotoperíodo de 16:8 horas luz:escuro e irradiância de 50 µmol m⁻² s⁻¹ fornecida por lâmpadas fluorescentes luz do dia (OSRAM®).

Fase II – Crescimento *in vitro* de plântulas de pimentão ‘Casca Dura Ikeda’

As plântulas oriundas da fase I (Germinação *in vitro*) foram transferidas para os meios de crescimento, que representaram os tratamentos (Tabela 1). O experimento foi instalado em DIC, com três tratamentos e 48 repetições. Cada repetição foi composta por uma planta cultivada em frasco. Ao final da fase *in vitro* 12 plantas foram avaliadas.

Tabela 1 – Descrição dos meios de cultura com relação ao tipo e concentração do agente geleificante e valores de pH da solução de sais de MS nos cultivos *in vitro* de pimentão, batata-doce e *A. thaliana*

Tratamento	Sais Minerais	Agente Geleificante	Concentração (g L ⁻¹)	pH
T1	MS (1962)	Ágar Bacteriológico Vetec®	8	5,8
T2	MS (1962)	Hidrogel Hydroplan-EB®	24	5,8
T3	MS (1962)	Hidrogel Hydroplan-EB®	24	1,5

Os meios contendo ágar foram preparados com os sais minerais de MS e vitaminas de White (Murashige e Skoog, 1962), 100 mg L⁻¹ de myo-inositol, 30 g L⁻¹ de sacarose, 8 g L⁻¹ de ágar e pH da solução de sais ajustado para 5,8 antes da adição do agente geleificante. Os meios foram distribuídos em frascos (65x125 mm) em alíquotas de 40 mL e submetidos à esterilização física em autoclave a 1,0 atm e 121° C, por 15 minutos.

Os meios solidificados com hidrogel foram preparados com a mesma composição do meio com ágar, diferindo, porém, na concentração de hidrogel e pH da solução, conforme o tratamento (Tabela 1). O pH da solução foi aferido em um recipiente separado, que em seguida, foi tampado e submetido à esterilização física em autoclave a 1,0 atm de pressão e 121° C, por 15 minutos. O hidrogel foi pesado em porções individuais equivalentes a cada frasco.

Os frascos contendo hidrogel foram vedados com tampas de polipropileno e submetidos à esterilização física em autoclave a 1,0 atm de pressão e 121° C, por 15 minutos. Após a autoclavagem, em câmara de fluxo laminar, os meios foram vertidos em alíquotas de 40 mL nos frascos e vedados com tampas ventiladas do tipo M2 (tampa rígida de polipropileno com vedação utilizando filtros de membranas microporosas, composta por duas camadas de fita microporosa Missner®, e entre elas, uma camada da fita veda rosca de PTFE (politetrafluoretileno) Amanco®) (Saldanha et al., 2012; Barbosa, 2016). Os frascos contendo meios com ágar também foram vedados com tampas ventiladas com membranas do tipo M2 após a autoclavagem.

Em câmara de fluxo laminar, plântulas de pimentão foram transferidas do meio de germinação para o meio de crescimento. Os frascos foram mantidos em sala de crescimento com temperatura de 27±2° C, fotoperíodo de 16:8 horas luz:escuro e irradiância de 50 µmol m⁻² s⁻¹ provida por lâmpadas fluorescentes luz do dia (OSRAM®).

Aos 23 dias de cultivo *in vitro* as plântulas foram avaliadas quanto a sobrevivência (%), número de folhas, altura de planta (cm), área foliar (cm²), volume (cm³) e comprimento radicular (cm), massa da matéria seca da parte aérea (mg), índice de verde (IV), eficiência fotoquímica máxima do PSII (Fv/Fm) e índice fotossintético (PI). Nos meios em que as plantas foram cultivadas avaliaram-se o pH e a CE, antes e após o cultivo.

Fase III – Aclimatização de plantas de pimentão ‘Casca Dura Ikeda’ provenientes do crescimento *in vitro*

Após 23 dias de cultivo *in vitro*, 12 plantas de cada tratamento foram destinadas à aclimatização em casa de vegetação. O experimento foi conduzido em DIC, com 12 repetições de uma planta, em que seis foram avaliadas.

As plantas foram aclimatizadas em bandejas plásticas de 30 células e capacidade de 300 mL. O substrato utilizado foi o Basaplant Hortaliças®. A irrigação foi por meio de microaspersão, duas vezes ao dia, às 7h00min e 18h00min, com duração de 10 minutos cada. Não foram realizadas adubações suplementares.

A casa de vegetação estava coberta com plástico agrícola transparente difusor, malha de 150 µm e tela de sombreamento de 35%, localizada na Unidade de Apoio à Pesquisa (UAP), do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias (CCTA) da UENF.

Ao final de 35 dias de aclimatização as plantas foram avaliadas quanto a sobrevivência (%), número de folhas, altura (cm), diâmetro de coleto (mm), volume (mL) e comprimento radicular (cm), massa da matéria fresca da parte aérea, sistema radicular e total (g), massa da matéria seca da parte aérea, sistema radicular e total (g).

Experimento II: Hidrogel como agente geleificante de meio de cultura no cultivo *in vitro* de batata-doce

Material Vegetal

O material vegetal foi obtido da coleção de germoplasma de batata-doce *in vitro* da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), onde é conservado em meio contendo sais de MS e vitaminas de White (Murashige e Skoog, 1962), 100 mg L⁻¹ de myo-inositol e 20 g L⁻¹ de sacarose. O

material vegetal é mantido em sala de crescimento com temperatura de $27\pm 2^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 16:8 horas luz:escuro e irradiância de $50\ \mu\text{mol m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$ fornecida por lâmpadas fluorescentes luz do dia (OSRAM®).

O acesso utilizado foi o UENF 1937, procedente do município de São João da Barra - RJ (Moulin et al., 2012). De acordo com Vettorazzi et al. (2017), dentre os acessos mantidos na coleção, esse apresenta maior potencial de regeneração quando cultivado *in vitro* em meio contendo os sais de MS e vitaminas de White (Murashige e Skoog, 1962), $100\ \text{mg L}^{-1}$ de myo-inositol e $30\ \text{g L}^{-1}$ de sacarose.

Fase I – Cultivo *in vitro* do acesso UENF 1937

A fase de cultivo *in vitro* foi conduzida em DBC com três tratamentos e três blocos. Cada repetição foi composta por cinco tubos de ensaio (25x150 mm), em que três foram avaliados. Cada tudo com 10 mL de meio foi inoculado com um segmento nodal com uma gema axilar. Os tratamentos foram os meios contendo sais de MS (Murashige e Skoog, 1962) com pH 5,8 e $8\ \text{g L}^{-1}$ de ágar (T1), sais de MS com pH 5,8 e $24\ \text{g L}^{-1}$ de hidrogel (T2) e sais de MS com pH 1,5 e $24\ \text{g L}^{-1}$ de hidrogel (Tabela 1).

Os meios contendo ágar foram preparados com os sais minerais de MS e vitaminas de White (Murashige e Skoog, 1962), $100\ \text{mg L}^{-1}$ de myo-inositol, $30\ \text{g L}^{-1}$ de sacarose, $8\ \text{g L}^{-1}$ de ágar e pH da solução de sais ajustado para 5,8 antes da adição do agente geleificante.

Os meios solidificados com hidrogel foram preparados com a mesma composição do meio com ágar, diferindo na concentração de hidrogel e pH da solução (Tabela 1). O pH da solução foi aferido em recipiente separado e o hidrogel foi pesado em porções individuais equivalentes a cada tubo de ensaio. Os meios foram esterilizados em autoclave a 1,0 atm de pressão e 121°C , por 15 minutos. Após a autoclavagem, em câmara de fluxo laminar, os meios foram vertidos em alíquotas de 10 mL por tubo.

Em câmara de fluxo laminar, plantas do acesso UENF 1937 foram excisadas em segmentos nodais contendo uma gema axilar. Posteriormente, cada segmento nodal foi incubado em um tubo de ensaio, que foram vedados

com filme PVC e mantidos em sala de crescimento com temperatura de $27\pm 2^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 16:8 horas luz:escuro e irradiância de $50\ \mu\text{mol m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$ fornecida por lâmpadas fluorescentes luz do dia (OSRAM®).

Ao final de 30 dias do cultivo *in vitro*, parte das plantas foi avaliada e parte aclimatizada. As avaliações foram com relação a sobrevivência (%), número de folhas, altura de planta (cm), área foliar (cm^2), volume (cm^3) e comprimento radicular (cm), massa da matéria seca da parte aérea (g), índice de verde (IV) e eficiência fotoquímica máxima do PSII (Fv/Fm). Nos meios em que as plantas foram cultivadas durante a fase de crescimento *in vitro* foram avaliados o pH e a CE antes e após o cultivo.

Fase II – Aclimatização de plantas de batata-doce provenientes do cultivo *in vitro*

Após 45 dias de cultivo *in vitro*, 15 plantas de cada tratamento foram destinadas à aclimatização em casa de vegetação. Nessa fase, o experimento foi conduzido em DBC, com três tratamentos, três blocos e cinco plantas por repetição.

As plantas destinadas à aclimatização foram colocadas em bandejas plásticas de 30 células e capacidade de 300 mL, contendo substrato Basaplant Hortaliças®. A irrigação das plantas foi por meio de microaspersão, duas vezes ao dia, às 7h00min e 18h00min, com duração de 10 minutos cada. Não foram realizadas adubações suplementares.

A casa de vegetação estava coberta com plástico agrícola transparente difusor, malha de 150 μm e tela de sombreamento de 35%, localizada na Unidade de Apoio à Pesquisa (UAP), do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias (CCTA) da UENF.

Durante a aclimatização houve mortalidade total das plantas do tratamento hidrogel-pH 1,5 e baixa sobrevivência das plantas do tratamento hidrogel-pH 5,8. Por esse motivo, aos 45 dias de aclimatização foi avaliada somente a sobrevivência (%) das plantas.

Experimento III: Hidrogel como agente geleificante de meio de cultura no cultivo *in vitro* de *Arabidopsis thaliana*

Material Vegetal

Sementes de *Arabidopsis thaliana* (Columbia-0, tipo selvagem) foram cedidas pela Unidade de Pesquisas em Biologia Integrativa (Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF), para a realização deste experimento.

Fase I – Germinação e crescimento *in vitro* de sementes de *A. thaliana* (Columbia-0)

O experimento foi conduzido em DBC, com três tratamentos e cinco blocos. Cada repetição foi constituída por uma placa de Petri ($\varnothing 120\text{mm}$) contendo 70 mL de meio de cultura e seis sementes. Os tratamentos foram os meios contendo sais de MS (Murashige e Skoog, 1962) com pH 5,8 e 8 g L⁻¹ de ágar (T1), sais de MS com pH 5,8 e 24 g L⁻¹ de hidrogel (T2) e sais de MS com pH 1,5 e 24 g L⁻¹ de hidrogel (Tabela 1).

Em câmara de fluxo laminar, as sementes de *A. thaliana* Columbia-0 foram desinfestadas por um minuto em álcool 70% (v/v), posteriormente, imersas em solução de hipoclorito de sódio (NaClO) a 1% por 10 minutos, sob constante agitação. Em seguida, as sementes foram lavadas por três vezes em água desionizada e autoclavada. Na última lavagem, porém, a água não é drenada, permanecendo as sementes imersas em água durante 48 horas sob temperatura de 4° C, antes da sementeira, com o intuito de superar a dormência.

A sementeira foi realizada em câmara de fluxo laminar em placas de Petri, seis sementes por placa contendo 70 mL de meio de cultura. As sementes inoculadas foram mantidas durante 45 dias em câmara de crescimento do tipo B.O.D. com temperatura de $21 \pm 2^{\circ}\text{C}$, sob fotoperíodo de 16:8 horas luz:escuro e irradiância de 50 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$ provida por lâmpadas fluorescentes luz do dia (OSRAM®).

Ao final da fase *in vitro*, as plântulas foram avaliadas quanto a sobrevivência (%), número de folhas, altura (cm), comprimento radicular (mm) e diâmetro da roseta (mm).

Descrição das análises realizadas nos experimentos

- Sobrevivência: Contagem das plantas sobreviventes. Dada em porcentagem.
- Número de Folhas (NF): Determinado por meio da contagem das folhas;
- Altura de Planta (AP): Determinada por meio de paquímetro digital Santec® (*in vitro*) e régua graduada (aclimatização). As medições foram realizadas a partir do coleto da planta até o ápice caulinar. Dada em centímetro;
- Área Foliar (AF): Foi determinada por meio do aparelho Li-cor®, modelo LI 3100. As folhas foram limpas e passadas pelo aparelho, uma a uma, e os valores de área foliar foram fornecidos no visor do aparelho, que apresenta medida mínima de 1,0 mm² e resolução de até 0,1mm² (LI-COR, 1996). Dada em centímetro quadrado;
- Volume Radicular (VR): O VR foi mensurado por meio do aparelho WinRHIZO® (Régent Instrument. Inc.) (fase *in vitro*) e pelo método da proveta (fase de aclimatização). O WinRHIZO® é acoplado a um scanner profissional Epson® XL 10.000 equipado com unidade de luz adicional (TPU), em que as raízes ficaram dispostas em uma cuba acrílica contendo água, uma imagem foi gerada e foram obtidas as informações a partir dela. No método da proveta, as raízes são submersas em proveta graduada com volume de água conhecido e o volume radicular é, então, determinado pela diferença entre o volume final e inicial do recipiente (Frazão et al., 2010). O VR foi dado em centímetro cúbico (WinRHIZO®) e milímetro (proveta);
- Comprimento Radicular (CR): O CR foi mensurado por meio do aparelho WinRHIZO® (Régent Instrument. Inc.) (fase *in vitro*) e de régua graduada (fase de aclimatização). O CR foi expresso em centímetro;
- Diâmetro de coleto (DC): Determinado por meio do paquímetro digital Santec®. As medições foram realizadas no coleto da planta. Dado em milímetro;

- Diâmetro de roseta (DR): Determinado por meio do paquímetro digital Santec®, sendo as medições realizadas a partir dos bordos foliares no maior diâmetro da roseta. Dado em milímetros;
- Massa da Matéria Fresca da Parte Aérea, Sistema Radicular e Total (MFPA, MFR e MFT, respectivamente): As plantas frescas foram divididas em parte aérea e sistema radicular. Em seguida, a massa de matéria fresca foi determinada por meio da pesagem em balança analítica (Bel Engineering®). A massa de matéria fresca total foi dada pela soma da massa de matéria fresca da parte aérea e do sistema radicular. Dada em grama;
- Massa da Matéria Seca da Parte Aérea, Sistema Radicular e Total (MSPA, MSR e MST, respectivamente): As plantas foram divididas em parte aérea e sistema radicular, acondicionadas separadamente em sacos de papel identificados e submetidas à secagem em estufa de circulação forçada de ar a 65 °C até atingir massa constante. Em seguida, foram pesadas em balança analítica. A massa de matéria seca total foi dada pela soma da massa de matéria seca da parte aérea e do sistema radicular. Dada em miligrama na fase *in vitro* e em grama na fase de aclimatização;
- Índice de Verde (IV): Foi determinado por meio do medidor portátil de clorofila, modelo SPAD-502 “Soil Plant Analyser Development” (Minolta, Japão). As medições foram feitas em cinco diferentes pontos na parte mediana do limbo foliar evitando-se as nervuras e as extremidades da folha, e em seguida obtidas as médias das leituras. O medidor portátil de clorofila tem sido uma ferramenta importante para detectar diferentes estresses abióticos em plantas, como o hídrico, o de nitrogênio e o salino. É um medidor de fácil manuseio e permite análises não destrutivas dos tecidos foliares (Torres Netto et al., 2002; Torres Netto, 2005; Peçanha, 2010; Castro, 2011). As análises de IV e Fv/Fm foram realizadas nas mesmas folhas;
- Eficiência fotoquímica máxima do PSII (Fv/Fm): Determinada por meio do fluorímetro não-modulado, modelo Pocket PEA Chlorophyll Fluorimeter (Hansatech Instruments – King’s Lynn, Norfolk). A avaliação foi feita na quarta folha totalmente expandida contada do ápice para a base. Com o auxílio das pinças de medição, a folha foi adaptada ao escuro por 20 minutos para que todos os centros de reação do fotossistema II (PSII) adquirissem a condição de “abertos”, e a perda de calor fosse mínima (Bòlhar-Nordenkampf et al., 1989).

