

REGULADORES DE CRESCIMENTO NA CULTURA DE MERISTEMAS DE BATATA¹

JOSÉ FLÁVIO LOPES² e JOSÉ ANTONIO PETERS³

RESUMO - Foram testados quatorze tratamentos na diferenciação de meristemas apicais de batata com um a três primórdios foliares. Sete deles foram obtidos a partir do meio básico de Murashige & Skoog com vitaminas acrescido de 100 mg/l de mio-inositol, 30 g/l de sacarose e 10 g/l de ágar (MS). Os outros sete, a partir do meio básico e vitaminas de White acrescido de 20 g/l de sacarose e 10 g/l de ágar (WB). Acrescentaram-se tanto em MS quanto em WB diferentes concentrações de reguladores de crescimento tais como duas auxinas - ácido naftalenoacético (ANA), ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) - e duas citoquininas - cinetina (CIN) e 6-benzilaminopurina (BAP). Os meios de cultura, depois de autoclavados a 105°C durante dez minutos, tiveram o pH ajustado a 5,6. Após a inoculação, foram mantidos em sala de crescimento sob luz fluorescente contínua (600 lux), à temperatura de 22 ± 2°C. Os primeiros sinais de diferenciação ocorreram em torno de 30 dias após a colocação dos meristemas nos meios de cultura. Surgiram gemas da superfície de uma massa calosa ou diretamente dos explantes. As gemas desenvolveram-se em sistemas caulinares que enraizaram abundantemente quando transferidos para MS. As plântulas obtidas foram transplantadas para recipientes de 200 ml contendo terra ou vermiculita e areia esterilizada na proporção 1:1, obtendo-se bom pegamento e normal desenvolvimento posterior. MS apresentou-se superior a WB nos aspectos de desenvolvimento, enraizamento e vigor de plântulas. O melhor tratamento foi o MS-6 (0,1 ppm de 2,4-D e 0,04 ppm de BAP), seguido do MS-5 (0,02 ppm de ANA e 0,04 ppm de BAP). Nesse último, o enraizamento foi mais tardio.

Termos para indexação: batata (*Solanum tuberosum* L.), gemas apicais, cultura de tecido.

GROWTH REGULATORS ON POTATO MERISTEM CULTURE

ABSTRACT - Fourteen culture media were tested for differentiation and growth of potato (*Solanum tuberosum* L. cv. Baronesa) meristems with one to three primordial leaflets (2-4 mm long). Seven of these media were variations from Murashige & Skoog (MS) basic medium with the addition of 100 mg/l of myo-inositol, 30 g/l of sucrose and 10 g/l of agar (MS). The other seven media were variations from White basic medium with the addition of 20 g/l of sucrose and 10 g/l of agar (WB). Both MS and WB were supplemented with the various concentrations of growth regulators, such as two auxins - alpha-naphthaleneacetic acid (ANA) and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) - and two cytokinins - 6-furfurylaminopurine (KIN) and 6-benzylaminopurine (BAP). The culture media were adjusted to pH 5.6, after autoclaved at 105°C for 10 min. The meristems were explanted onto flasks with 25 ml of the medium, which were then kept in a growth chamber with a temperature of 22 ± 2°C. Continuous light with an intensity of 600 lux provided by cool, white fluorescent tubes was utilized. The first signs of differentiation occurred about 30 days after placement of the meristem on the media. Small outgrowths were evident on the surface of a developed callus tissue or directly on the explants. These outgrowths elongated and rooted abundantly when transferred to MS. The seedlings were transplanted to 200 - ml pots containing a sterilizer mixture of sand and soil (1:1 ratio). MS were best than WB to root outgrowths, plant vigor and development. The best treatment was MS-6 (0,01 mg/l of 2,4-D and 0,04 mg/l of BAP) followed by MS-5 (0,02 mg/l of ANA and 0,04 mg/l of BAP). For MS-5 rooting was delayed.

Index terms: potato, *Solanum tuberosum*, apical buds, tissue culture.

INTRODUÇÃO

A propagação da batata é feita normalmente através dos tubérculos, mantendo-se a cultivar por muitas gerações com as mesmas características genéticas. Durante o processo de propagação ocorrem doenças viróticas, que se acumulam a cada ciclo vegetativo. Essas viroses são apontadas como as principais causas de degeneração da batata-se-

¹ Aceito para publicação em 22 de setembro de 1981. Parte da Tese apresentada pelo primeiro autor à Universidade Federal de Pelotas, RS, para obter o grau de Mestrado.

² Eng.º Agr.º, Centro Nacional de Pesquisa em Hortaliças (CNPq) - EMBRAPA, Caixa Postal 11.1316, CEP 70000 - Brasília, DF.

³ Eng.º Agr.º, Professor Adjunto do Departamento de Botânica da Faculdade de Agronomia "Eliseu Maciel", Universidade Federal de Pelotas, CEP 96100 - Pelotas, RS.

mente, causando quedas consideráveis na produtividade.

A técnica de cultivo de tecidos "in vitro" vem sendo aplicada extensivamente na cultura da batata para atender a uma série de objetivos, tais como: produção de plantas haplóides (Nitsch & Nitsch 1969, Irikura & Sakaguchi 1972, Dunwell & Sunderland 1973), produção de plantas isentas de vírus (Stace-Smith & Mellor 1968, Sip 1972, Morel 1973, Pennazio & Rodolfi 1974), e multiplicação vegetativa rápida de clones (Champman 1955, Okazawa et al. 1967, Anstis & Northcote 1973, Murashige 1974, Lam 1975, Skirvin et al. 1975, Pennazio et al. 1976). O objetivo deste trabalho foi o de testar e ajustar meios de cultura para induzir a diferenciação e desenvolvimento de meristemas de batata para possível utilização na obtenção de cultivares ou clones livres de vírus e/ou propagação rápida dos mesmos.

