

Batata-semente Pré-básica: Cultura de Tecidos

*Gerson Renan de Luces Fortes
Jonny Everson Scherwinski Pereira*

A batata é uma hortaliça que se propaga, em geral, vegetativamente, por meio de tubérculos-semente. Entretanto, neste processo de propagação, o material está sujeito a infecções por patógenos como fungos, bactérias e, principalmente, vírus que a cada ciclo vegetativo são transmitidos para a próxima geração, contribuindo para o processo de degenerescência da cultura. Por estarem diretamente relacionadas com a produtividade e a qualidade dos tubérculos produzidos e por constituírem-se componente mais alto do custo de produção, é de grande importância a utilização de sementes de alta qualidade genética e fitossanitária para compor a lavoura. Se por um lado o controle de fungos e bactérias pode ser feito por meio de produtos químicos, o mesmo não acontece com as viroses, pelo fato de elas estarem intimamente associadas à célula hospedeira. Na prática, há duas formas de obter material propagativo livre de viroses: pelo cultivo das sementes verdadeiras ou botânicas, visto que as viroses, em sua maioria, não são transmitidas pelas sementes, ou pelo isolamento de ápices caulinares (meristemas) – pressupostamente livres do patógeno – e seu cultivo em meio de cultura artificial e sob condições controladas em laboratório (Bonin, 1988; Marani & Pisi, 1977; Resende & Paiva, 1985).

Na maioria dos países produtores, incluindo o Brasil, o uso de sementes verdadeiras para a multiplicação da batata tem importância apenas para trabalhos de melhoramento da espécie, devido, principalmente, à variabilidade que este tipo de material pode introduzir na cultura (heterozigose), como também aos problemas relacionados com a falta de tecnologia de produção a partir deste tipo de material propagativo. Já a cultura de meristemas é a técnica mais comumente utilizada para a obtenção ou a recuperação de plantas livres de vírus. A técnica baseia-se na premissa de que a distribuição do

patógeno não é uniforme na planta infectada e, portanto, o uso destes tecidos forneceria material livre do patógeno para ser multiplicado sob condições artificiais e controladas.

Embora seja considerada rotina na produção de plantas saudáveis, nas últimas décadas, a técnica de cultivar tecidos de batata sob condições *in vitro* tem sido utilizada para outras finalidades, tais como: tuberização *in vitro* (Tovar et al., 1985), preservação de germoplasmas (Fortes & Pereira, 2001) e para o melhoramento genético da espécie (Hussey & Stacey, 1984; Karp et al., 1989). Entretanto, é importante ressaltar que a aplicação da cultura de tecidos em diferentes áreas de interesse está condicionada a vários fatores que devem ser controlados de maneira adequada durante o processo, pois cada espécie ou cultivar difere geneticamente entre si e pode responder de forma diferente, mesmo sob idênticas condições de cultivo.

A cultura de tecidos para a obtenção de plantas livres de vírus

A cultura de tecidos de plantas, também denominada micropropagação ou cultivo *in vitro*, consiste em cultivar assepticamente células, tecidos ou fragmentos de órgãos de uma determinada planta em meio de cultura artificial, sob ambiente controlado visando ao desenvolvimento de novas plantas. O método baseia-se na totipotência celular, ou seja, na capacidade que cada célula possui de formar ou produzir uma nova planta por meio da diferenciação celular, visto que toda célula contém as informações genéticas capazes de produzir um novo indivíduo.

O cultivo *in vitro* de batata para obter plantas saudáveis livres de vírus compreende, basicamente, quatro fases distintas (Fig. 1): preparativa, de estabelecimento ou início de cultivo, de multiplicação e de aclimatização. O êxito ou o fracasso na obtenção de plantas de alta qualidade fitossanitária no final do processo depende de diversos fatores que devem ser controlados adequadamente em cada etapa.