Após 20 minutos de adaptação ao escuro, a medição da fluorescência máxima (F_m) foi efetuada por meio da emissão de um pulso de luz saturante com duração de três segundos, sob frequência de 20.000 Hz. A fluorescência inicial (F_0) foi obtida com luz modulada de baixa intensidade ($<0,1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). A fluorescência variável (F_v) foi determinada pela diferença entre F_0 e F_m . E, por fim, foi determinada a razão F_v/F_m , máximo rendimento quântico do PSII. Todas as medições foram realizadas entre 8h e 10h da manhã;

- pH: Foi aferido diretamente nos meios de cultura, em ambiente não estéril, por meio de pHmetro Hanna® (HI 2210-01);
- CE: Foi aferida diretamente nos meios de cultura, em ambiente não estéril, por meio do condutivímetro Lutron® (CD-4301).

Análises Estatísticas

Os dados foram submetidos às pressuposições de normalidade e homogeneidade. Em seguida, realizou-se a análise de variância (ANOVA). As médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando o software SISVAR versão 5.6 (Ferreira, 2011).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Experimento I: Hidrogel como agente geleificante de meio de cultura no cultivo *in vitro* de pimentão

Fase II – Crescimento *in vitro*

Ao final da fase *in vitro*, obtiveram-se os resultados de sobrevivência das plantas cultivadas em diferentes meios de cultura. A maior porcentagem de sobrevivência *in vitro* foi verificada nas plantas cultivadas no tratamento hidrogel-pH 1,5 e a maior porcentagem de mortalidade de plantas foi verificada no controle com ágar (Tabela 2).

Tabela 2 – Sobrevivência de plantas de pimentão ao final de 23 dias de cultivo *in vitro* em diferentes meios de cultura

Tratamentos	Sobrevivência <i>in vitro</i>
Ágar-pH 5,8	46,85b
Hidrogel-pH 5,8	50,00b
Hidrogel-pH 1,5	75,00a
CV (%)	12,74

Médias seguidas de mesma letra na coluna não se diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

A causa das mortes de plantas em todos os meios testados foi a contaminação endofítica de origem bacteriana. O crescimento microbiano teve início ainda na fase de germinação *in vitro*, apesar de ter sido realizado o protocolo de esterilização das sementes. Desse modo, houve a necessidade de transferência das plântulas em início de germinação para um novo meio de cultura com a mesma composição. No entanto, ainda houve registros de contaminação endofítica de origem bacteriana durante a fase de crescimento *in vitro*.

Microrganismos endofíticos geralmente são transmitidos de forma horizontal, em que os esporos penetram nas plantas por aberturas naturais ou ferimentos. Porém, a transmissão pode ser feita verticalmente por meio de sementes (Hartley e Gange, 2009; Aly et al., 2011). Esses microrganismos colonizam diversas partes da planta estabelecendo uma relação mutualística (Azevedo, 1998; García et al., 2012). Mas, essa relação pode deixar de ser mutualística para se tornar parasitária para o explante quando em condições de cultivo *in vitro* (Misra et al., 2010; Fang e Hsu, 2012). Isso se deve ao rápido crescimento microbiano quando em contato com um meio de cultura altamente nutritivo, estabelecendo uma relação de competição por água e nutrientes com o explante. Uma vez consumidos todos os nutrientes do meio, o microrganismo passa a consumir os tecidos vegetais do explante, causando-lhe a morte.

Quanto às respostas biométricas, a análise de variância mostrou diferença significativa entre os tratamentos em todas as variáveis analisadas. O tratamento com ágar proporcionou em todas as variáveis analisadas os melhores

resultados. Os tratamentos com hidrogel não diferiram entre si nas variáveis NF, AP, VR e CR. Já para as variáveis AF e MSPA o tratamento com hidrogel-pH 1,5 foi superior ao hidrogel-pH5,8 (Tabela 3).

Tabela 3 - Respostas biométricas de plantas de pimentão cultivadas *in vitro* nos diferentes meios de cultura

Tratamentos	NF	AP	AF	VR	CR	MSPA
Ágar-pH 5,8	8,42a	4,83a	28,94a	0,13a	61,34a	47,07a
Hidrogel-pH 5,8	5,83b	3,05b	6,63c	0,06b	34,62b	10,48c
Hidrogel-pH 1,5	6,75b	2,80b	10,81b	0,07b	35,42b	27,90b
CV (%)	15,78	19,38	12,37	16,13	18,78	7,77

Médias seguidas de mesma letra na coluna não se diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). NF – número de folhas; AP – altura de planta (cm); AF – área foliar (cm²); VR – volume radicular (cm³); CR – comprimento radicular (cm) e MSPA – massa de matéria seca da parte aérea (mg).

É possível observar que as plantas cultivadas em hidrogel visivelmente não aparentam diferença entre si. No entanto, estas diferem consideravelmente das plantas cultivadas em ágar (Figura 1).



Figura 1 - Plantas de pimentão após 23 dias de cultivo *in vitro*. (A) Plantas de pimentão cultivadas em meio de cultura contendo 8 g L⁻¹ de ágar e pH de 5,8. (B) Plantas de pimentão cultivadas em meio de cultura contendo 24 g L⁻¹ de hidrogel e pH de 5,8. C - Plantas de pimentão cultivadas em meio de cultura contendo 24 g L⁻¹ de hidrogel e pH de 1,5.

George et al. (2008) e Freitas et al. (2015) relatam que altas concentrações de sacarose isoladamente ou associadas ao excesso de sais no meio de cultura, como, por exemplo o MS (Murashige e Skoog, 1962), inibem a formação de raízes. Associando essa informação aos valores de CE encontrados nos meios com hidrogel (entre 9,0 e 11,0 mS.cm⁻¹), é provável que o crescimento do sistema radicular tenha sido prejudicado em função da alta osmolaridade dos meios.

Apesar desse estudo não ter analisado diferentes concentrações de sacarose e sais de MS, Besson et al. (2010), afirmam que concentrações elevadas de sacarose reduzem a absorção de sais e água em função do desequilíbrio na osmolaridade do meio, em que o potencial osmótico do meio torna-se mais negativo que o da planta, resultando em desidratação e redução do crescimento (Jo et al., 2009; Bandinelli et al., 2013). Acredita-se que a redução na concentração de sacarose e, ou, a utilização de um meio menos concentrado em sais minerais como, por exemplo, ½ dos sais de MS (Murashige e Skoog, 1962), proporcione resultados mais satisfatórios.

Quanto aos aspectos fisiológicos, o ágar apresentou as maiores médias para todas as variáveis analisadas. No entanto, para o índice de fotossíntese o tratamento com hidrogel-pH 1,5 não diferiu do tratamento com ágar, tendo estes médias superiores ao tratamento com o hidrogel-pH 5,8. Na variável Fv/Fm o tratamento com hidrogel-pH 1,5 foi superior ao hidrogel-pH 5,8. De modo contrário, para o índice de verde o tratamento com hidrogel-pH 5,8 foi superior ao hidrogel-pH 1,5 (Tabela 4).

Tabela 4 - Respostas fisiológicas de plantas de pimentão cultivadas *in vitro* nos diferentes meios de cultura

Tratamentos	IV	Fv/Fm	PI
Ágar-pH 5,8	35,75a	0,79a	0,57a
Hidrogel-pH 5,8	9,66b	0,39c	0,27b
Hidrogel-pH 1,5	4,22c	0,69b	0,61a
CV (%)	10,53	8,49	24,27

Médias seguidas de mesma letra na coluna não se diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (p<0,05). IV – índice de verde; Fv/Fm – eficiência fotoquímica máxima do PSII e PI – índice de fotossíntese.

As mudanças na emissão de fluorescência da clorofila *a* são resultados frequentes de modificações na atividade fotossintética, principalmente com relação à eficiência do transporte de elétrons através do PSII em folhas (Yusuf et al., 2010). Dentre os diversos parâmetros de fluorescência da clorofila, a eficiência fotoquímica máxima do PSII (Fv/Fm) tem sido amplamente utilizada para comparar tecidos saudáveis e danificados (Rousseau et al., 2013).

Plantas que não estejam sob condições de estresse, ou seja, com o aparelho fotossintético intacto, apresentam razão Fv/Fm entre 0,75 e 0,85 elétrons quantum⁻¹ (Reis e Campostrini, 2008; Santos et al., 2011; Suassuna et al., 2010; Santos et al., 2014; Silva et al., 2015). A redução desta razão reflete em dano fotoinibitório nos centros de reação do PSII causado pela luz quando as plantas são submetidas a uma ampla gama de estresses ambientais, incluindo a seca (Keck e Boyer, 1974; Ögrene Öquist, 1985).

Considerando estas informações, observou-se que as plantas cultivadas em hidrogel apresentaram valores abaixo de 0,75 elétrons quantum⁻¹, em que plantas cultivadas em hidrogel-pH 1,5 apresentaram maior relação Fv/Fm e menor teor de clorofila comparadas às plantas cultivadas em hidrogel-pH 5,8 (Tabela 4). Esses resultados indicam um possível dano ao aparato fotossintético e, ou, uma estratégia de conviver com o estresse imposto.

Em plantas de feijão 'Flavert' inoculadas com estripes *Xanthomonas fuscans* subsp. *Fuscans* (Xff) CFBP4834-R foram avaliadas a relação Fv/Fm, em que a relação $0,25 < Fv/Fm \leq 0,45$ se refere a tecidos murchos. A relação $Fv/Fm \leq 0,25$ se refere a tecidos necrosados (Rousseau et al., 2013). Considerando a relação Fv/Fm das plantas cultivadas em meios com hidrogel-pH 5,8 (0,39), é provável que o reduzido potencial osmótico do meio tenha causado desidratação dos tecidos.

Um mecanismo de defesa de plantas em condições de estresse é a redução do teor de clorofila, de modo que ao reduzir a captação de energia luminosa, diminui-se o fluxo de elétrons para a cadeia de transferência de elétrons, e evita-se a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Brosché et al., 2010).

Nos resultados desta pesquisa, pode-se observar que as plantas cultivadas em hidrogel-pH 1,5 apresentaram menor teor de clorofila quando comparado com as plantas cultivadas em hidrogel-pH 5,8, indicando uma adaptação ao estresse

imposto e justificando a menor fotoinibição do aparato fotossintético das plantas nesse tratamento.

A preservação do aparato fotossintético em razão da redução do teor de clorofila é a explicação para que o índice fotossintético das plantas cultivadas em ágar e em hidrogel-pH1,5 não tenha se diferido, bem como, tenha sido superior ao das plantas cultivadas em hidrogel-pH 5,8. Apesar disso, o índice fotossintético das plantas cultivadas em ágar possivelmente é superior ao das plantas cultivadas em hidrogel-pH1,5, visto que a área foliar é maior no tratamento com ágar (Tabela 3). Considerando que a área foliar está relacionada à fotossíntese, geralmente, quanto maior a área foliar maior o número de estômatos, maior a difusão de CO₂ atmosférico para o mesofilo foliar e, conseqüentemente, maior a taxa fotossintética (Park et al., 2011).

Com relação à condição de estresse possivelmente imposta pelo uso do hidrogel, Marques et al. (2013) avaliando a atividade de enzimas em cana-de-açúcar, detectaram o aumento da atividade enzimática da polifenoloxidase (PPO) em função do aumento da dose de polímero hidroabsorvente aplicada no plantio. Considerando que a PPO é uma enzima relacionada ao mecanismo de defesa da planta a estresses, estes autores afirmam que é possível que o uso de polímeros altere o metabolismo das plantas, devido à condição de estresse a que são submetidas.

Não houve crescimento adequado das plântulas estabelecidas nos tratamentos com hidrogel e, além disso, pode-se observar que as folhas apresentaram queimadura das bordas marginais e seca das ponteiros do limbo foliar, início de senescência e abscisão de folhas basais (Figura 2).



Figura 2 - Ponteiros do limbo foliar secas em plantas de pimentão cultivadas em hidrogel.

Folhas encurvadas, abscisão das folhas basais, clorose e consequente necrose nas regiões do ápice e bordos foliares e paralisação do crescimento são sintomas característicos de deficiência de K em plantas de pimentão (Silva, 2013). No entanto, de acordo com os resultados da análise de sais solúveis (Tabela 2, Capítulo I) o meio de cultura contendo hidrogel disponibiliza maiores teores de K que os meios contendo ágar. Desse modo, descarta-se a hipótese de ter ocorrido deficiência desse nutriente. Por outro lado, o excesso de K pode ter propiciado a diminuição da absorção de outros cátions como Ca e Mg (Leonardo et al., 2008), cujos efeitos de deficiência desses nutrientes causam clorose, encarquilhamento e redução no crescimento de folhas (Silva, 2013). Além disso, estes sintomas correspondem à toxicidade por sais (Martínez-Villegas et al., 2015).

A cultura do pimentão é considerada moderadamente sensível à salinidade do solo (Nascimento et al., 2015). O estresse salino em plantas de pimentão, segundo Aktas et al. (2006), provoca distúrbios na permeabilidade das membranas celulares e alterações na condutância estomática, fotossíntese e balanço iônico, os quais acarretam redução no desenvolvimento das plantas.

A folha madura torna-se fonte de água e nutrientes para outras folhas jovens e sua função como produtora de fotoassimilados é reduzida até sua morte. Um dos processos de senescência foliar é a desmontagem do aparato

fotossintético dos complexos antena da clorofila, resultando em prejuízos na taxa fotossintética (Macedo et al., 2007).

Para confirmar a possível ocorrência de estresse salino nas plantas cultivadas em hidrogel, aferiram-se o pH e a CE dos meios de cultura antes e após o cultivo *in vitro*. Houve interação entre o período de aferição de pH e diferentes meios de cultura, em que houve redução do pH em todos os tratamentos após o cultivo. Com relação a CE, antes do cultivo os meios contendo hidrogel apresentaram maiores condutividades que os meios com ágar. Após o cultivo, meios com ágar apresentaram a menor CE (Tabela 5).

