
MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DE CULTIVARES DE BATATA EM MEIOS DE CULTURA LÍQUIDO

Jonny Everson Scherwinski Pereira¹; Gerson Renan de Luces Fortes²

¹Embrapa Acre, C. Postal 321, 69908-970, Rio Branco - AC. E-mail: jonny@cpafac.embrapa.br.

²Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, C. Postal 02372, 70770-900, Brasília, DF.

RESUMO

O objetivo do trabalho foi avaliar o comportamento *in vitro* de cinco cultivares de batata em três diferentes meios de cultura de multiplicação de consistência líquida. Explantes das cultivares Baronesa, Cristal, Eliza, Macaca e Pérola, com 0,8 a 1,0 cm de comprimento e uma gema axilar, foram cultivados em três diferentes meios de cultura de consistência líquida, assim constituídos: MS, formado pelo meio básico de MS; M2, formado pelos sais de MS, acrescido de 30 g.L⁻¹ de sacarose, 2,0 mg.L⁻¹ do ácido pantotênico, 0,4 mg.L⁻¹ de tiamina e os reguladores de crescimento ácido naftalenoacético (ANA) (0,01 mg.L⁻¹) e ácido giberélico (AG₃) (0,25 mg.L⁻¹) e M2M, formado pelos sais de MS na concentração plena, 0,25 mg.L⁻¹ de AG₃, 5,0 mg.L⁻¹ de ácido pantotênico, 1,0 mg.L⁻¹ de tiamina e 20 g.L⁻¹ de sacarose. A cultivar Macaca teve a maior taxa de multiplicação e crescimento *in vitro*, enquanto a 'Cristal' foi a que apresentou o menor desempenho para estes parâmetros. Independentemente da cultivar, os melhores resultados foram observados quando as cultivares foram cultivadas no meio de cultura M2M.

Palavras-chaves: *Solanum tuberosum*, micropropagação, meio líquido, propagação clonal.

ABSTRACT

The purpose of this work was to evaluate the *in vitro* behavior of five potato cultivars in three different liquid culture media. Potato explants of Baronesa, Cristal, Eliza, Macaca and Pérola cultivars ranging from 0.8 to 1.0 cm length and one axillary bud, were cultivated in three different liquid culture media: MS, was accomplished by MS salts and vitamins. M2, formed by MS salts, added with sucrose (30g L⁻¹), panthotenic acid (2.0 mg L⁻¹), thiamine (0.4 mg L⁻¹), NAA (0.01 mg L⁻¹) and GA₃ (0.25 mg L⁻¹). The M2M medium was formed by the MS salts added with GA₃, (0.25 mg L⁻¹) panthotenic acid (5.0 mg L⁻¹), thiamine (1.0 mg L⁻¹) and sucrose (20 g L⁻¹). The Macaca cultivar had the highest multiplication rate and growth, while 'Cristal' cv. was the one presenting the lowest scores for these parameters. Regardless the cultivar the best results were observed when the explants were cultivated in M2M culture medium.

Keywords: *Solanum tuberosum*, micropropagation, liquid medium, clonal propagation.

Por estar diretamente relacionada à produtividade e qualidade dos tubérculos produzidos, a utilização de sementes de alto padrão fitossanitário é fundamental para a exploração comercial de batata, merecendo atenção especial por parte dos produtores. A degenerescência devido ao efeito cumulativo de viroses na produção, traz a necessidade de se buscar novas técnicas que permitam o aumento da taxa de multiplicação, em curto espaço de tempo, de materiais comprovadamente livres de patógenos (Assis, 1999; Lopes & Reifschneider, 1999; Pereira *et al.*, 2001; Pereira & Fortes, 2004a, b).

Rotineiramente, a técnica de micropropagação vem sendo aplicada para este fim e representa uma das formas mais viáveis de se propagar plantas de batata isentas de doenças, especialmente viroses. Na etapa de multiplicação, a capacidade dos explantes sobreviverem, desenvolverem e se multiplicarem é consequência de vários fatores, pois a cultura de tecidos, como técnica de propagação vegetativa, necessita ser adaptada às necessidades das espécies e cultivares por estas diferirem geneticamente entre si, podendo apresentarem resultados diferentes sob as mesmas condições de cultivo. Além disso, o uso de meios de cultura apropriados constitui-se condição básica, pois é ele que vai proporcionar os nutrientes necessários para o crescimento e diferenciação dos tecidos (Ziv, 1995; Kozay *et al.*, 1997).