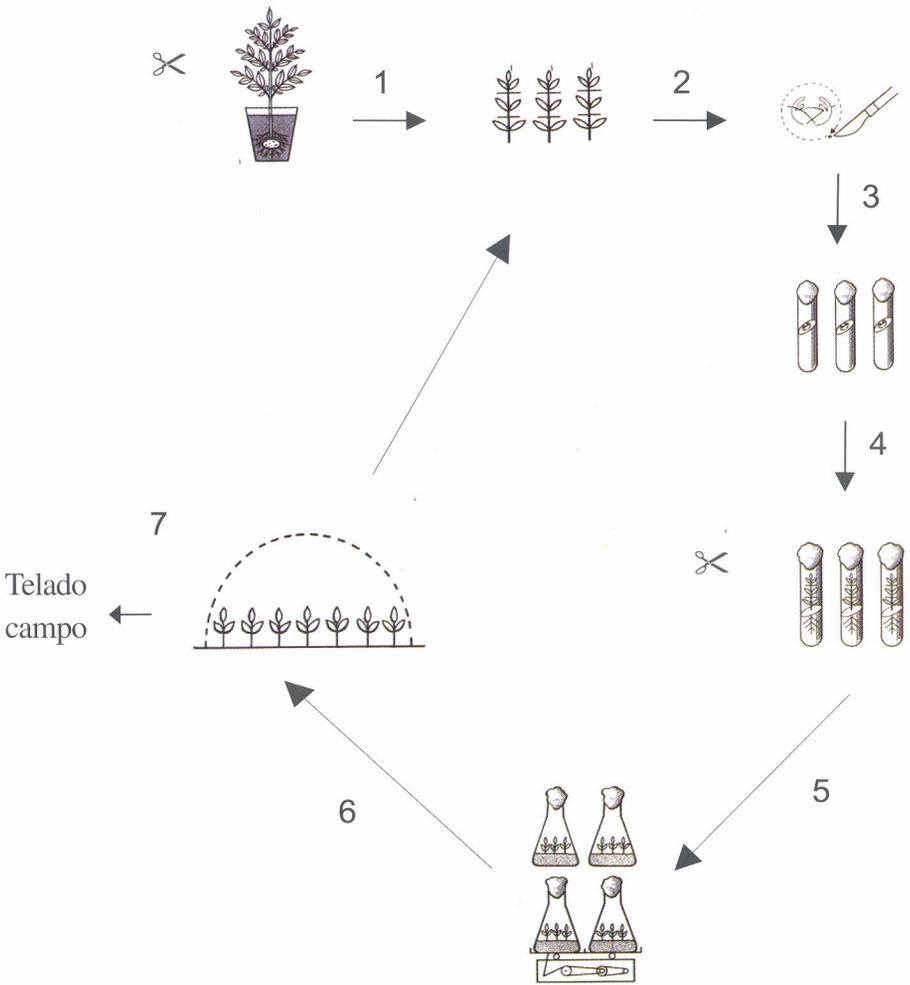


Fig. 1. Etapas da obtenção de batata livre de vírus a partir do cultivo in vitro de meristemas: 1. obtenção de brotações apicais em casa de vegetação, divisão em porções menores e desinfestação superficial; 2. isolamento dos meristemas; 3. meristemas em meio de cultura para diferenciação; 4. meristemas desenvolvidos (40 a 60 dias); testes para detecção de viroses; 5. multiplicação e enraizamento em meio de cultura de consistência líquida ou semi-sólida; 6. aclimatização; 7. casa de vegetação/ telado/ campo (produção de tubérculos pré-básicos e básicos)/ retorno para o início do processo.

Fase preparativa

O processo de micropropagação da batata tem início com a escolha e o cultivo das plantas matrizes que fornecerão os propágulos (explantes) para o estabelecimento e a propagação *in vitro*. Aspectos como condições de cultivo e estado nutricional das plantas, assim como manejo dos explantes, são importantes nesta fase.