Tabela 5 – pH e CE aferidos antes e após o cultivo *in vitro* de plantas de pimentão nos diferentes meios de cultura

Aferição	pH Meio Cultura			CE Meio Cultura		
	Tratamentos			Tratamentos		
	Ágar	Hidro1,5	Hidro5,8	Ágar	Hidro1,5	Hidro5,8
Antes do cultivo	5,30 aB	5,59 aB	6,44 aA	6,22 aC	10,94 bA	10,35 aB
Após o cultivo	2,74 bB	4,77 bA	4,79 bA	1,97 bC	11,80 aA	9,55 bB
CV (%)	7,18			1,47		

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não se diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). CE (mS cm^{-1}).

A CE nos meios de cultura contendo hidrogel é expressivamente superior do que a CE no meio contendo ágar. É possível perceber que as plantas cultivadas em meio de cultura contendo ágar conseguiram extrair os minerais de forma mais eficiente em comparação com os meios contendo hidrogel. É possível afirmar isso, primeiramente, devido às melhores respostas biométricas das plantas e, também devido à significativa redução da CE após o cultivo nos meios contendo ágar.

O pH do hidrogel se mantém mais elevado do que o do ágar após o cultivo. Nota-se que os meios contendo ágar e hidrogel sofreram acidificação do meio após o cultivo. A semelhança quanto ao pH e a CE após o cultivo entre os meios contendo hidrogel pode justificar a semelhança estatística entre os dois tratamentos quanto às variáveis biométricas.

Após o cultivo *in vitro*, no tratamento com hidrogel-pH 1,5 houve um aumento da CE, indicando que tenha ocorrido um maior acúmulo de nutrientes solúveis adsorvidos nas partículas do hidrogel ou que a planta foi capaz de extrair do meio apenas água ou água com pequena quantidade de sais, fazendo com que os sais se acumulassem no meio de cultura.

Os efeitos da salinidade sobre as plantas incluem restrição na assimilação do CO₂ e redução no teor de clorofila (Silva et al., 2010), resultando, frequentemente, na redução do crescimento da planta (Willadino et al., 2011). A redução do teor de clorofila em função do incremento do nível salino é uma resposta frequente em várias espécies vegetais, entre elas *Grewia tenax*, *Tamarindus indica* (Hunsche et al., 2010) e *Jatropha curcas* (Silva et al., 2010).

Fase III – Aclimatização

Após 35 dias de aclimatização obtiveram-se os resultados de sobrevivência das plantas que foram cultivadas *in vitro* em diferentes meios de cultura. Não houve diferença nas porcentagens de sobrevivência (66,88 e 66,66%) entre as plantas cultivadas com ágar e as cultivadas com hidrogel-pH 1,5. Já para as plantas cultivadas em hidrogel-pH 5,8, a sobrevivência foi de apenas 8,4%. (Tabela 6).

Tabela 6 - Sobrevivência após 35 dias de aclimatização de plantas de pimentão cultivadas *in vitro* em diferentes meios de cultura

Tratamentos	Sobrevivência Aclimatização
Ágar-pH 5,8	66,88a
Hidrogel-pH 5,8	8,40b
Hidrogel-pH 1,5	66,66a
CV (%)	5,89

Médias seguidas de mesma letra na coluna não se diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

As plantas cultivadas em hidrogel-pH 1,5 apresentaram-se sob menor condição de estresse, ou seja, mais saudáveis fisiologicamente ($F_v/F_m = 0,69$) do que as plantas cultivadas em hidrogel pH-5,8 ($F_v/F_m = 0,39$) ao final da fase *in vitro* (Tabela 4). Provavelmente essa foi a razão da maior porcentagem de sobrevivência na fase de aclimatização das plantas cultivadas em hidrogel-pH 1,5.

Durante o cultivo *in vitro* as plantas adquirem a característica de seres mixotróficos, em que na baixa radiação luminosa se comportam como seres heterotróficos devido à presença de sacarose nos meios (Kozai, 2010). A sacarose no meio de cultura é a fonte de carbono necessária para a síntese de compostos orgânicos. Altas concentrações de sacarose fornecidas no meio de cultura proporcionam baixa ou nenhuma taxa de fotossíntese sob condição *in vitro*.

O PI, índice fotossintético, determina o índice de desempenho para a conservação de energia dos fótons absorvidos pelo PSII para a redução dos aceptores finais do PSI (Tsimilli-Michael e Strasser, 2008). Não houve diferença entre o PI das plantas cultivadas em ágar e as cultivadas em hidrogel-pH 1,5 (Tabela 4). Sendo assim, essas plantas, provavelmente, estavam mais preparadas para realizar a fotossíntese do que as plantas cultivadas em hidrogel-pH 5,8.

Quanto às variáveis biométricas, não foi possível avaliar a biometria das plantas cultivadas em hidrogel-pH 5,8, visto que apenas uma planta sobreviveu e esta não apresentou crescimento de órgãos vegetativos. Desse modo, obtiveram-se apenas as respostas biométricas das plantas cultivadas em ágar e as cultivadas em hidrogel-pH 1,5 (Tabela 7).

Tabela 7 - Respostas biométricas após 35 dias de aclimatização de plantas de pimentão cultivadas *in vitro* em meios de cultura contendo 8 g L⁻¹ de ágar e pH 5,8, 24 g L⁻¹ de hidrogel e pH 5,8, e 24 g L⁻¹ de hidrogel e pH 1,5

Tratamentos	NF	AP	DC	VR	CR	MFPA	MFR	MFT	MSPA	MSR	MST
Ágar-pH 5,8	11,00a	11,75a	3,77b	1,44b	20,27a	3,97b	2,11b	6,28 b	0,57b	0,15a	0,76 b
Hidrogel-pH 1,5	11,17a	13,56a	4,18a	2,00a	18,70a	5,57a	2,54a	7,84 a	0,91a	0,18a	1,19 a
CV (%)	10,99	19,21	4,03	10,98	12,23	8,44	10,08	3,22	6,28	16,87	6,49

Médias seguidas de mesma letra na coluna não se diferem estatisticamente pelo teste de Fisher ($p < 0,05$). NF – número de folhas; AP – altura de planta (cm); DC – diâmetro do coleto (mm); VR – volume radicular (mm); CR – Comprimento radicular (cm); MFPA – massa de matéria fresca da parte aérea (g); MFR – massa de matéria fresca da raiz (g); MFT – massa de matéria fresca total (mg); MSPA – massa de matéria seca da parte aérea (g); MSR – massa de matéria seca da raiz (g) e MST – massa de matéria seca total (g).

Nas variáveis NF, AP, CR e MSR não se verificou diferença entre as plantas cultivadas em ágar e as cultivadas em hidrogel-pH 1,5. Quanto ao DC, VR, MFPA, MFR e MSPA, as plantas cultivadas em hidrogel com pH 1,5 foram superiores às plantas cultivadas em ágar.

Foi possível observar que algumas plantas cultivadas em hidrogel-pH 1,5 entraram na fase adulta durante o período de aclimatização, tendo ela, a presença de botão floral (Figura 3).



Figura 3 - Desenvolvimento de plantas de pimentão cultivadas *in vitro* com hidrogel-pH 1,5 após a aclimatização. A seta indica a presença do botão floral em planta de pimentão cultivada *in vitro* em hidrogel-pH 1,5, durante a fase de aclimatização.

Esses resultados mostram que as plantas cultivadas em hidrogel-pH 1,5 apresentaram melhores respostas na aclimatização do que no crescimento *in vitro*. Isso se deve provavelmente ao cessamento da condição de estresse a que as plantas estavam condicionadas.

São necessários mais estudos que visem a redução da condutividade elétrica nos meios contendo hidrogel, que possivelmente pode ser obtida a partir da redução do teor de potássio. E, dessa forma, alcançar melhores respostas no

crescimento vegetativo e qualidade fisiológica das plantas cultivadas nos meios de cultura contendo hidrogel.

Experimento II: Hidrogel como agente geleificante de meio de cultura no cultivo *in vitro* de batata-doce

Fase I – Crescimento *in vitro*

Ao final da fase *in vitro*, foram obtidos os resultados de sobrevivência das plantas cultivadas em diferentes meios de cultura. A maior porcentagem de sobrevivência *in vitro* foi verificada nas plantas cultivadas em ágar-pH 5,8 (94,67%). A sobrevivência no meio com hidrogel-pH 5,8 foi de 76% e no meio com hidrogel-pH 1,5 foi de 77,3% (Tabela 8).

Tabela 8 - Sobrevivência de plantas de batata-doce ao final de 30 dias de cultivo *in vitro* em diferentes meios de cultura

Tratamentos	Sobrevivência <i>in vitro</i>
Ágar-pH 5,8	94,67 a
Hidrogel-pH 5,8	76,00 b
Hidrogel-pH 1,5	77,33 b
CV (%)	3,77

Médias seguidas de mesma letra na coluna não se diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

A maior sobrevivência foi verificada nos meios contendo ágar em função do tipo de cultivo, em especial, o tipo de explante. O explante utilizado no cultivo *in vitro* de batata-doce foi do tipo segmento nodal. Esse explante é um segmento de caule que apesar de possuir xilema formado, não possui raízes que absorvem a água do meio de cultura via transporte ativo. Considerando o excesso de sais, como potássio e sódio, verificados nos meios contendo hidrogel, é possível que

não tenha ocorrido o transporte passivo de água devido ao desbalanço osmótico, e com isso, causado a morte do explante. Além disso, explantes submetidos à excisão podem sofrer oxidação fenólica dependendo do genótipo e do meio de cultura em que são inoculados. Alguns autores defendem que a redução da concentração de sais reduz a oxidação em algumas espécies (Flores et al., 1998). A oxidação fenólica pode dificultar o estabelecimento inicial de culturas *in vitro* por causar a inibição do crescimento e a morte dos explantes em grande número de espécies (Monaco et al., 1977).

No cultivo *in vitro* de batata-doce os tratamentos apresentaram diferença significativa para todas as variáveis analisadas. Nas respostas biométricas o tratamento com ágar-pH 5,8 proporcionou as maiores médias (Tabela 9).

Tabela 9 - Respostas biométricas de plantas de batata-doce cultivadas *in vitro* nos diferentes meios de cultura

Tratamento	NF	AP	AF	VR	CR	MSPA
Ágar-pH 5,8	11,22a	5,43a	24,33a	0,15a	133,47a	23,34a
Hidrogel-pH 5,8	5,77b	2,17b	3,89b	0,03b	47,84b	1,33b
Hidrogel-pH 1,5	5,11b	1,92b	1,77c	0,02c	41,81c	1,78b
CV (%)	12,40	20,27	9,57	7,76	5,97	13,52

Médias seguidas de mesma letra na coluna não se diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). NF – número de folhas; AP – altura de planta (cm); AF – área foliar (cm^2); VR – volume radicular (cm^3); CR – comprimento radicular (cm) e MSPA – massa de matéria seca da parte aérea (mg).

Nos aspectos fisiológicos, as plantas de batata-doce apresentaram maiores valores médios quando cultivadas em meio com ágar-pH 5,8. No entanto, não se verificou diferença entre o valor de F_v/F_m das plantas cultivadas em hidrogel-pH 5,8 e o das plantas cultivadas em ágar-pH 5,8, diferindo-se do tratamento com hidrogel-pH 1,5 (Tabela 10).

Tabela 10 - Respostas fisiológicas de plantas de batata-doce cultivadas *in vitro* nos diferentes meios de cultura

Tratamento	IV	Fv/Fm	PI
Ágar-pH 5,8	16,30a	0,69a	1,67a
Hidrogel-pH 5,8	12,83b	0,61a	0,50b
Hidrogel-pH 1,5	7,87c	0,45b	0,24c
CV (%)	6,84	15,86	20,96

Médias seguidas de mesma letra na coluna não se diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). IV – índice de verde; Fv/Fm – eficiência fotoquímica máxima do PSII e PI – índice de fotossíntese.

Os valores de pH e CE foram verificados ao final da fase *in vitro*. Houve interação entre o período de aferição de pH e diferentes meios de cultura. Assim como nos meios cultivados com plantas de pimentão, o meio com ágar apresentou pH mais ácido entre os meios testados. Seguindo a mesma resposta no cultivo *in vitro* de pimentão, os meios contendo hidrogel mantiveram o pH mais elevado do que o meio com ágar, com valores entre 4,0 e 5,0 (Tabela 11).

Tabela 11 – Resultados de pH e CE aferidos antes e após o cultivo *in vitro* de plantas de batata-doce nos diferentes meios de cultura

Aferição	pH Meio Cultura			CE Meio Cultura		
	Tratamentos			Tratamentos		
	Ágar	Hidro1,5	Hidro5,8	Ágar	Hidro1,5	Hidro5,8
Antes do cultivo	5,44 aB	5,59 aB	6,44 aA	6,22 aC	10,94 bA	10,36 aB
Após o cultivo	3,65 bB	4,57 bA	4,68 bA	2,12 bC	11,57 aA	9,46 bB
CV (%)	1,65			1,89		

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não se diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). CE (mS cm^{-1}).

Os meios contendo hidrogel apresentaram as maiores condutividades elétricas. Isso pode ter acontecido em função da maior retenção de água do hidrogel, que reduz a difusão dos minerais para as raízes das plantas. Associado

a isso, o hidrogel disponibiliza altos teores de potássio solúvel, que colabora com o aumento da CE.

Segundo Marques et al. (2011), o fornecimento excessivo de potássio promove desequilíbrio nutricional nas plantas, com redução da absorção do Ca^{2+} e Mg^{2+} , que competem pelo mesmo sítio de absorção que o K^+ . Além do potássio, o excesso de fósforo proporciona elevação da salinidade e toxidez das plantas de batata-doce (Oliveira et al., 2006).

Rós et al. (2013) demonstraram o efeito negativo do excesso de fertilizante (Osmocote, 19-06-10) com liberação lenta sobre a característica de número de folhas em batata-doce. Freitas et al. (2011) verificaram que altas concentrações de fertilizantes no substrato afetam a massa da matéria seca das raízes em função de modificações que ocorrem no substrato, como a redução de pH.

A batata-doce é uma cultura que resiste a períodos de seca, aproveitando curtos períodos chuvosos. Além disso, possui a capacidade de produzir em solos com baixa fertilidade (International Potato Center, 2008). Embora seja uma planta rústica, a batata-doce apresenta incremento na produtividade de raízes quando há melhoria das condições físicas e químicas do solo (Barrera, 1986).

Sendo assim, infere-se que plantas da batata-doce podem apresentar crescimento vegetativo satisfatório quando em condição de estresse hídrico, mas não em condição de estresse salino. Essa pode ser a justificativa do fato das plantas cultivadas em hidrogel-pH 5,8 terem apresentado maiores médias para aspectos biométricos e fisiológicos em comparação ao hidrogel-pH 1,5, assim como, as plantas cultivadas em ágar-pH 5,8, apresentarem maiores médias que as cultivadas em hidrogel.