Outro fator a ser considerado é o estado físico dos meios de cultura. A maioria dos trabalhos com batata *in vitro*, baseia-se no uso de meios de cultura semi-sólidos (Ávila *et al.*, 1994; Pereira *et al.*, 2000). Entretanto, a utilização de meios de cultura de consistência líquida podem proporcionar igual ou até maior eficiência na multiplicação *in vitro*, pela facilidade da preparação e manipulação, redução dos custos pela eliminação do ágar e possibilidade de utilizar menor quantidade de meio de cultura para o cultivo dos explantes (Pereira & Fortes, 2000; Fortes & Pereira, 2003; Pereira & Fortes, 2003). Por estas vantagens, têm sido observado um crescente aumento em se ajustar protocolos visando o cultivo em meio líquido (Levin *et al.*, 1997; Escalona *et al.*, 1999; Feuser *et al.*, 2001)

Para a batata, Pereira & Fortes (2000; 2004b) verificaram que para algumas cultivares, o meio líquido mostrou-se mais eficiente quando comparado ao meio semi-sólido, sugerindo ser um importante fator a ser observado em trabalhos futuros de multiplicação *in vitro* desta espécie.

O objetivo do trabalho foi avaliar o comportamento *in vitro* de cinco cultivares de batata em três diferentes meios de cultura de consistência líquida.

MATERIAL E MÉTODOS

Utilizou-se material propagativo de batata (*Solanum tuberosum* L.) que se encontrava sob multiplicação em meio de cultura formado pelos sais e vitaminas de MS (Murashige & Skoog, 1962) e que estava acondicionado em sala de crescimento a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo de 16 horas e radiação de $35\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

Explantes de batata das cultivares Baronesa, Cristal, Eliza, Macaca e Pérola, com tamanho aproximado de 0,8 a 1,0 cm e uma gema axilar, foram cultivados em três diferentes meios de cultura de consistência líquida, assim constituídos: M2, formado pelos sais de MS, acrescido de $30\ \text{g}\ \text{L}^{-1}$ de sacarose, $2,0\ \text{mg}\ \text{L}^{-1}$ do ácido pantotênico, $0,4\ \text{mg}\ \text{L}^{-1}$ de tiamina e os reguladores de crescimento ácido naftalenoacético (ANA) ($0,01\ \text{mg}\ \text{L}^{-1}$) e ácido giberélico (AG_3) ($0,25\ \text{mg}\ \text{L}^{-1}$) (Chandra, 1991); M2M, formado pelos sais de MS na concentração plena, adicionado de $0,25\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de AG_3 , $5,0\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de ácido pantotênico, $1,0\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de tiamina e $20\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de sacarose (Pereira & Fortes, 2003); e, o meio básico de MS, rotineiramente utilizado em trabalhos de multiplicação da batata.

O experimento seguiu um esquema fatorial 3×5 , totalizando 15 tratamentos. O delineamento experimental utilizado foi o de blocos casualizados. Cada tratamento foi repetido quatro vezes, sendo cada parcela formada por 10 explantes.

Utilizaram-se frascos Erlenmeyers de 250 mL com 15 mL de meio líquido, os quais foram mantidos sob agitação contínua, em mesa agitadora do tipo orbital (80 a 90 rpm). Os cultivos foram mantidos em sala de crescimento a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo de 16 horas e radiação luminosa de $35\ \mu\text{mol}\ \text{m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$, fornecida por lâmpadas fluorescentes (Sylvania, 40w) brancas frias.