Uma importante medida a ser observada durante o cultivo das matrizes refere-se às condições fitossanitárias das plantas. Estas condições poderão influenciar decisivamente a etapa posterior de estabelecimento, no que diz respeito à ocorrência de contaminações causadas sobretudo por fungos e bactérias. O crescimento e o cultivo das plantas matrizes em condições protegidas, como em casa de vegetação ou câmara de crescimento, é uma importante medida a ser tomada. A coleta de materiais diretamente no campo não é recomendada, pois, devido às intempéries e à maior ocorrência de microorganismos nestas condições, a dificuldade no estabelecimento pode ser maior. Se houver a necessidade de coleta de material fora de um ambiente protegido, deve-se fazer um tratamento químico antes nas plantas matrizes, com o propósito de diminuir os riscos de contaminação no momento do estabelecimento *in vitro* dos explantes. Para isso, recomenda-se o tratamento com fungicidas e bactericidas sistêmicos como benomyl e sulfato de estreptomicina, aliados à cobertura das plantas ou hastes com sacos plásticos ou de papel impermeável, alguns dias antes da coleta das brotações, para evitar o contato direto com o meio ambiente.

A época de coleta das brotações e o estágio de crescimento das plantas matrizes também podem influenciar decisivamente no estabelecimento do material *in vitro*. Brotações jovens coletadas em períodos de intenso crescimento das plantas apresentam maiores chances de serem livres de infecção, pois a mobilidade dos patógenos endógenos na planta pode não acompanhar a velocidade de crescimento das brotações. Além disso, em brotações mais velhas, pode ocorrer maior síntese de compostos fenólicos que intoxicam os tecidos levando-os à oxidação e, com isso, à diminuição na sobrevivência sob condições *in vitro*. De maneira geral, juntamente com as contaminações, a oxidação dos tecidos é um dos maiores problemas no estabelecimento *in vitro* dos cultivos.

Rotineiramente, em casa de vegetação, os tubérculos são plantados em recipientes ou vasos contendo substrato esterilizado (autoclavado ou fumigado), onde permanecem até as plantas atingirem um tamanho aproximado de 10 a 15 cm (20 a 30 dias). Neste momento, brotações apicais de 5 a 10 cm de comprimento são coletadas, desprovidas de suas folhas – que poderão ser fonte de inóculo – e envoltas em papel toalha umedecido com água, visando diminuir a desidratação do material. As brotações coletadas e devidamente identificadas são então levadas ao laboratório onde sofrem o processo de assepsia (desinfestação superficial). Em consequência da coleta das brotações apicais nas plantas matrizes, ocorre o desenvolvimento das gemas laterais que geram uma nova fonte de explantes após um período de 15 a 30 dias da coleta inicial.

Fase de estabelecimento

Uma das etapas mais importantes no processo de estabelecimento do material vegetal refere-se ao padrão de assepsia dos explantes. É a partir desta fase que todo o processo de micropropagação é realizado sob condições assépticas em câmara de fluxo laminar.

Após a coleta do material vegetal, no laboratório, com o auxílio de tesoura ou bisturi, as brotações de batata colhidas são cortadas em tamanhos menores, normalmente com uma gema. Em câmara de fluxo laminar previamente desinfestada com álcool etílico (70%) e/ou luz ultravioleta, inicia-se o processo de assepsia do material. Embora diversos produtos desinfestantes possam ser utilizados nesta fase, o uso de álcool etílico (70%) e de produtos a base de cloro, como o hipoclorito de sódio ou de cálcio, é o mais comum devido, principalmente, à menor toxidez aos tecidos e pela facilidade de serem encontrados no mercado. O tempo de exposição dos explantes, assim como a concentração a ser utilizada dependem do material em questão. Por se tratar de material herbáceo, em batata, o tempo recomendado de exposição das brotações ao álcool etílico (70%) é de, aproximadamente, 15 segundos, seguido de 15 minutos em solução de hipoclorito de sódio a 1%, acrescida de algumas gotas de Tween-20 ou

detergente (0,01%) para quebrar a tensão superficial da solução e melhorar o contato desta com os tecidos da planta. Um tempo maior de exposição ou o uso de concentrações mais elevadas de produto pode ocasionar a “queima” dos explantes e aumentar a possibilidade de oxidação dos tecidos *in vitro*, inviabilizando o desenvolvimento dos explantes. Para a retirada do excesso de produto, as brotações são lavadas em água destilada e esterilizada por, pelo menos, três vezes. A partir desse momento, promove-se, imediatamente, a retirada dos meristemas presentes no interior das gemas vegetativas apicais ou axilares, com o auxílio de lupa binocular, pinça, bisturi e estilete flambado, antes e depois da excisão de cada explante. Uma vez isolados, os tecidos são rapidamente transferidos para o meio de cultura de isolamento para evitar sua possível desidratação (Fig. 2).