De acordo com Eschemback et al. (2015), a raiz da batata-doce é a parte mais afetada pela alta salinidade. E, de acordo com essa pesquisa, houve mudanças típicas de estresse salino no aspecto morfológico do sistema radicular de batata-doce (Figura 4).



Figura 4 – Queimadura das bordas do limbo foliar e da coifa das raízes como evidência de estresse salino em plantas cultivadas em meios de cultura contendo hidrogel (A). Redução do crescimento do sistema radicular em plantas cultivadas em meios de cultura contendo hidrogel (B). Sistema radicular de batata-doce em meio de cultura contendo ágar (C). Setas indicam bordos do limbo foliar e pontas de raízes queimados (A) e sistema radicular com desenvolvimento anormal em meios contendo hidrogel (B).

Fase II – Aclimatização

Na fase de aclimatização a maior sobrevivência foi observada nas plantas cultivadas *in vitro* em ágar-pH 5,8. Não foi registrada sobrevivência para as plantas cultivadas *in vitro* em meio de cultura contendo hidrogel-pH 1,5. E, para as plantas cultivadas em meio de cultura contendo hidrogel-pH 5,8, apenas uma planta sobreviveu apresentando formação de órgãos vegetativos (Tabela 12).

Tabela 12 - Sobrevivência de plantas de batata-doce ao final de 45 dias de cultivo *in vitro* em diferentes meios de cultura

Tratamentos	Sobrevivência Aclimatização
Ágar-pH 5,8	80,00 a
Hidrogel-pH 5,8	6,88 b
Hidrogel-pH 1,5	0,00 b
CV (%)	9,50

Médias seguidas de mesma letra na coluna não se diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Experimento III: Hidrogel como agente geleificante de meio de cultura na germinação e crescimento *in vitro* de *Arabidopsis thaliana*

Ao final da fase *in vitro*, foram obtidos os resultados de sobrevivência das plantas cultivadas em diferentes meios de cultura. A maior porcentagem de sobrevivência (90%) *in vitro* foi verificada nas plantas cultivadas no controle (ágar-pH 5,8). A sobrevivência no meio com hidrogel-pH 5,8 foi de 53,3%, a menor. A sobrevivência no meio com hidrogel-pH 1,5 foi de 70% (Tabela 13).

Tabela 13 - Sobrevivência de plantas de *Arabidopsis thaliana* ao final de 45 dias de cultivo *in vitro* em diferentes meios de cultura

Tratamentos	Sobrevivência <i>in vitro</i>
Ágar-pH 5,8	90,66a
Hidrogel-pH 5,8	53,32c
Hidrogel-pH 1,5	70,00b
CV (%)	11,41

Médias seguidas de mesma letra na coluna não se diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Para as respostas biométricas, houve diferença entre os tratamentos em todas as variáveis analisadas, nas quais o meio com ágar-pH 5,8 apresentou as maiores médias. Igualmente ao ágar, o meio contendo hidrogel-pH 5,8

proporcionou as maiores médias de número de folha e diâmetro de roseta. O meio com hidrogel-pH 1,5 igualou-se ao ágar apenas em diâmetro de roseta, nas demais variáveis este tratamento apresentou as menores médias (Tabela 14).

Tabela 14 - Respostas biométricas de plantas de *A. thaliana* cultivadas *in vitro* nos diferentes meios de cultura

Tratamento	NF	AP	DR	CR
Ágar-pH 5,8	14,40a	17,09a	14,27a	4,42a
Hidrogel-pH 5,8	12,00a	6,77b	13,32a	3,21b
Hidrogel-pH 1,5	6,80b	3,38c	12,67a	1,63c
CV (%)	14,66	10,77	13,03	14,22

Médias seguidas de mesma letra na coluna não se diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). NF – número de folhas; AP – altura de planta (cm); DR – diâmetro de roseta (mm) e CR – comprimento radicular (cm).

Os efeitos indiretos da salinidade ocorrem devido à concentração elevada de sódio ou outros cátions na solução, que interferem nas condições físicas do substrato ou na disponibilidade de outros elementos. Em muitos casos, essas concentrações não atingem níveis osmóticos ou tóxicos capazes de prejudicar a absorção de água pelas plantas (Zanandrea et al., 2006). Porém, a concentração de íons diversos pode provocar interferências indiretas e ser um obstáculo à boa absorção de elementos essenciais e, conseqüentemente, ao desenvolvimento de um processo metabólico normal (Medeiros e Gheyi, 1997).

A supressão do crescimento celular pode facilitar a sobrevivência da planta ao estresse salino (Achard et al., 2006). Dessa forma, mais uma vez, a redução do crescimento das plantas cultivadas em hidrogel mostra-se uma consequência ao estresse imposto.

Wang et al. (2010) relatam que a *A. thaliana* possui algumas estratégias para suportar o estresse salino durante curto período, estratégias essas que envolvem a formação e reorganização do citoesqueleto de microfilamento. Isso pode justificar os resultados comparativamente melhores aos das culturas testadas.

No entanto, se as plantas de *A. thaliana* forem mantidas sob condições de estresse durante prolongado período, os citoesqueletos de microfilamentos polimerizados são despolimerizados e, conseqüentemente, as plantas tornam-se incapazes de sobreviver ao estresse salino (Wang et al.,2010).

CONCLUSÃO

O meio de cultura contendo 24 g L⁻¹ de hidrogel e pH da solução de sais ajustado para 1,5 pode ser utilizado no cultivo *in vitro* de pimentão 'Casca Dura Ikeda' sem prejuízo da planta ao final da aclimatização.

O uso de hidrogel não é recomendado nas condições deste trabalho para o cultivo *in vitro* de batata-doce, sendo o meio de cultura contendo ágar o mais indicado para o cultivo *in vitro* da espécie.

O uso de ágar no meio de cultura é mais indicado para a *A. thaliana*. No entanto, o uso de 24 g L⁻¹ hidrogel e pH da solução de sais ajustado para 5,8 pode ser utilizado para o cultivo *in vitro* de *A. thaliana*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Achard, P., Cheng, H., Grauwe, L., Decat, J., Schoutteten, H., Moritz, T., Van Der Straeten, D., Peng, J., Harberd, N.P. (2006). Integration of plant responses to environmentally activated phytohormonal signals. *Science*, 311 (5757): 91-94.
- Aly, A.H., Debbab, A., Proksch, P. (2011). Fungal endophytes: unique plant inhabitants with great promises. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 90 (6):1829-1845.

- Aouada, F.A., Mattoso, L.H.C. (2009). Hidrogéis biodegradáveis: uma opção na aplicação como veículos carreadores de sistemas de liberação controlada de pesticidas. *Embrapa Instrumentação Agropecuária-Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento (INFOTECA-E)*, 32 p.
- Azevedo, J.L. (1998). Microrganismos endofíticos. *Ecologia microbiana*, 117-137p.
- Babbar, S.B., Jain, N. (1998). 'Isubgol' as an alternative gelling agent for plant tissue culture media. *Plant Cell Reports*, 17 (4):318-322.
- Babbar, S.B., Jain, R. (2006). Xanthan gum: an economical partial substitute for agar in microbial culture media. *Current Microbiology*, 52 (4):287-292.
- Bandinelli, M.G., Bisognin, D.A., Gnocato, F.S., Mambrin, R.B., Sausen, D., Nicoloso, F.T. (2013). Concentração dos sais e da sacarose do meio MS na multiplicação *in vitro* e na aclimatização de batata. *Horticultura Brasileira*, 31 (2):242-247.
- Barbosa, R.R.N. (2016). *Cultivo in vitro de pimenta malagueta em frascos com ventilação natural: respostas mixotróficas e fotoautotróficas*. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF, 65 p.
- Barrera, P. (1986). *Batata-doce: uma das doze mais importantes culturas do mundo*. São Paulo: Ícone. 91p.
- 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.
- Chan, A.W., Whitney, R.A., Neufeld, R.J. (2009). Semisynthesis of a controlled stimuli-responsive alginate hydrogel. *Biomacromolecules*, 10, 609.

- Cigdem, A.O., Khalid, M.K., Orhan, A. (2008). A comparison of the gelling of isubgol, agar and gelrite on in vitro shoot regeneration and rooting of variety Samsun of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). *Scientia Horticulturae*, 117 (2):174-181.
- Eschemback, V., Bernert, M.R., Suchoronczek, A., Jadoski, S.O., Lima, A.S. (2015). Characteristics of soil Salinity in agricultural crops in Brazil. *Applied Research & Agrotechnology*, 7 (3):115-124.
- Ezekiel, A. (2010). Low Cost Vegetative Propagation of Tropical Trees. *International Journal of Botany*, 6 (2):187-193.
- Fang, J.Y., Hsu, Y.R. (2012). Molecular identification and antibiotic control of endophytic bacterial contaminants from micropropagated *Aglaonema* cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 110 (1):53-62.
- Faria, R.T., Dalio, R.J.D., Unemoto, L.K., Silva, G. S. (2006). Propagação *in vitro* de *Oncidium baueri* Lindl. (Orchidaceae) sem uso de ágar. *Acta Scientiarum*, 28 (1):71-74.
- Ferreira, D.F. (2011). Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciência e agrotecnologia*, 35 (6):1039-1042.
- Flores, R., Stefanello, S., Franco, E., Mantovani, N. (1998). Regeneração *in vitro* de espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* Mart.). *Current agricultural science and technology*, 4 (3):2001-2005.
- Freitas, C., Carvalho, V., Nievola, C.C. (2015). Efeito de concentrações de sacarose sobre o crescimento *in vitro* e a aclimatização da bromélia nativa *Vriesea inflata* (Wawra) Wawra. *Biotemas*, 28 (3):37-42.
- Freitas, S.J., Carvalho, A.J.C., Berilli, S.S., Santos, P.C., Marinho, C.S. (2011). Substratos e Osmocote® na nutrição e desenvolvimento de mudas

micropropagadas de abacaxizeiro cv. Vitória. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 33:672-679, Especial.

García, A., Rhoden, S.A., Rubin Filho, C.J., Nakamura, C.V., Pamphile, J.A. (2012). Diversity of foliar endophytic fungi from the medicinal plant *Sapindus saponaria* L. and their localization by scanning electron microscopy. *Biological research*, 45 (2):139-148.

George, E.F., Hall, M.A., Klerk, G.J. (2008). The components of plant tissue culture media II: organic additions, osmotic and pH effects and support systems. In: George, E.F., Hall, M.A., Klerk, G.J. *Plant propagation by tissue culture*. 3.ed. Netherland: Springer, 1, 501p

Hartley, S.E., Gange, A.C. (2009). Impacts of plant symbiotic fungi on insect herbivores: mutualism in a multitrophic context. *Annual review of entomology*, 54, 323-342.

International Potato Center. Annual report 2008: sweetpotato as a health benefit. Lima: CIP, 2008.

Jo, E.A., Tewari, R.K., Hahn, E.J., Paek, K.Y. (2009). *In vitro* sucrose concentration affects growth and acclimatization of *Alocasia amazonica* plantlets. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 96 (3):307-315.

Keck, R.W., Boyer, J.S. (1974). Chloroplast response to low leaf water potentials: III. Differing inhibition of electron transport and photophosphorylation. *Plant Physiology*, 53 (3):474-479.

Kozai, T. (2010). Photoautotrophic micropropagation-environmental control for promoting photosynthesis. *Propagation of Ornamental Plants*, 10 (4):188-204.

Leonardo, M., Broetto, F., Boas, R.L.V., Marchese, J.A., Tonin, F.B., Magali, R. (2008). Estado nutricional e componentes da produção de plantas de

pimentão conduzidas em sistema de fertirrigação durante indução de estresse salino em cultivo protegido. *Bragantia*, 67 (4):882-889.

Li, X., Xu, S., Pen, Y., Wang, J. (2008). The swelling behaviors and network parameters of cationic starch-g-acrylic acid/poly(dimethyldiallylammonium chloride) semi-interpenetrating polymer networks hydrogels. *Journal of Applied Polymer Science*, 110, 1828.

Lucyszyn, N., Quoirin, M., Anjos, A., Sierakowski, M.R. (2005). Blends of agar/galactomannan for Marubakaido apple Rootstock shoot proliferation. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, 15 (2):133-137.

Lucyszyn, N., Quoirin, M., Homma, M.M., Sierakowski, M.R. (2007). Agar/galactomannan gels applied to shoot regeneration from tobacco leaves. *Biologia Plantarum*, 51 (1):173-176.

Marques, D.J., Broetto, F., Silva, E.C., Carvalho, J.G. (2011). Dinâmica de cátions na raiz e folhas de berinjela cultivada sobre doses crescentes de potássio oriundas de duas fontes. *Idesia (Arica)*, 29 (2):69-77.

Marques, T.A., Rampazo, É.M., Marques, P.A.A. (2013). Oxidative enzymes activity in sugarcane juice as a function of the planting system. *Food Science and Technology*, 33 (1):146-150.

Medeiros, J.F., Gheyi, H.R. (1997). *Manejo do sistema solo-água-planta em solos afetados por sais*. In: Gheyi, H.R., Queiroz, J.E., Medeiros, J.F. (Eds.). *Manejo e controle da salinidade na agricultura irrigada*. Campina Grande: UFPB, SBEA, p.239-284.

Misra, P., Gupta, N., Toppo, D.D., Pandey, V., Mishra, M.K., Tuli, R. (2010). Establishment of long-term proliferating shoot cultures of elite *Jatropha curcas* L. by controlling endophytic bacterial contamination. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 100 (2):189-197.

- Monaco, L.C., Sondahl, M.R., Carvalho, A., Crocomo, O.J., Sharp, W.R. (1977). Applications of tissue culture in the improvement of coffee. *Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue, and organ culture*. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg. p. 109-129.
- Moraes, R. (2015). *Esterilização química e uso de hidrogel na micropropagação do abacaxizeiro 'Gold'*. Monografia (Bacharel em Agronomia) – Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, 50p.
- Naik, P.S., Sarkar, D. (2001). Sago: an alternative cheap gelling agent for potato *in vitro* culture. *Biologia Plantarum*, 44 (2):293-296.
- Norziah, M.H., Foo, S.L., Karim, A. (2006). Rheological studies on mixture of agar (*Gracilaria changii*) and k-carrageenan. *Food Hydrocolloids*, 20 (2):204-217, 2006.
- Oliveira, A.P., Silva, J.E.L., Pereira, W.E., Barbosa, L.J.N., Oliveira, A.N.P. (2006). Características produtivas da batata-doce em função de doses de P₂O₅, de espaçamentos e de sistemas de plantio. *Ciência e Agrotecnologia*, 30 (4):611-617.
- Oliveira, R.S., Pereira, M.R., Carvalho, V.S., Silva, J.R., Campostrini, E. (2015). Esterilização química e agentes geleificantes alternativos na propagação vegetativa *in vitro* do abacaxizeiro 'Vitória'. *Revista Brasileira Fruticultura*, 37 (4):819-826.
- Ögren, E., Öquist, G. (1985). Effects of drought on photosynthesis, chlorophyll fluorescence and photoinhibition susceptibility in intact willow leaves. *Planta*, 166 (3):380-388.
- Park, S.Y., Moon, H.K., Murthy, H.N., Kim, Y.W. (2011). Improved growth and acclimatization of somatic embryo-derived *Oplopanax elatus* plantlets by ventilated photoautotrophic culture. *Biologia Plantarum*, 55:559–562.