Os dados foram coletados após 21 dias de cultivo dos explantes. As variáveis avaliadas foram: altura de brotação (porção compreendida entre a região do colo e a inserção da última folha) e taxa de multiplicação do material vegetal (contagem do número de gemas formadas no final do período de cultivo, excluindo-se a apical). Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade. Os dados referentes à taxa de multiplicação (x) foram transformados segundo $\sqrt{x+0,5}$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tanto para a altura de brotações quanto para a taxa de multiplicação do material vegetal não foi verificada interação significativa entre cultivares x meio de cultura (Tabela 1). Entre os genótipos testados, a cultivar Macaca foi a que apresentou os melhores resultados para a variável altura de brotações, independentemente do meio de cultura onde foi cultivada. A cultivar Cristal, apresentou o menor crescimento em meio líquido, com brotações medindo, em média, 3,6 cm. A taxa de multiplicação foi significativamente maior na cultivar Macaca (8,6:1) e menor na Cristal (6,4:1). As outras cultivares testadas não apresentaram diferenças significativas entre si quanto a esta variável (Figura 1A e C).

Quando se avaliou a altura de brotações em razão do tipo de meio de cultura utilizado, verificou-se que, independentemente dos genótipos testados, os melhores resultados foram obtidos quando o material foi cultivado nos meios M2M e M2. Entretanto, para taxa de multiplicação resultados superiores foram obtidos quando os genótipos se desenvolveram no meio M2M (Figura 1B e D).

Estes resultados confirmaram a hipótese de que a composição do meio de cultura constitui-se como fator importante para a melhoria nos resultados, principalmente em relação a taxa de multiplicação do material vegetal. França (2000), trabalhando com meio de cultura MS de consistência semi-sólida e com as cultivares Baronesa, Macaca e Cristal, obteve taxa de multiplicação média de 5,5:1, portanto, inferior às médias obtidas neste trabalho com meio líquido.

TABELA 1. Análise da variação para altura de brotações e taxa de multiplicação de cultivares de batata em função de diferente meios de multiplicação de consistência líquida.

Causas da variação	GL	Quadrado Médio	
		Altura de brotações	Taxa de multiplicação
Cultivar (A)	4	13,133**	0,257**
Meio de cultura (B)	2	6,533**	0,549**
Blocos (C)	3		
A x B	8	0,313 ^{ns}	0,006 ^{ns}
Resíduo	42	0,195	0,013
C.V. (%)		8,2	3,9

** - significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

^{ns} – não significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.

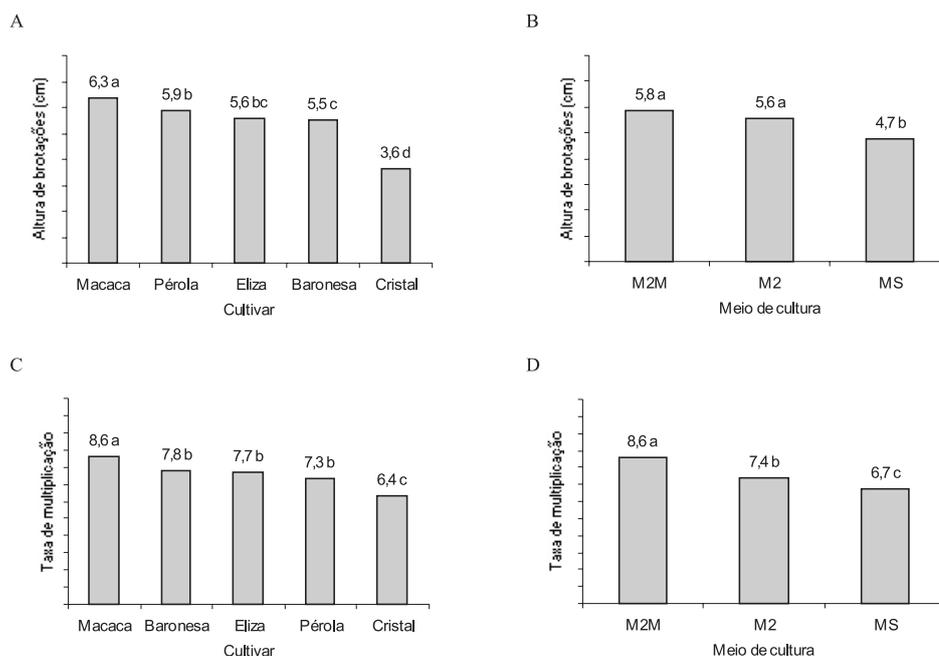


Figura 1. Altura de brotações (A, B) e taxa de multiplicação (C, D) de batata em meio de cultura de consistência líquida em razão da cultivar e do meio de cultura, após 21 dias de cultivo.