Embora em teoria qualquer tipo de explante possa ser utilizado na propagação *in vitro* de uma planta, particularmente para a obtenção ou recuperação de plantas livres de vírus e de outros patógenos sistêmicos, devem ser usados explantes com maior proporção de tecido meristemático. Os tecidos



Foto: Arquivo da Embrapa Clima Temperado

Fig. 2. Colocação de meristema *in vitro*.

meristemáticos – pontos de crescimento ativo das plantas – são compostos por células pequenas e ainda não diferenciadas que estão em constante multiplicação. Desta forma, partículas virais ou outros patógenos que podem estar presentes no sistema vascular da planta só chegam à região meristemática pelo movimento de célula a célula. Como a multiplicação das células meristemáticas é rápida e constante, há grande possibilidade de se obter material livre de patógenos sistêmicos com o isolamento e o cultivo destes tecidos.

Se por um lado o uso de explantes meristemáticos pequenos (0,1 a 0,3 mm) aumenta as chances de conseguir plantas livres de vírus no final do processo, explantes muito pequenos apresentam dificuldades de sobreviver e de se desenvolver *in vitro*. Explantes maiores (superiores a 1,0 mm) normalmente crescem bem em meio de cultura, embora apresentem pouco sucesso na erradicação de viroses. Por esta razão, dificilmente se cultiva apenas tecido meristemático, sendo os tecidos isolados, em geral, acompanhados por um ou dois primórdios foliares subjacentes ao meristema. A este conjunto isolado (tecido meristemático e primórdios foliares) dá-se o nome de ápice meristemático (Fig. 3).



Foto: Arquivo da Embrapa Clima Temperado

Fig. 3. Explante *in vitro* com alguns dias de desenvolvimento.

Fase de multiplicação

As brotações surgidas a partir do desenvolvimento dos ápices meristemáticos (40 a 60 dias) (Fig. 4 e 5) são divididas em segmentos caulinares, contendo, pelo menos, uma gema axilar, e transferidas para meio de multiplicação, no qual, após quatro semanas, formam-se novas plântulas que podem ser novamente subcultivadas para a obtenção de material propagativo (Fig. 6). Nesta etapa, inúmeros subcultivos podem ocorrer até se atingir o número desejado de plântulas que, por serem multiplicadas vegetativamente por meio de tecido somático, garantem a obtenção de indivíduos com idêntica composição genética da planta matriz (clone).

Embora a batata não seja tão problemática quanto outras culturas sob condições *in vitro*, como o morangueiro e a bananeira, não se deve fazer um número muito elevado de subcultivos na batateira a partir do mesmo material vegetal. Podem ocorrer alterações fenotípicas (epigenéticas) nas plantas, avaliadas apenas no final do processo, em casa de vegetação ou telado. Por isso, sugere-se que o material vegetal seja renovado, pelo menos, uma vez por ano com novos isolamentos.



Foto: Jonny S. Pereira

Fig. 4. Plântula de batata *in vitro*.



Foto: Arquivo da Embrapa Clima Temperado

Fig. 5. Plântula de batata in vitro.



Foto: Arquivo da Embrapa Clima Temperado

Fig. 6. Multiplicação in vitro de plântulas de batata.