- Pereira, M.R., Carvalho, V.S., Lucas, E.D.F., Gravina, A.G. (2015). Amido de milho e hipoclorito de sódio no enraizamento *in vitro* do abacaxizeiro Vitória e seu efeito na aclimatização. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 37 (2):528-533.
- Pereira, W.J., Silva Filho, R.R., Pereira Junior, M.A., Batista, K.A., Di-Medeiros, M.C.B., Fernandes, K.F. (2013). Uso de goma de angico em substituição ao ágar em meio de cultura. *Revista de Biotecnologia & Ciência*. 2 (2): 1-11.
- Pereira-Netto, A.B., Meneguim, R.G., Biz, A., Silveira, J.L. (2012). A galactomannan-driven enhancement of the *in vitro* multiplication rate for the marubakaido apple rootstock (*Malus prunifolia* (Willd.) Borkh) Is not related to the degradation of the exogenous galactomannan. *Applied biochemistry and biotechnology*, 166 (1):197-207.
- Reis, F.D.O., Campostrini, E. (2008). Trocas gasosas e eficiência fotoquímica potencial em mamoeiro do grupo 'Formosa' cultivado em condição de campo. *Bragantia*, 67 (4):815-822.
- Rhein-Knudsen, N., Ale, M.T., Meyer, A.S. (2015). Seaweed hydrocolloid production: an update on enzyme assisted extraction and modification technologies. *Marine drugs*, 13 (6):3340-3359.
- Rós, A.B., Araújo, H.S., Narita, N. (2013). Uso de fertilizante de liberação lenta na produção de mudas de batata-doce em bandeja. *Semina: Ciências Agrárias*, 34 (6):2667-2674.
- Rousseau, C., Belin, E., Bove, E., Rousseau, D., Fabre, F., Berruyer, Guillaumès, J., Manceau, C., Jacques, M-A., Boureau, T. (2013). High throughput quantitative phenotyping of plant resistance using chlorophyll fluorescence image analysis. *Plant Methods*, 9 (1):17p.
- Saldanha, C.W., Otoni, C.G., Azevedo, J.L.F., Dias, L.L.C., Rêgo, M.M., Otoni, W.C. (2012). A low-cost alternative membrane system that promotes growth

in nodal cultures of Brazilian ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 110 (3):413-422.

Santos, C.M., Endres, L., Gomes, T.C.D.A., Jadoski, C.J., Nascimento, L.A., Santos, E.D. (2011). Atividade fotossintética em alface (*Lactuca sativa* L.) submetidas a diferentes compostagens de resíduos agroindustriais. *Revista Brasileira de Tecnologia Aplicada nas Ciências Agrárias*, 3 (3):95-102.

Santos, L.M.J., da Silva, E.C., Silva Junior, C.D. (2014). Análise preliminar das trocas gasosas, fluorescência de clorofila e potencial hídrico caulinar do juazeiro em uma região semi-árida de Sergipe, Brasil. *Scientia Plena*, 10 (2):1-10.

Saravanan, P., Raju, M.P., Alam, S. (2007). A study on synthesis and properties of Ag nanoparticles immobilized polyacrylamide hydrogel composites. *Materials Chemistry and Physics*, 103 (2):278-282.

Sigma Aldrich. Cotações e Pedidos. (2018). Disponível em <<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/search?term=%C3%A1gar&interface=All&N=0&mode=match%20partialmax&lang=pt®ion=BR&focus=product>> Acesso em jan/2018.

Silva, A.Z. (2013). *Sintomas de deficiências de macronutrientes em pimentão*. Tese (Doutorado em Agronomia) – Jaboticabal – SP, Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, 41 p.

Silva, F.G., Dutra, W.F., Dutra, A.F., Oliveira, I.M., Filgueiras, L., Melo, A.S. (2015). Trocas gasosas e fluorescência da clorofila em plantas de berinjela sob lâminas de irrigação. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental-Agriambi*, 19 (10):946-952.

Suassuna, J.F., Melo, A.S., Sousa, M.S.S., Costa, F.S., Fernandes, P.D., Pereira, V.M., Brito, M.E.B. (2010). Desenvolvimento e eficiência fotoquímica em

mudas de híbrido de maracujazeiro sob lâminas de água. *Bioscience Journal*, 26 (4):566-571.

Tsimilli-Michael, M., Strasser, R.J. (2008). *In vivo* assessment of stress impact on plant's vitality: applications in detecting and evaluating the beneficial role of mycorrhization on host plants. In: Varma A (Ed.) Mycorrhiza: State of the art, genetics and molecular biology, ecofunction, biotechnology, eco-physiology, structure and systematic. Berlim, *Springer*. p. 679-703.

Vidigal, T.M.A., Schuster, I., Texeira, L.R., Colauto, N.B. (2014). Regeneração de plantas a partir de dois tipos de explantes de milho submetidos à transformação genética por biobalística. *Ciência Rural*, 44 (10):1804-1809.

Wang, C., Zhang, L., Yuan, M., Ge, Y., Liu, Y., Fan, J., Ruan, Y., Cui, Z., Tong, S., Zhang, S. (2010). The microfilament cytoskeleton plays a vital role in salt and osmotic stress tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Biology*, 12 (1):70-78.

Willadino, L., Oliveira Filho, R.A., Silva Junior, E.A., Neto, A.G., Camara, T.R. (2011). Estresse salino em duas variedades de cana-de-açúcar: enzimas do sistema antioxidativo e fluorescência da clorofila. *Revista Ciência Agronômica*, 42 (2), 417-422.

Zanandrea, I., Nassi, F.L., Turchetto, A. C., Braga, E.J.B., Peters, J.A., Bacarin, M.A. (2006). Efeito da salinidade sob parâmetros de fluorescência em *Phaseolus vulgaris*. *Revista Brasileira de Agrociência*, 12 (2):157-161.

5. RESUMO E CONCLUSÃO

Estudos que investiguem as propriedades do hidrogel e seus efeitos sobre culturas agrícolas ainda são incipientes. No entanto, na última década muitas pesquisas têm voltado suas atenções para esse polímero que muito tem a contribuir para o avanço de áreas como agricultura, biotecnologia, biomedicina e fármacos.

Nessa pesquisa algumas características e propriedades foram estudadas e algumas respostas do hidrogel e das plantas cultivadas em hidrogel foram abordadas. Em comparação com o ágar, quanto a composição química, o hidrogel apresenta menores teores totais de micronutrientes, e com relação aos macronutrientes, apresenta maiores teores totais de N, K e S. O hidrogel apresenta teores elevados de K e Na solúveis quando comparado com o ágar e esses cátions criam um desequilíbrio osmótico nos meios de cultura contendo hidrogel.

O hidrogel apresenta poder de tamponamento que tende a manter o pH dos géis formados tanto em água desionizada quanto em sais de MS (Murashige e Skoog, 1962) em uma faixa entre 6,0 e 8,0, independente da concentração utilizada. Ao acidificar a água e a solução de sais de MS, percebe-se que os géis de hidrogel respondem a acidificação e tornam-se mais ácidos. Porém, ao submeter esses géis de hidrogel com solução de sais de MS acidificada ao processo de esterilização, estes têm seu pH elevado a faixa entre 7,0 e 9,0.

A acidificação acentuada dos sais de MS reduz o pH final do meio, porém, reduz o poder de intumescimento do hidrogel. Géis com concentrações mais baixas de hidrogel e solução de sais de MS muito ácida, ao serem submetidos à autoclavagem, alteram a textura e a coloração do meio de cultura, tornando-se pouco viscosos e amarelados. Quanto à condutividade elétrica, pode-se perceber que à medida que se aumenta a concentração de hidrogel no meio de cultura a condutividade elétrica também aumenta.

Com essas informações, foi possível definir um protocolo de preparo de meio de cultura utilizando o hidrogel, cuja concentração foi de 24 g L⁻¹ de hidrogel, pH da solução de sais de MS em 1,5 e o método de esterilização por meio da

autoclavagem por 15 minutos, desde que o hidrogel seja autoclavado em pó separadamente da solução de sais de MS.

Para o pimentão, na fase *in vitro*, o hidrogel não proporcionou condições iguais ou superiores ao ágar para o crescimento vegetativo e qualidade fisiológica de plantas de pimentão. O hidrogel com pH 1,5 proporcionou melhores resultados nos aspectos biométricos e fisiológicos quando comparado com o hidrogel com pH 5,8. Houve menor mortalidade de plantas quando cultivadas *in vitro* em meio de cultura contendo hidrogel e pH 1,5 comparadas às cultivadas em ágar e hidrogel com pH 5,8. Na fase de aclimatização, a sobrevivência foi a mesma entre as plantas cultivadas com ágar e as cultivadas com hidrogel e pH 1,5. As plantas cultivadas com hidrogel e pH 5,8 apresentaram baixa porcentagem de sobrevivência e as que sobreviveram não apresentaram crescimento vegetativo. Os melhores resultados biométricos foram obtidos de plantas cultivadas com hidrogel e pH 1,5.

Para batata-doce, os meios contendo hidrogel proporcionaram sobrevivência acima de 75% no cultivo *in vitro*, porém a sobrevivência das plantas cultivadas em ágar foi superior. O hidrogel não proporcionou condições iguais ou superiores ao ágar para o crescimento vegetativo e qualidade fisiológica de plantas de batata-doce. De forma geral, o hidrogel com pH 5,8 proporcionou melhores resultados quando comparado com o hidrogel com pH 1,5. Na fase de aclimatização, a maior sobrevivência foi verificada em plantas cultivadas em ágar. Apenas uma planta cultivada em meio contendo hidrogel-pH 5,8 sobreviveu. Nenhuma planta cultivada em hidrogel-pH 1,5 sobreviveu à fase de aclimatização.

Para *A. thaliana*, o meio contendo ágar apresentou a maior sobrevivência. De forma geral, o hidrogel com pH 5,8 proporcionou melhores resultados quando comparado com o hidrogel com pH 1,5.

Com o protocolo definido e aplicado nas espécies *C. annuum* var *annuum* L. (pimentão), *I. batatas* L. (batata-doce) e *A. thaliana*, pode-se perceber que ainda são necessários mais estudos e modificações no meio de cultura para que as espécies vegetais possam ser cultivadas *in vitro* em meios de cultura contendo o hidrogel. Apesar disso, entre os meios propostos tem-se que o ágar é o melhor meio de cultura, seguido do hidrogel-pH 1,5, pois permitiu sobrevivência de plantas na aclimatização, e por último o hidrogel-pH 5,8.

Conclui-se que a substituição do ágar pelo hidrogel em meios de cultura é dependente da espécie, tipo de explante e condições de cultivo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abe, S., Sado, A., Tanaka, K., Kisugi, T., Asami, K., Ota, S., Kim, H.I., Yoneyama, K., Xie, X., Ohnishi, T., Seto, Y., Yamaguchi, S., Akiyama, K., Yoneyama, K., Nomura, T. (2014). Carlactone is converted to carlactonoic acid by MAX1 in *Arabidopsis* and its methyl ester can directly interact with AtD14 *in vitro*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111 (50):18084-18089.
- Achard, P., Cheng, H., Grauwe, L., Decat, J., Schoutteten, H., Moritz, T., Van Der Straeten, D., Peng, J., Harberd, N.P. (2006). Integration of plant responses to environmentally activated phytohormonal signals. *Science*, 311 (5757): 91-94.
- Agriannual – *Anuário da Agricultura Brasileira*. (2017). Pimentão. São Paulo: FNP. 482p.
- Ahmed, E.M. (2015). Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review. *Journal of Advanced Research*, 6 (2):105-121.
- Aloufa, M.A.I. (2003). Enraizamento *in vitro* de plantas lenhosas: dificuldades e soluções. *Anais XIV Congresso Brasileiro de Floricultura e Plantas*

Ornamentais e Congresso Brasileiro de Cultura de Tecidos de Plantas. Universidade Federal de Lavras. p. 3-5.

Alvarez-Lorenzo, C., Concheiro, A. (2002). Reversible adsorption by a pH and temperature-sensitive acrylic hydrogel. *Journal of Controlled Release*, 80:247-257.

Aly, A.H., Debbab, A., Proksch, P. (2011). Fungal endophytes: unique plant inhabitants with great promises. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 90 (6):1829-1845.

Andrews, J. (1995). *Peppers: the domesticated Capsicums*. 4 ed. Austin: University of Texas Press. New Edition, p. 170.

Anuário Brasileiro de Hortaliças. (2016). Carvalho, C. et al. *Editora Gazeta Santa Cruz*, 64 p.

Aouada, F.A., Mattoso, L.H.C. (2009). Hidrogéis biodegradáveis: uma opção na aplicação como veículos carreadores de sistemas de liberação controlada de pesticidas. *Embrapa Instrumentação Agropecuária-Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento (INFOTECA-E)*, 32 p.

Aouada, F.A., Moura, M.R., Menezes, E.A., Nogueira, A.R.A., Mattoso, L.H.C. (2008). Síntese de hidrogéis e cinética de liberação de amônio e potássio. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 32 (4):1643-1649.

Ari, E., Yildirim, T., Mutlu, N., Büyükalaca, S., Gökmen, Ü., Akman, E. (2016). Comparison of different androgenesis protocols for doubled haploid plant production in ornamental pepper (*Capsicum annuum* L.). *Turkish Journal of Biology*, 40 (4):944-954.

Arnedo Andrés, M.S., Garcés Claver, A., Esteban Chapapria, J., Peiró Abril, J.L., Palazón, C., Luis Arteaga, M., Gil Ortega, R. (2004). Application of anther

culture and molecular markers to a pepper breeding program for diseases resistance. *Capsicum Eggplant Newsl*, 23:105-108.

Arrigoni-Blank, M.D.F., Tavares, F.F., Blank, A.F., Santos, M.C.D., Menezes, T.S.A., Santana, A.D.D.D. (2014). *In vitro* conservation of sweet potato genotypes. *The Scientific World Journal*, 2014:1-7.

Arvizu-Higuera, D.L., Rodríguez-Montesinos, Y.E., Murillo-Álvarez, J.I., Muñoz-Ochoa, M., Hernández-Carmona, G. (2008). Effect of alkali treatment time and extraction time on agar from *Gracilaria vermiculophylla*. *Journal of Applied Phycology*, 20 (5):515-519.

Azevedo, C.P., Café Filho, A.C., Henz, G.P., Reis, A. (2006). Recomendações de manejo da antracnose do pimentão e das pimentas. *Embrapa Hortaliças- Comunicado Técnico (INFOTECA-E)*, p. 4.

Azevedo, J.L. (1998). Microrganismos endofíticos. *Ecologia Microbiana*, 117-137p.

Babbar, S.B., Jain, N. (1998). 'Isugol' as an alternative gelling agent for plant tissue culture media. *Plant Cell Reports*, 17 (4):318-322.