LITERATURA CITADA

ASSIS, M. Novas tecnologias na propagação de batata. *Informe Agropecuário*, Belo Horizonte, v.20, n.197, p.30-33, 1999.

ÁVILA, A.; PEREYRA, L.S.M.; COLLINO, D.J.; ARGÜELLO, J.A. Effects of nitrogen source on growth and morphogenesis of three micropropagated potato cultivars. *Potato Research*, Wageningen, v. 37, p.161-168, 1994.

CHANDRA, R. Problems in *in vitro* conservation of potato germplasm at CPRI, Shimla. *Journal of Indian Potato Association*, New Deli, v.18, n.3-4, p.162-166, 1991.

ESCALONA, M; LORENZO, J.C.; GONZÁLEZ, B.; DAQUINTA, M.; GONZÁLEZ, J.L.; DESJARDINS, Y.; BORROTO, C.G. Pineapple (*Ananas comosus* L. Merr) micropropagation in temporary immersion systems. *Plant Cell Reports*, New York, v.18, p.743-748, 1999.

FEUSER, S.; NODARI, R.O.; GUERRA, M.P. Eficiência comparativa dos sistemas de cultura estacionária e imersão temporária para a micropropagação do abacaxi. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, v.23, n.1, p.06-10, 2001.

FORTES, G.R.L.; PEREIRA, J.E.S. Batata-semente Pré-básica: Cultura de Tecidos. In: PEREIRA, A.S.; DANIELS, J. (Eds.). *O cultivo da batata na região sul do Brasil*. Brasília: Embrapa, DF : Embrapa Informação Tecnológica, 2003. p.421-433.

FRANÇA, R.B. *Aspectos bioquímicos de cultivares de batata (Solanum tuberosum L.) multiplicadas in vitro sob diferentes concentrações de sacarose e crescimento em casa de vegetação*. 2000. 50 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2000.

KOZAY, T.; KUBOTA, C.; JEONG, B.R. Environmental control for the large-scale production of plants through *in vitro* techniques. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Dordrecht, v.51, p.49-56, 1997.

-
- LEVIN, R.; ALPER, Y.; STAV, R.; WATAD, A. Methods and apparatus for liquid media and semi-automated micropropagation. *Acta Horticulturae*, Wageningen, v.447, 659-663, 1997.
- LOPES, C.A.; REIFSCHNEIDER, F.J.B. Manejo integrado das doenças da batata. *Informe Agropecuário*, Belo Horizonte, v.20, n.197, p.56-60, 1999.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v.15, p.473-497, 1962.
- PEREIRA, J. E. S.; FORTES, G. R. L. Multipliation *in vitro* de la papa em meio sólido y líquido: influencia de diferentes medios de cultura. *Horticultura Argentina*, v. 19, n.46, p.24, 2000.
- PEREIRA, J. E. S.; FORTES, G. R. L.; SILVEIRA, A.O. Influência do número de gemas e da posição de inoculação dos explantes sobre a multiplicação *in vitro* da batata. *Horticultura Brasileira*, v.18, suplemento, p.179-180, 2000.
- PEREIRA, J.E.S.; MEDEIROS, C.A.B.; FORTES, G.R.L.; PEREIRA, A.S.; DANIELS, J. Avaliação de dois sistemas hidropônicos na produção de material pré-básico de batata. *Horticultura Brasileira*, Brasília, v.19, suplemento CD-Rom, 2001.
- PEREIRA, J. E. S.; FORTES, G. R. L. Protocolo para a produção de material propagativo de batata em meio líquido. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.38, n.9, p.1035-1043, 2003.
- PEREIRA, J. E. S.; FORTES, G. R. L. Produção de mudas pré-básicas de batata por estaquia a partir de plantas micropropagadas. *Horticultura Brasileira*, Brasília, v.22, n.2, p.185-191, 2004a.
- PEREIRA, J. E. S.; FORTES, G. R. L. Organogênese de ápices meristemáticos de batata em meios de isolamento e multiplicação *in vitro*. *Horticultura Brasileira*, Brasília, v.22, n.2, p.196-200, 2004b.
- ZIV, M. The control of bioreactor environment for plant propagation in liquid culture. *Acta Horticulturae*, Wageningen, v.393, 25-38, 1995.