Se, teoricamente, o cultivo de meristemas pode proporcionar plantas saudáveis, seu cultivo não pode ser garantia de plantas livres de vírus. É imperativo que testes sorológicos específicos – como o de ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) – sejam realizados no material isolado para autenticar a sanidade do material vegetal. Por isso, é importante que cada ápice meristemático isolado e desenvolvido seja caracterizado como um clone, portando um número de identificação, e que ele seja testado, antes da multiplicação em larga escala, para comprovar sua sanidade.

Meios de cultura

A habilidade de os explantes sobreviverem, de se desenvolverem e se multiplicarem sob condições *in vitro*, a partir de porções meristemáticas, é consequência de amplo número de fatores entre os quais destacam-se: a diferença varietal, o estado fisiológico e concentrações endógenas de hormônios de crescimento dos explantes, condições de cultivo, entre outros. Além disso, a escolha de um meio de cultura apropriado para cada fase de cultivo é condição básica, devendo estes meios proporcionar os nutrientes necessários ao metabolismo das células vegetais em cultivo para o crescimento e a diferenciação das brotações e das raízes.

Não existe uma formulação padrão que possa ser usada de forma irrestrita no cultivo de diferentes espécies, incluindo a batata. A quase totalidade dos meios nutritivos utilizados é formada por água, sais inorgânicos (macro e micronutrientes), uma fonte de carbono e energia (sacarose), vitaminas e substâncias reguladoras do crescimento. Entre os diferentes meios minerais possíveis de serem utilizados, o desenvolvido por Murashige & Skoog (1962), é o que tem apresentado os melhores resultados, não somente na fase de estabelecimento, mas também na de multiplicação da batata.

A complementação do meio mineral com substâncias reguladoras do crescimento depende de alguns fatores, como: concentrações endógenas nos tecidos, do tamanho do explante e da fase de crescimento do cultivo. A fase de estabelecimento da batata requer, normalmente, meios de cultura suplementados com auxinas, citocininas e ácido giberélico para a

diferenciação e o crescimento de células e tecidos. Na fase de multiplicação do material vegetal, a presença destes reguladores no meio de cultura nem sempre é necessária.

Se a maioria dos trabalhos de multiplicação da batata baseia-se no uso de meios de cultura semi-sólidos, a utilização de meios de cultura de consistência líquida sob agitação (Fig. 7) tem proporcionado taxas de multiplicação do material vegetal superiores, quando comparada à utilização dos meios semi-sólidos (Pereira & Fortes, 2000). Além disso, a facilidade na preparação e na manipulação dos meios e a redução dos custos pela eliminação do ágar e pela menor quantidade de meio de cultura utilizado tem aumentado o interesse dos pesquisadores em trabalhar com este tipo de meio. Particularmente no Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Clima Temperado, são buscados, com eficiência, protocolos para o estabelecimento e a multiplicação da batata em meios de consistência líquida.

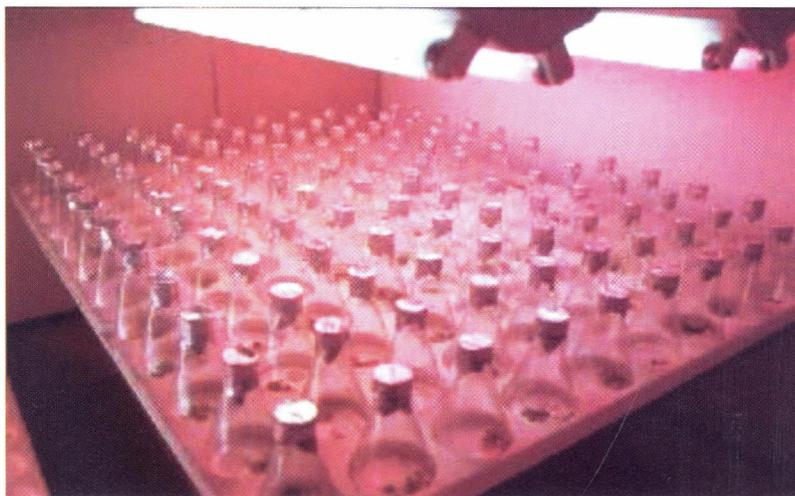


Foto: Arquivo da Embrapa Clima Temperado

Fig. 7. Multiplicação em meio líquido de plântulas de batata.