Babbar, S.B., Jain, R. (2006). Xanthan gum: an economical partial substitute for agar in microbial culture media. *Current Microbiology*, 52 (4):287-292.

Bajpai, A.K., Giri, A. (2003). Water sorption behavior of highly swelling (carboxy methylcellulose-g-polyacrylamide) hydrogels and release of potassium nitrate as agrochemical. *Carbohydrate Polymers*, 53 (3):271–279.

Bandinelli, M.G., Bisognin, D.A., Gnocato, F.S., Mambrin, R.B., Sausen, D., Nicoloso, F.T. (2013). Concentração dos sais e da sacarose do meio MS na multiplicação *in vitro* e na aclimatização de batata. *Horticultura Brasileira*, 31 (2):242-247.

- Barbosa, R.R.N. (2016). *Cultivo in vitro de pimenta malagueta em frascos com ventilação natural: respostas mixotróficas e fotoautotróficas*. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF, 65 p.
- Bardajee, G.R.; Hooshyar, Z. (2014). One-pot synthesis of biocompatible superparamagnetic iron oxide nanoparticles/ hydrogel based on salep: Characterization and drug delivery. *Carbohydrate Polymers*, 101:741–751.
- Barrera, P. (1986). *Batata-doce: uma das doze mais importantes culturas do mundo*. São Paulo: Ícone. 91p.
- 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.
- Blat, S.F., Braz, L.T., Arruda, A.D.S. (2007). Avaliação de híbridos duplos de pimentão. *Horticultura Brasileira*, 25 (3):350-354.
- Bolado-Rodríguez, S., García-Sinovas, D. e Álvarez-Benedí, J. (2010). Application of pig slurry to soils. Effect of air stripping treatment on nitrogen and TOC leaching. *Journal of Environmental Management*, 91 (12):2594-2598.
- Borém, A., Vieira, M.L.C., Colli, W. (2005). *Glossário de biotecnologia*. Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal de Viçosa, 183 p.
- 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 sweetpotato for microsatellite analysis. *Scientia Agricola*, 66 (4):529-534.
- Bosland, P.W. (1996). *Capsicum: Innovative uses of an ancient crop*. Arlington, VA: ASHS Press, p. 479-487.

- Bosland, P.W., Votava, E.J. (2000). *Peppers: vegetable and spice Capsicums*. Wallingford: CAB International, 204 p.
- Bowman, D.C.; Evans, R.Y.; Paul, J.L. (1990). Fertilizer salts reduce hydration of polyacrylamide gels and affect physical properties of gel-amend container media. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 115 (3):382-386.
- Brady, S.M., Orlando, D.A., Lee, J.Y., Wang, J.Y., Koch, J., Dinneny, J.R., Mace, D., Ohler, U., Benfey, P.N. (2007). A high-resolution root spatiotemporal map reveals dominant expression patterns. *Science*. 318 (5851):801-806.
- Braga, F.T., Nunes, C.F., Favero, A.C., Pasqual, M., Carvalho, J.G. Castro, E.M. (2010). Características anatômicas de mudas de morangueiro micropropagadas com diferentes fontes de silício. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 44 (2):128-132.
- Brito, C.W.D.Q., Rodrigues, F.H., Fernandes, M.V.D.S., Silva, L.R., Ricardo, N.M., Feitosa, J.P. e Muniz, E.C. (2013). Síntese e caracterização de hidrogéis compósitos a partir de copolímeros acrilamida-acrilato e caulim: efeito da constituição de diferentes caulins do nordeste brasileiro. *Química Nova*, 36 (1):40-45.
- Büttow, M.V., Barbieri, R.L., Neitzke, R.S., Heiden. G., Carvalho, F.I.F. (2010). Diversidade genética entre acessos de pimentas e pimentões da Embrapa Clima Temperado. *Ciência Rural*, 40 (6):1.264-1.269.
- Caldas, L.S., Haridasan. P., Ferreira, M.E.A. (1998). Meios Nutritivos. *In: Torres. A. C., Caldas, L.S., Buso, J.A. Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília-DF: Serviço de produção de informação, p.87-132.
- Câmara, F.A., Grangeiro, L.C., Dombroski, J.L., Santos, M.A., Freitas, R. M., Freitas, F.C. (2013). Desempenho agrônômico de cultivares de batata-doce

- oriundas de ramas produzidas de forma convencional e *in vitro*. *Revista Brasileira de Ciências Agrárias*, 8 (3):370-374.
- Caovila, L.É., Gianini, P.F. e de Moraes, C.P. (2016). Concentração de sacarose e índices de pH no crescimento *in vitro* de *Oncidium flexuosum* Sims. (ORCHIDACEAE). *Revista em Agronegócio e Meio Ambiente*, 9 (3):531-545.
- Capuano, E., Fogliano, V. (2011). Acrylamide and 5-hydroxymethylfurfural (HMF): A review on metabolism, toxicity, occurrence in food and mitigation strategies. *LWT-Food Science and Technology*, 44 (4):793-810.
- Cardoso, D.L., Luz, L.N., Pereira, T.N.S. (2011). *Estratégias em melhoramento de plantas*. p.121-129.
- Carrer, H., Barbosa, A.L., Ramiro, D.A. (2010). Biotecnologia na agricultura. *Estudos avançados*, 24 (70):149-164.
- Carrizo, G.C., Sterpetti, M., Volpi, P., Ummarino, M., Saccardo, F. (2013). Wild Capsicums: identification and *in situ* analysis of Brazilian species. *XVth EUCARPIA Meeting on genetics and breeding of Capsicum and Eggplant*. p. 205-213.
- Carvalho, S.I.C., Bianchetti, L.B. (2008). Botânica e recursos genéticos. In: Ribeiro, C. S.C., Carvalho, S.I.C., Henz, G.P., Reifschneider, F.J.B. *Pimentas Capsicum*. Brasília, *Embrapa Hortaliças-Comunicado Técnico (INFOTECA-E)*, p. 39-53.
- Carvalho, S.I.C., Bianchetti, L.B., Bustamante, P.G., Silva, D.B. (2003). *Catálogo de germoplasma de pimentas e pimentões (Capsicum spp.) da Embrapa Hortaliças*. *Embrapa Hortaliças-Comunicado Técnico (INFOTECA-E)*, p 49.
- Casali, V.W.D., Couto, F.A.A. (1984). Origem e botânica de *Capsicum*. Informe Agropecuário, Brasília, 10 (113):8-10.

- Castro, L.M.D., Mourão Filho, F.D.A.A., Mendes, B.M.J., Miyata, L.Y. (2010). Embriogênese somática a partir de calos de cultivares de laranja doce. *Ciência Rural*, 40 (8):1831-1834.
- Cavalieri, F.L.B., Andreazzi, M.A., Colombo, A.H.B., Emanuelli, I.P., Moreski, D.A. B., Silva, W.M. (2015). Estudo sobre o cultivo *in vitro* de embriões bovinos durante o transporte. *Ars Veterinaria*, 31 (1):07-11.
- Cavalini, F.C., Lima, L.B., Oviedo, V.R.S (2004). *Triagem de mutantes hormonais: citocina e etileno*. Tese (Doutorado em Biologia) – Piracicaba – SP, Universidade de São Paulo – USP, 130p.
- Chagas, E.A., Barbosa, W., Pio, R., Dall’Orto, F.A.C., Tizato, L.H.G., Saito, A., Chagas, P.C. e Scarpate Filho, J.A. (2009). Germinação *in vitro* de grãos de pólen de *Prunus persica* (L.) Batsch *Vulgaris*. *Bioscience Journal*, 25 (5):8-14.
- Chan, A.W., Whitney, R.A., Neufeld, R.J. (2009). Semisynthesis of a controlled stimuli-responsive alginate hydrogel. *Biomacromolecules*, 10, 609.
- Chang, C., Zhang, L. (2011). Cellulose-based hydrogels: Present status and application prospects. *Carbohydrate Polymers*, 84 (1):40-53.
- Choi, J.M., Han, S.S., Kim, H.S. (2015). Industrial applications of enzyme biocatalysis: current status and future aspects. *Biotechnology Advances*, 33 (7):1443-1454.
- Cigdem, A.O., Khalid, M.K., Orhan, A. (2008). A comparison of the gelling of isubgol, agar and gelrite on *in vitro* shoot regeneration and rooting of variety Samsun of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). *Scientia Horticulturae*, 117 (2):174-181.
- Costa, C.S.R.; Henz, G.P. (2007). Pimenta (*Capsicum* spp.) – Sistemas de plantio. Disponível em:

<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Pimenta/Pimenta_capsicum_spp/index.html> Acesso em jan/2018.

Daros, M., Amaral JR., A.T., Pereira, T.N.S., Leal, N.R., Freitas, S.P., Sedyama, T. (2002). Caracterização morfológica de acessos de batata-doce. *Horticultura Brasileira*, 20:43-47.

Debrassi, A., Bürger, C., Rodrigues, C.A., Nedelko, N., S'lawska-Waniewska, A., Dłuzewski, P., Sobczak, K., Grenech, J-M. (2011). Synthesis, characterization and *in vitro* drug release of magnetic N-benzyl-O-carboxymethylchitosan nanoparticles loaded with indomethacin. *Acta Biomaterialia*, 7:3078–3085.

Desbrosses, G., Contesto, C., Varoquaux, F., Galland, M., Touraine, B. (2009). PGPR-Arabidopsis interactions is a useful system to study signaling pathways involved in plant developmental control. *Plant Signal*. 4:321-323.

Dias G.B., Gomes, V.M., Zottich, U., Ribeiro, S.F., Carvalho, A.O., Rodrigues, R., Fernandes, K., Valevski, S., Machado, O.L.T., Ferreira, A.T., Perales, J., Cunha, M.D. (2013). Isolation, characterization and antifungal activity of aroproteinase inhibitors from *Capsicum chinense* Jacq. seeds. *The Protein Journal*, 32:15-26.

EFSA – European Food Safety Authority (2015). Scientific opinion on acrylamide in food, *EFSA Journal*, 13 (6): 4104 p.

Embrapa (2007). *Pimenta (Capsicum spp.)*. Disponível em: <https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Pimenta/Pimenta_capsicum_spp/index.html> Acesso em: jan/2018.

Endo, M., Shimizu, H., Nohales, M.A., Araki, T., Kay, S.A. (2014). Tissue-specific clocks in *Arabidopsis* show asymmetric coupling. *Nature*, 515 (7527):419-422.

- Eschemback, V., Bernert, M.R., Suchoronczek, A., Jadoski, S.O., Lima, A.S. (2015). Characteristics of soil Salinity in agricultural crops in Brazil. *Applied Research & Agrotechnology*, 7 (3):115-124.
- Ezekiel, A. (2010). Low Cost Vegetative Propagation of Tropical Trees. *International Journal of Botany*, 6 (2):187-193.
- Fang, J.Y., Hsu, Y.R. (2012). Molecular identification and antibiotic control of endophytic bacterial contaminants from micropropagated *Aglaonema* cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 110 (1):53-62.
- FAO: Food and Agriculture Organization of the United Nations (2012). Disponível em <<http://www.feedipedia.org/node/745>>.
- Faria, R.T., Dalio, R.J. D., Unemoto, L.K., Silva, G.S. (2006). Propagação *in vitro* de *Oncidium baueri* Lindl. (Orchidaceae) sem uso de ágar. *Acta Scientiarum*, 28 (1):71-74.
- Faria, R.T., Santiago, D.C., Saridakis, D.P., Albino, U.B., Araújo, R. (2002). Preservation of the brazilian orchid *Cattleya walkeriana* Gardner using *in vitro* propagation. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 2 (3):489-492.
- Fatichi, S., Leuzinger, S., Körner, C. (2014). Moving beyond photosynthesis: from carbon source to sink-driven vegetation modeling. *New Phytologist*, 201 (4): 1086-1095.
- Fernandes, F.R. (2013). Limpeza clonal de batata-doce: produção de matrizes com elevada qualidade fitossanitária. *Embrapa Hortaliças-Comunicado Técnico (INFOTECA-E)*, p. 8.
- Ferreira, D.F. (2011). Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia*, 35 (6):1039-1042.

- Ferreira, D.M.O. (2015). *Extração de agar de algas vermelhas do género Gracilaria*. Dissertação (Mestrado em Processos Químicos e Biológicos) – Coimbra, Instituto Superior de Engenharia de Coimbra – ISEC, 91 p.
- Ferreira, I.M. (2016). Imobilização do fungo *Penicillium citrinum* CBMAI 1186 e lipase de *Pseudomonas fluorescens* em biopolímeros para aplicações em biocatálise. Tese (Doutorado em Ciências) – São Carlos – SP, Universidade de São Paulo – USP, 369p.
- Ferrie, A.M.R., Caswell, K.L. (2011). Isolated microspore culture techniques and recent progress for haploid and doubled haploid plant production. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 104 (3):301-309.
- Fialho, G.S., Dovale, J.C., Sobreira, F.M., Schmidt, E.R. (2011). Comportamento de plântulas de *Laelia tenebrosa* Rolfe (Orchidaceae), inoculadas *in vitro* sob diferentes substratos. *Idesia (Arica)*, 29 (1):103-105.
- Florêncio, I.M., Florentino, E.R., Silva, F.L.H., Fernandes, V.S., Cavalcanti, M.T. (2012). Estudo da extração de ágar da macroalga *Gracilaria caudata* J. Agardh para utilização em fins alimentícios. *Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável*, 7 (2):71-78.
- Flores, R., Stefanello, S., Franco, E., Mantovani, N. (1998). Regeneração *in vitro* de espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* Mart.). *Current Agricultural Science and Technology*, 4 (3):2001-2005.
- Flores, R., Uliana, S.C., Pimentel, N., Garlet, T.M.B. (2013). Sacarose e sorbitol na conservação *in vitro* de *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken (Amaranthaceae). *Journal of Biotechnology and Biodiversity*, 4 (3):192-199.
- Food Ingredients Brasil. Os alginatos e suas múltiplas aplicações. (2013). Disponível em <<http://www.revista-fi.com/materias/340.pdf>>. Acesso em jan/2018.

- Freitas, C., Carvalho, V., Nievola, C.C. (2015). Efeito de concentrações de sacarose sobre o crescimento in vitro e a aclimatização da bromélia nativa *Vriesea inflata* (Wawra) Wawra. *Biotemas*, 28 (3):37-42.
- Freitas, S.J., Carvalho, A.J.C., Berilli, S.S., Santos, P.C., Marinho, C.S. (2011). Substratos e Osmocote® na nutrição e desenvolvimento de mudas micropropagadas de abacaxizeiro cv. Vitória. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 33:672-679, Especial.
- Ganesan, M., Reddy, C.R.K. e Jha, B. (2015). Impact of cultivation on growth rate and agar content of *Gelidiella acerosa* (Gelidiales, Rhodophyta). *Algal Research*, 12, 398-404.
- García, A., Rhoden, S.A., Rubin Filho, C.J., Nakamura, C.V., Pamphile, J.A. (2012). Diversity of foliar endophytic fungi from the medicinal plant *Sapindus saponaria* L. and their localization by scanning electron microscopy. *Biological Research*, 45 (2):139-148.
- Garnica-Palafoxa, I.M., Sánchez-Arévalo, F.M. (2016). Influence of natural and synthetic crosslinking reagents on the structural and mechanical properties of chitosan-based hybrid hydrogels. *Carbohydrate Polymers*, 151:1073-1081.
- George, E.F., Hall, M.A., Klerk, G.J. (2008). The components of plant tissue culture media II: organic additions, osmotic and pH effects and support systems. In: George, E.F., Hall, M.A., Klerk, G.J. *Plant Propagation by Tissue Culture*. 3.ed. Netherland: Springer, 1, 501p.
- Gonsalves, A.A., Araújo, C.R.M., Soares, N.A., Goulart, M.O.F., Abreu, F.C. (2011). Diferentes estratégias para a reticulação de quitosana. *Química Nova*, 34 (7):1215-1223.
- Gui, R., Wan, A., Jin, H., Li, H., Zhou, C. (2013). Amphiphilic polymer-template synthesis and pH-triggered phase transfer of luminescent silver nanocrystals. *Materials Letters*, 96:20-23.

- Hartley, S.E., Gange, A.C. (2009). Impacts of plant symbiotic fungi on insect herbivores: mutualism in a multitrophic context. *Annual Review of Entomology*, 54, 323-342.
- Haug, 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 (7):1050-1060.
- Huala, E., Dickerman, A.W., Garcia-Hernandez, M., Weems, D., Reiser, L., LaFond, F., Hanley, D., Kiphart, D., Zhuang, M., Huang, W., Mueller, L.A., Bhattacharyya, D., Bhaya, D., Sobral, B.W., Beavis, W., Meinke, D.W., Town, C.D., Somerville, C., Rhee, S.Y. (2001). The *Arabidopsis* Information Resource (TAIR): a comprehensive database and web-based information retrieval, analysis, and visualization system for a model plant. *Nucleic Acids Research*, 29 (1):102-105.
- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. (2014). *Produção Agrícola Municipal (PAM)*. Sistema de Informações SIDRA, Rio de Janeiro.
- IEA – Instituto de Economia Agrícola. *Banco de Dados: Estatística de Produção Paulista*. (2018). Disponível em: <http://ciagri.iea.sp.gov.br/nia1/subjetiva.aspx?cod_sis=1&idioma=1> Acesso em jan/2018.
- International Potato Center. *Annual report 2008: sweetpotato as a health benefit*. Lima: CIP, 2008.
- Irikova, T., Grozeva, S., Rodeva, V. (2011). Anther culture in pepper (*Capsicum annuum* L.) *in vitro*. *Acta Physiologiae Plantarum*, 33 (5):1559-1570.

- Jain-Raina, R., Babbar, S.B. (2011). Evaluation of blends of alternative gelling agents with agar and development of xanthagar, a gelling mix, suitable for plant tissue culture media. *Asian Journal of Biotechnology*, 3 (2):153-164.
- Jarro. (2010). Agar ou agar-agar, o mais antigo ficocoloide. *Aditivos & Ingredientes*.
- Jo, E.A., Tewari, R.K., Hahn, E.J., Paek, K.Y. (2009). *In vitro* sucrose concentration affects growth and acclimatization of *Alocasia amazonica* plantlets. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 96 (3):307-315.
- Jones, A. (1967). Should Nishiyama's K123 (*Ipomoea trifida*) be designated *I. batatas*? *Economic Botany*, 21 (2): 163-166.
- Keck, R.W., Boyer, J.S. (1974). Chloroplast response to low leaf water potentials: III. Differing inhibition of electron transport and photophosphorylation. *Plant Physiology*, 53 (3):474-479.
- Khan, F., Tare, R.S., Oreffo, R., Bradley, M. (2009). Versatile biocompatible polymer hydrogels: scaffolds for cell growth. *Angewandte Chemie International Edition*, 48 (5):978-982.
- Khoury, C.K., Heider, B., Castaneda-Alvarez, N.P., Achicanoy, H.A., Sosa, C.C., Miller, R.E., Scotland, R.W., Wood, J.R., Rossel, G., Eserman, L.A., Jarret, R.L., Yencho, G.C., Bernau, V., Juarez, H., Sotelo, S., de Haan, S., Struik, P.C. (2015). Distributions, *ex situ* conservation priorities, and genetic resource potential of crop wild relatives of sweetpotato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam., I. series Batatas]. *Frontiers in Plant Science*, 6:251.
- Kim, M., Park, E.J., An, D., Lee, Y. (2013). High-quality embryo production and plant regeneration using a two-step culture system in isolated microspore cultures of hot pepper (*Capsicum annuum* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 112 (2):191-201.

- Kono, H., Fujita, S. (2012). Biodegradable superabsorbent hydrogels derived from cellulose by esterification crosslinking with 1,2,3,4-butanetetracarboxylic dianhydride. *Carbohydrate Polymers*, 87:2582-2588.
- Kozai, T. (2010). Photoautotrophic micropropagation-environmental control for promoting photosynthesis. *Propagation of Ornamental Plants*, 10 (4):188-204.
- Krämer, U. (2015). Planting molecular functions in an ecological context with *Arabidopsis thaliana*. *eLife*, 4:1-13.
- Kumar, V., Fotedar, R. (2009). Agar extraction process for *Gracilaria cliftonii*. *Carbohydrate Polymers*, 78 (4):813-819.
- Lantos, C., Juhász, A.G., Somogyi, G., Ötvös, K., Vági, P., Mihály, R., Kristóf, Z., Somogyi, N., Pauk, J. (2009). Improvement of isolated microspore culture of pepper (*Capsicum annuum* L.) via co-culture with ovary tissues of pepper or wheat. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 97 (3):285-293.
- Lantos, C., Juhász, A.G., Vági, P., Mihály, R., Kristóf, Z., Pauk, J. (2012). Androgenesis induction in microspore culture of sweet pepper (*Capsicum annuum* L.). *Plant Biotechnology Reports*, 6 (2):123-132.
- Leonardo, M., Broetto, F., Boas, R.L.V., Marchese, J.A., Tonin, F.B., Magali, R. (2008). Estado nutricional e componentes da produção de plantas de pimentão conduzidas em sistema de fertirrigação durante indução de estresse salino em cultivo protegido. *Bragantia*, 67 (4):882-889.
- Li, X., Xu, S., Pen, Y., Wang, J. (2008). The swelling behaviors and network parameters of cationic starch-g-acrylic acid/poly(dimethyldiallylammonium chloride) semi-interpenetrating polymer networks hydrogels. *Journal of Applied Polymer Science*, 110, 1828.

- Loebenstein, G. (2009). Origin, distribution and economic importance. *In*: Loebenstein, G., Thottappilly, G. editors. *The Sweet Potato*. p.9-12.
- Lopes, J.L.W., Silva, M.R., Cury Saad, J.C.C., Angélico, T.S. (2010). Uso de hidrogel na sobrevivência de mudas de *Eucalyptus urograndis* produzidas com diferentes substratos e manejos hídricos. *Ciência Florestal*, 20 (2):217-224.
- Lucyszyn, N., Quoirin, M., Anjos, A., Sierakowski, M.R. (2005). Blends of agar/galactomannan for Marubakaido apple Rootstock shoot proliferation. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, 15 (2):133-137.
- Lucyszyn, N., Quoirin, M., Homma, M.M., Sierakowski, M.R. (2007). Agar/galactomannan gels applied to shoot regeneration from tobacco leaves. *Biologia Plantarum*, 51 (1):173-176.
- Marinho-Soriano, E., Bourret, E. (2005). Polysaccharides from the red seaweed *Gracilaria dura* (Gracilariales, Rhodophyta). *Bioresource Technology*, 96 (3): 379-382.
- Marouelli, W.A., Silva, L. (2012). Irrigação na cultura do pimentão. *Embrapa Hortaliças-Circular Técnica (INFOTECA-E)*. 20p.
- Marques, D.J., Broetto, F., Silva, E.C., Carvalho, J.G. (2011). Dinâmica de cátions na raiz e folhas de berinjela cultivada sobre doses crescentes de potássio oriundas de duas fontes. *Idesia (Arica)*, 29 (2):69-77.
- Marques, P.A.A., Bastos, R.O. (2010). Uso de diferentes doses de hidrogel para produção de mudas de pimentão. *Pesquisa Aplicada & Agrotecnologia*. 3 (2):53-64.
- Marques, T.A., Rampazo, É.M., Marques, P.A.A. (2013). Oxidative enzymes activity in sugarcane juice as a function of the planting system. *Food Science and Technology*, 33 (1):146-150.

- Martins, K.C., Pereira, T.N.S., Souza, S.A.M., Costa, F.R. (2010). Meiose e viabilidade polínica em acessos de *Capsicum annuum* e *Capsicum baccatum*. *Ciência Rural (online)*, 40:1746-1751.
- Matalanis, A., McClements, D.J. (2013). Hydrogel microspheres for encapsulation of lipophilic components: Optimization of fabrication and performance. *Food Hydrocolloids*, 31:15-25.
- Medeiros, J.F., Gheyi, H.R. (1997). *Manejo do sistema solo-água-plantas em solos afetados por sais*. In: Gheyi, H.R., Queiroz, J.E., Medeiros, J.F. (Eds.). *Manejo e controle da salinidade na agricultura irrigada*. Campina Grande: UFPB, SBEA, p.239-284.
- Meinke, D.W., Cherry, J.M., Dean, C., Rounsley, S.D., Koornneef, M. (1998). *Arabidopsis thaliana*: A model plant for genome analysis. *Science*, 282 (5389):662-682.
- Misra, P., Gupta, N., Toppo, D.D., Pandey, V., Mishra, M.K., Tuli, R. (2010). Establishment of long-term proliferating shoot cultures of elite *Jatropha curcas* L. by controlling endophytic bacterial contamination. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 100 (2):189-197.
- Mitchell-Olds, T., Schmitt, J. (2006). Genetic mechanisms and evolutionary significance of natural variation in *Arabidopsis*. *Nature*, 441:947–952.
- Monaco, L.C., Sondahl, M.R., Carvalho, A., Crocomo, O.J., Sharp, W.R. (1977). Applications of tissue culture in the improvement of coffee. *Applied and Fundamental Aspects of Plant Cell, Tissue, and Organ Culture*. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg. p. 109-129.
- Moraes, R. (2015). *Esterilização química e uso de hidrogel na micropropagação do abacaxizeiro 'Gold'*. Monografia (Bacharel em Agronomia) – Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, 50p.

- Moscone, E.A., Escaldaferro, M.A., Gabrielle, M., Cecchini, N.M., García, Y.S., Jarret, R., Daviña J.R.; Ducasse, D.A., Barboza, G.E., Ehrendorfer, F. (2007). The evolution of the chili pepper (*Capsicum* – Solanaceae): a cytogenetic perspective. *Acta Horticulturae*, 745 (1):137-169.
- Moulin, M.M., Rodrigues, R., Gonçalves, L.S.A., Sudré, C.P., Gonzaga, M.P. (2012). A comparison of RAPD and ISSR markers reveals genetic diversity among sweet potato landraces (*Ipomoea batatas* (L.) Lam). *Acta Scientiarum*. 34: 139-147.
- Moulin, M.M.; Bento, C.S., Júnior, A.C.S.; Rodrigues, R. (2014). Caracterização de acessos de batata-doce baseado em características morfológicas. *Perspectiva online: Ciências Biológicas & Saúde*, 4 (13).
- Murashige, T., Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15:473-497.
- Naik, P.S., Sarkar, D. (2001). Sago: an alternative cheap gelling agent for potato *in vitro* culture. *Biologia Plantarum*, 44 (2):293-296.
- Navroski, M.C., Araújo, M.M., Cunha, F.S., Berghetti, Á.L.P., Pereira, M.O. (2016). Redução da adubação e melhoria das características do substrato com o uso do hidrogel na produção de mudas de *Eucalyptus dunnii* Maiden. *Ciência Florestal*, 26 (4):1155-1165.
- Nogueira, P.V., Silva, D.F., Pio, R., Silva, P.A.O., Bisi, R.B., Balbi, R.V. (2015). Germinação de pólen e aplicação de ácido bórico em botões florais de nespereiras. *Bragantia*, 74 (1): 9-15.
- Norziah, M.H., Foo, S.L., Karim, A. (2006). Rheological studies on mixture of agar (*Gracilaria changii*) and k-carrageenan. *Food Hydrocolloids*, 20 (2):204-217, 2006.

- Nowaczyk, L., Nowaczyk, P., Olszewska, D. (2015b). Genetic analysis of anther culture-derived diploids of *Capsicum* spp. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 90 (6):747-752.
- Nowaczyk, L., Nowaczyk, P., Olszewska, D., Niklas-Nowak, A. (2015a). Effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid pretreatment of *Capsicum* spp. donor plants on the anther culture efficiency of lines selected by capsaicinoid content. *BioTechnologia. Journal of Biotechnology Computational Biology and Bionanotechnology*, 96 (2): 179-183.
- Ögren, E., Öquist, G. (1985). Effects of drought on photosynthesis, chlorophyll fluorescence and photoinhibition susceptibility in intact willow leaves. *Planta*, 166 (3):380-388.
- Oliveira, A.P., Silva, J.E.L., Pereira, W.E., Barbosa, L.J.N., Oliveira, A.N.P. (2006). Características produtivas da batata-doce em função de doses de P_2O_5 , de espaçamentos e de sistemas de plantio. *Ciência e Agrotecnologia*, 30 (4):611-617.
- Oliveira, R.S., Eller, C.B., Bittencourt, P.R.L., Mulligan, M. (2014). The hydroclimatic and ecophysiological basis of cloud forest distributions under current and projected climates. *Annals of Botany*, 113 (6):909–920.
- Oliveira, R.S., Pereira, M.R., Carvalho, V.S., Silva, J.R., Campostrini, E. (2015). Esterilização química e agentes geleificantes alternativos na propagação vegetativa *in vitro* do abacaxizeiro 'Vitória'. *Revista Brasileira Fruticultura*, 37 (4):819-826.
- Page, D., Grossniklaus, U. (2002). The art and design of genetic screens: *Arabidopsis thaliana*. *Nature Reviews Genetics*, 3:124-136.
- Park, S.Y., Moon, H.K., Murthy, H.N., Kim, Y.W. (2011). Improved growth and acclimatization of somatic embryo-derived *Oplopanax elatus* plantlets by ventilated photoautotrophic culture. *Biologia Plantarum*, 55:559–562.