Fase de aclimatização

A etapa da aclimatização compreende a transferência das plântulas das condições assépticas da cultura de tecidos para um ambiente externo, normalmente casa de vegetação, para seu crescimento e desenvolvimento. Este processo deve ser feito cuidadosamente, ou um número significativo de plantas não sobreviverá. Durante o crescimento *in vitro*, as plantas se desenvolvem sob condições controladas e totalmente artificiais (temperatura $25 \pm 2^\circ\text{C}$; radiação luminosa em torno de $30 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$; fotoperíodo de 16 horas). Quando sofrem o processo de aclimatização ficam sujeitas a forte estresse ambiental que pode matá-las. Além da baixa atividade fotossintética, as plantas produzidas *in vitro* apresentam menor quantidade de ceras epicuticulares do que plantas crescidas em campo, ou mesmo em casa de vegetação. Associadas à pouca funcionalidade dos estômatos, essas plantas são sensíveis a grandes perdas de água por transpiração que as levam ao dessecamento e ao murchamento das folhas, que são causas da baixa sobrevivência no transplante (Van Huylbroeck & Debergh, 1996).

O tipo de substrato utilizado no momento do transplante é um importante fator que deve ser considerado. Taxas de sobrevivência das plantas acima de 95% podem ser obtidas com substratos de composição simples, como terra de mata e areia (1:1 v/v) ou terra de mata, vermiculita e esterco bovino (3:1:1 v/v). Além disso, nas duas primeiras semanas de aclimatização, as plantas devem ser mantidas em ambiente sob elevada umidade relativa e luz indireta (sombrite). A elevação da umidade relativa poderá ser garantida pela cobertura das plantas com plástico transparente, mantendo-se as folhas das plantas sempre úmidas. Deve-se evitar, contudo, o excesso de umidade para as raízes.

Referências

- BONIN, V. **Obtenção e multiplicação *in vitro* de batateiras (*Solanum tuberosum* L.) isentas de vírus Y (PVY)**. 1988. 68p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1988.
- FORTES, G.R. de L.; PEREIRA, J.E.S. Preservação *in vitro* da batata com o emprego do ácido acetil-salicílico e duas fontes de carboidrato. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.36, n.10, p.1261-1264, 2001.

HUSSEY, G.; WACEY, N.J. Factors affecting the formation of *in vitro* tubers of potato (*Solanum tuberosum* L.). **Annals of Botany**, London, v.53, p.565-678, 1984.

KARP, A.; JONES, M.G.K.; FOULGER, D.; FISH, N.; BRIGHT, S.W.J. Variability in potato tissue culture. **American Potato Journal**, Orono, v.66, p.669-684, 1989.

MARANI, F.; PISI, A. Meristem-tip culture and vegetative propagation in potato. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v.78, p.415-422, 1977.

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. de L. Multiplicación *in vitro* de la papa em medio sólido y líquido: influencia de diferentes medios de cultura. **Horticultura Argentina**, Cordoba, v.19, n.46, p.24, 2000.

PEREIRA, J.E.S.; FORTES, G.R. de L.; OLIVEIRA, A.O. Influência do número de gemas e da posição de inoculação dos explantes sobre a multiplicação *in vitro* da batata. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.18, p.179-180, 2000.

RESENDE, R.O.; PAIVA, M. Eradication of potato virus X and S by meristem-tip culture. **HortScience**, Alexandria, v.20, p.525, 1985.

TOVAR, P.; ESTRADA, R.; SCHILDE-RENTSCHLER, L.; DODDS, J.H. **Inducción y utilización de tuberculos *in vitro* de papa**. Lima: CIP, 1985. 4p. (CIP. Circular, 13).

Van HUYLENBROECK, J.M.; DEBERGH, P.C. Physiological aspects in acclimatization of micropropagated plantlets. **Plant Tissue Culture and Biotechnology**, Rehovot, v.2, n.3, p.136-141, 1996.