- Parra-Vega, V., Renau-Morata, B., Sifres, A., Seguí-Simarro, J.M. (2013). Stress treatments and *in vitro* culture conditions influence microspore embryogenesis and growth of callus from anther walls of sweet pepper (*Capsicum annuum* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 112 (3):353-360.
- Patel, H., Krishnamurthy, R. (2013). Elicitors in plant tissue culture. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 2 (2):60-65.
- Pereira, M.R., Carvalho, V.S., Lucas, E.D.F., Gravina, A.G. (2015). Amido de milho e hipoclorito de sódio no enraizamento *in vitro* do abacaxizeiro Vitória e seu efeito na aclimatização. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 37 (2):528-533.
- Pereira, W.J., Silva Filho, R.R., Pereira Junior, M.A., Batista, K.A., Di-Medeiros, M.C.B. e Fernandes, K.F. (2013). Uso de goma de angico em substituição ao ágar em meio de cultura. *Revista de Biotecnologia & Ciência*. 2 (2):1-11.
- Pereira-Netto, A.B., Meneguín, R.G., Biz, A., Silveira, J.L. (2012). A galactomannan-driven enhancement of the *in vitro* multiplication rate for the marubakaido apple rootstock (*Malus prunifolia* (Willd.) Borkh) Is not related to the degradation of the exogenous galactomannan. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 166 (1):197-207.
- Praiboon, J., Chirapart, A., Akakabe, Y., Bhumibhamon, O. e Kajiwara, T. (2006). Physical and chemical characterization of agar polysaccharides extracted from the Thai and Japanese species of *Gracilaria*. *Science Asia*, 32 (1):11-17.
- Pugliese, A., O'Callaghan, Y., Tundis, R., Galvin, K., Menichini, F., O'Brien, N., Loizzo, M.R. (2014). *In vitro* investigation of the bioaccessibility of carotenoids from raw, frozen and boiled red chili peppers (*Capsicum annuum*). *European Journal of Nutrition*, 53 (2):501-510.

- Rêgo, E.R., Finger, F.L., Rêgo, M.M. (2012). Consumption of pepper in Brazil and its implications on nutrition and health of humans and animals. *In: Salazar, M.A., Ortega, J.M. Pepper: nutrition, consumption and health*. New York. Nova Science Publishers, 1:159-170.
- Rêgo, E.R., Rêgo, M.M., Cruz, C.D., Cecon, P.R., Amaral, D.S.S.L., Finger, F.L. (2003). Genetic diversity analysis of peppers: a comparison of discarding variable methods. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 3 (1):19-26.
- Reifschneider, F.J.B. (2000). *Capsicum. Pimentas e pimentões no Brasil. Embrapa Hortaliças-Comunicado Técnico (INFOTECA-E)*, 113p.
- Reifschneider, F.J.B., Nass, L.L., Henz, G.P. (2015). *Uma pitada de biodiversidade na mesa dos brasileiros*. 1. ed. Brasília, 156p.
- Reis, F.D.O., Campostrini, E. (2008). Trocas gasosas e eficiência fotoquímica potencial em mamoeiro do grupo 'Formosa' cultivado em condição de campo. *Bragantia*, 67 (4):815-822.
- Rhein-Knudsen, N., Ale, M.T., Meyer, A.S. (2015). Seaweed hydrocolloid production: an update on enzyme assisted extraction and modification technologies. *Marine Drugs*, 13 (6):3340-3359.
- Ribeiro, C.S.C.; Reifschneider, F.J.B. Genética e melhoramento. *In: Ribeiro, C.S.C.; Carvalho, S.I.C.; Henz, G.P.; Reifschneider, F.J.B. (2008). Pimentas Capsicum. Embrapa Hortaliças-Comunicado Técnico (INFOTECA-E)*, 55-70.
- Rós, A.B., Araújo, H.S., Narita, N. (2013). Uso de fertilizante de liberação lenta na produção de mudas de batata-doce em bandeja. *Semina: Ciências Agrárias*, 34 (6):2667-2674.
- Rosén, J., Hellenäs, K. E. (2002). Analysis of acrylamide in cooked foods by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Analyst*, 127 (7):880-882.

- Roullier, C., Duputié, A., Wennekes, P., Benoit, L., Bringas, V.M.F., Rossel, G., Tay, D., McKey, D. e Lebot, V. (2013). Disentangling the origins of cultivated sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.). *PLoS One*, 8 (5):1-12, e62707.
- Rousseau, C., Belin, E., Bove, E., Rousseau, D., Fabre, F., Berruyer, Guillaumès, J., Manceau, C., Jacques, M-A., Boureau, T. (2013). High throughput quantitative phenotyping of plant resistance using chlorophyll fluorescence image analysis. *Plant Methods*, 9 (1):17p.
- Saldanha, C.W., Otoni, C.G., Azevedo, J.L.F., Dias, L.L.C., Rêgo, M.M., Otoni, W.C. (2012). A low-cost alternative membrane system that promotes growth in nodal cultures of Brazilian ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 110 (3):413-422.
- Santos, C.M., Endres, L., Gomes, T.C.D.A., Jadoski, C.J., Nascimento, L.A., Santos, E.D. (2011). Atividade fotossintética em alface (*Lactuca sativa* L.) submetidas a diferentes compostagens de resíduos agroindustriais. *Revista Brasileira de Tecnologia Aplicada nas Ciências Agrárias*, 3 (3):95-102.
- Santos, L.M.J., da Silva, E.C., Silva Junior, C.D. (2014). Análise preliminar das trocas gasosas, fluorescência de clorofila e potencial hídrico caulinar do juazeiro em uma região semi-árida de Sergipe, Brasil. *Scientia Plena*, 10 (2):1-10.
- Santos, R., Barros, A.A.G., Graça, D.C.S., Cardoso, G. (2016). Obtenção e avaliação de nutriente de nitrogênio em plantio de quiabeiro (*Abelmoschus esculentus* L Maench). *Revista Técnico-Científica do CREA-PR*, 1-9.
- Saravanan, P., Raju, M.P., Alam, S. (2007). A study on synthesis and properties of Ag nanoparticles immobilized polyacrylamide hydrogel composites. *Materials Chemistry and Physics*, 103 (2):278-282.
- Senanayake, S.A., Ranaweera, K.K.D.S., Gunaratne, A., Bamunuarachchi, A. (2013). Comparative analysis of nutritional quality of five different cultivars of

- sweet potatoes (*Ipomea batatas* (L) Lam) in Sri Lanka. *Food Science & Nutrition*, 1 (4):284-291.
- Shekhar, S., Mishra, D., Buragohain, A.K., Chakraborty, S., Chakraborty, N. (2015). Comparative analysis of phytochemicals and nutrient availability in two contrasting cultivars of sweet potato (*Ipomoea batatas* L.). *Food Chemistry*, 173: 957-965.
- Sigma Aldrich*. Cotações e Pedidos. (2018). Disponível em <<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/search?term=%C3%A1gar&interface=All&N=0&mode=match%20partialmax&lang=pt®ion=BR&focus=product>> Acesso em jan/2018.
- Silva, A.K.A., Richard, C., Bessodes, M., Scherman, D., Merten, O. W. (2009). Growth factor delivery approaches in hydrogels. *Biomacromolecules*, 10 (1):9-18.
- Silva, A.Z. (2013). *Sintomas de deficiências de macronutrientes em pimentão*. Tese (Doutorado em Agronomia) – Jaboticabal – SP, Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, 41 p.
- Silva, F.G., Dutra, W.F., Dutra, A.F., Oliveira, I.M., Filgueiras, L., Melo, A.S. (2015). Trocas gasosas e fluorescência da clorofila em plantas de berinjela sob lâminas de irrigação. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental-Agriambi*, 19 (10):946-952.
- Silva, J.B.C., Lopes, C.A., Magalhães, J.S. (2008). *Batata-doce (Ipomoea batatas)* Embrapa Hortaliças-Comunicado Técnico (INFOTECA-E). Disponível em: <https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Batata-doce/Batata-doce_Ipomoea_batatas/apresentacao.html>. Acesso jan/2017.
- Sreekanta, S., Bethke, G., Hatsugai, N., Tsuda, K., Thao, A., Wang, L., Katagiri, F., Glazebrook, J. (2015). The receptor-like cytoplasmic kinase PCRK1

contributes to pattern-triggered immunity against *Pseudomonas syringae* in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist*, 207 (1):78-90.

Srinivasan, K. (2016). Biological activities of red pepper (*Capsicum annuum*) and its pungent principle capsaicin: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56 (9):1488-1500.

Suassuna, J.F., Melo, A.S., Sousa, M.S.S., Costa, F.S., Fernandes, P.D., Pereira, V.M., Brito, M.E.B. (2010). Desenvolvimento e eficiência fotoquímica em mudas de híbrido de maracujazeiro sob lâminas de água. *Bioscience Journal*, 26 (4):566-571.

Sudré, C.P., Gonçalves, L.S.A., Rodrigues, R., Amaral Júnior, A.T., Riva-Souza, E.M., Bento, C.D.S. (2010). Genetic variability in domesticated *Capsicum* spp. as assessed by morphological and agronomic data in mixer statistical analysis. *Genetics and Molecular Research*, 9 (1):283-294.

Tavakol, M., Vasheghani-Farahani, E., Mohammadifar, M.A., Soleimani, M., Hashemi-Najafabadi, S. (2016). Synthesis and characterization of an *in situ* forming hydrogel using tyramine conjugated high methoxyl gum tragacanth. *Journal of Biomaterials Applications*, 30 (7):1016-1025.

Teixeira, S.L., Ribeiro, J.M., Teixeira, M.T. (2006). Influence of NaClO on nutrient medium sterilization and on pineapple (*Ananas comosus* cv Smooth cayenne) behavior. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 86 (3):375-378.

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 (1): 79-82.

Todorova, V., Grozeva, S., Rodeva, V., Masheva, S. (2013). Breeding evaluation of pepper lines obtained by *in vitro* anther culture. *Genetika*, 45 (2):601-610.

- Trivedi, M.K., Branton, A., Trivedi, D., Nayak, G., Bairwa, K. e Jana, S. (2015). Physical, thermal, and spectroscopic characterization of biofield energy treated murashige and skoog plant cell culture media. *Cell Biology*, 3 (4):50-57.
- Tsimilli-Michael, M., Strasser, R.J. (2008). *In vivo* assessment of stress impact on plant's vitality: applications in detecting and evaluating the beneficial role of mycorrhization on host plants. In: Varma A (Ed.) Mycorrhiza: State of the art, genetics and molecular biology, ecofunction, biotechnology, eco-physiology, structure and systematic. Berlim, *Springer*. p. 679-703.
- Ullah, F., Othman, M.B.H., Javed, F., Ahmad, Z., Akil, H.M.D. (2015). Classification, processing and application of hydrogels: A review. *Materials Science and Engineering: C*, 57:414-433.
- Verma, P., Rastogi, R.K., Ramakumar, K.L. (2007). Determination of trace amounts of nitrogen in uranium based samples by ion chromatography (IC) without Kjeldahl distillation. *Analytica Chimica Acta*, 596 (2):281-284.
- Vettorazzi, R.G. (2016). *Caracterização, estabelecimento in vitro e criopreservação de variedades locais de batata-doce (Ipomoea batatas L. Lam)*. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF, 83 p.
- Vettorazzi, R.G., Carvalho, V.S., Sudré, C.P., Rodrigues, R. (2017). Developing an *in vitro* optimized protocol to sweet potato landraces conservation. *Acta Scientiarum. Agronomy*, 39 (3):359-367.
- Vidigal, T.M.A., Schuster, I., Texeira, L.R., Colauto, N.B. (2014). Regeneração de plantas a partir de dois tipos de explantes de milho submetidos à transformação genética por biobalística. *Ciência Rural*, 44 (10):1804-1809.

- Villanueva, R.D., Sousa, A.M.M., Gonçalves, M.P., Nilsson, M., Hilliou, L. (2010). Production and properties of agar from the invasive marine alga, *Gracilaria vermiculophylla* (Gracilariales, Rhodophyta). *Journal of Applied Phycology*, 22 (2):211-220.
- Viñals, F.N., Ortega, R.G., Garcia, J.C. (1996). El cultivo de pimientos, chiles y ajíes. Madrid: Mundi-Prensa, p 607.
- Walter, R. (2015). *Resgate de embriões zigóticos de espécies do gênero Capsicum visando à sua utilização em programas de melhoramento genético*. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF, 55p.
- Walter, R., Carvalho, V.S., Generoso, A.L., Rodrigues, R., Gravina, G.A. (2018). Cultivation of immature *Capsicum* spp. embryos for incompatible-crossing embryo rescuing. *Acta Scientiarum-Agronomy*, Prelo.
- Wang, C., Zhang, L., Yuan, M., Ge, Y., Liu, Y., Fan, J., Ruan, Y., Cui, Z., Tong, S., Zhang, S. (2010). The microfilament cytoskeleton plays a vital role in salt and osmotic stress tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Biology*, 12 (1):70-78.
- Wang, J., Han, Y. (2011). Tuning the stop bands of inverse opal hydrogels with double network structure by controlling the solvent and pH. *Journal of Colloid and Interface Science*, 353:498-505.
- Wenzl, T., Lachenmeier, D.W., Gökmen, V. (2007). Analysis of heat-induced contaminants (acrylamide, chloropropanols and furan) in carbohydrate-rich food. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 389 (1):119-137.
- Willadino, L., Oliveira Filho, R.A., Silva Junior, E.A., Neto, A.G., Camara, T.R. (2011). Estresse salino em duas variedades de cana-de-açúcar: enzimas do sistema antioxidativo e fluorescência da clorofila. *Revista Ciência Agronômica*, 42 (2):417-422.

- Winzenburg, G., Schmidt, C., Fuchs, S., Kissel, T. (2004). Biodegradable polymers and their potential use in parenteral veterinary drug delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 56 (10):1453-1466.
- Wu, Y., Geng, F., Chang, P. R., Yu, J. e Ma, X. (2009). Effect of agar on the microstructure and performance of potato starch film. *Carbohydrate Polymers*, 76 (2):299-304.
- Xião, Y., Niu, G., Kozai, T. (2011). Development and application of photoautotrophic micropropagation plant system. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 105 (2):149-158.
- Yonezawa, U.G., de Moura, M.R., Aouada, F.A. (2017). Estado da arte: um estudo sobre polímeros biodegradáveis na germinação e desenvolvimento de plantas. *Caderno de Ciências Agrárias*, 9 (2):69-78.
- Yoshimura, C.Y. (2006). *Avaliação do potencial de cultivo e produção de ágar de Gracilaria domingensis e de Gracilaria caudata (Rhodophyta, Gracilariales) na Enseada de Armação do Itapocoroy*. Tese (Doutorado em Botânica) – São Paulo – SP, Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, 161p.
- Yousefi, M.K., Islami, H.R., Filizadeh, Y. (2013). Effect of extraction process on agar properties of *Gracilaria corticata* (Rhodophyta) collected from the Persian Gulf. *Phycologia*, 52 (6):481-487.
- Yu, S., Wu, G., Gu, X., Wang, J., Wang, Y., Gao, H., Ma, J. (2013). Magnetic and pH-sensitive nanoparticles for antitumor drug delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 103:15-22.
- Zanandrea, I., Nassi, F.L., Turchetto, A. C., Braga, E.J.B., Peters, J.A., Bacarin, M.A. (2006). Efeito da salinidade sob parâmetros de fluorescência em *Phaseolus vulgaris*. *Revista Brasileira de Agrociência*, 12 (2):157-161.

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*. p. 325-358.

Zhao, Q., Sun, J., Lin, Y., Zhou, Q. (2010). Study of the properties of hydrolized polyacrylamide hydrogels with various pore structures and pH-sensitivities. *Reactive & Funcional Polymers*, 70:602-609.