MATERIAL E MÉTODOS

Meristemas apicais de batata da cultivar Baronesa, consistindo de um a três primórdios foliares (2-4 mm) foram tratados com hipoclorito de sódio a 2% durante dez minutos, imediatamente lavados em água estéril e introduzidos em frascos de 50 ml (Fig. 1) contendo, em média, 20 ml do meio de cultura, previamente autoclavado e pH ajustado para 5,6.

Foram usados dois meios básicos de cultura, sendo o primeiro o de Murashige & Skoog (1962), com vitaminas acrescido de 100 mg/l de mio-inositol, 30 g/l de sacarose e 10 g/l de ágar (MS) e o outro o de White (1963) com vitaminas acrescido de 20 g/l de sacarose e 10 g/l de ágar (WB). Em cada um foram acrescentados sete diferentes pares e/ou doses de reguladores de crescimento formando uma série de MS-1 a MS-7 e WB-1 a WB-7, dependendo dos reguladores acrescentados a MS e WB, como se segue: 1) 0,02 mg/l de ácido naftaleno acético (ANA) e 0,03 mg/l de 6-benzilaminopurina (BAP); 2) 2 mg/l de cinetina (CIN) e 0,1 mg/l de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D); 3) 0,02 mg/l de ANA e 0,2 mg/l de CIN; 4) 0,03 mg/l de BAP e 0,10 mg/l de 2,4-D; 5) 0,02 mg/l de ANA e 0,04 mg/l de BAP; 6) 0,04 mg/l de BAP e 0,10 mg/l de 2,4-D e 7) 0,10 mg/l de BAP e 0,10 mg/l de 2,4-D. Após inoculados os explantes, os frascos foram mantidos em sala de crescimento sob luz fluorescente contínua (600 lux), à temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$. As plântulas obtidas nesses meios foram repicadas para frascos de 500 ml contendo 100 ml de MS.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observou-se acentuada diferença entre os meios MS e WB no que se refere à diferenciação e desen-

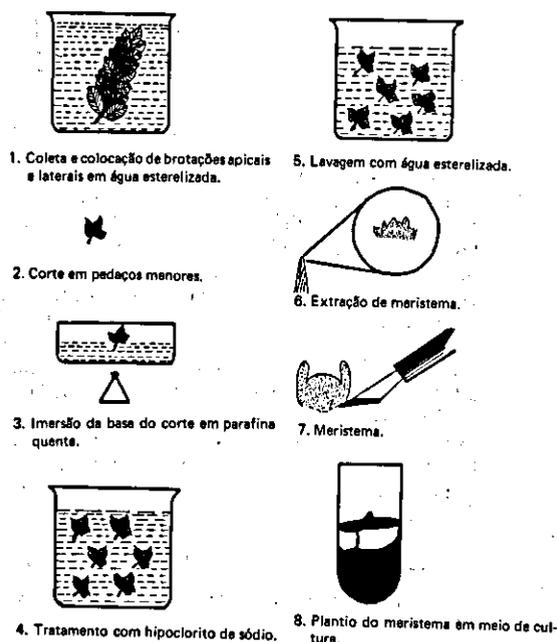


FIG. 1. Passos seguidos durante a preparação dos meristemas para o plantio em meio de cultura.

volvimento dos meristemas de batata. O meio MS acrescido de 100 mg/l de mio-inositol, 30 g/l de sacarose e 10 g/l de ágar induziu formação de calos, gemas, ou ambos, em função dos reguladores de crescimento acrescentados. O meio WB acrescido de 20 g/l de sacarose e 10 g/l de ágar promoveu apenas espessamento de alguns explantes, mas estas não se desenvolveram. Pennazio et al. (1976) verificaram que meristemas de batata se desenvolveram em meio MS sem tiamina, mas a sobrevivência e a recuperação das plântulas só eram obtidas se, no máximo 30 dias após, fosse efetuado o suprimento do produto em falta. Em nossos trabalhos, o mau resultado obtido com o meio WB, é provavelmente, consequência de o requerimento nutricional mínimo não ter sido alcançado. Melhores resultados referentes a diferenciação e desenvolvimento de meristemas de batata foram obtidos com os meios MS-5 e MS-6.

Nos dez primeiros dias após a inoculação dos meristemas nesses meios, observou-se aumento de espessura do explante; nos vinte dias seguintes ocorreram a diferenciação e desenvolvimento de primórdios foliares, obtendo-se de 1 a 3 brotos com folhas a partir de um único meristema intro-

duzido em meio de cultura. Essas brotações foram repicadas para MS, onde ocorreu diferenciação e desenvolvimento do sistema radicular, bem como a proliferação e desenvolvimento de novas brotações, possibilitando a manutenção teoricamente ilimitada do material. As brotações que originaram do MS-6 enraizaram-se mais precocemente do que as que vieram do MS-5. Esse método de se transferir gemas de um meio que contém reguladores de crescimento para um outro livre deles foi usado visando reestabelecimento do crescimento de embriões de cebola (Hirano 1973) e de calos de fumo (Murashige & Skoog 1962). Com relação ao enraizamento e precocidade de enraizamento Ozokawa et al. (1976) concluíram que AIA tem efeitos positivos superiores ao 2,4-D, enquanto que Pennazio & Vecchiati (1976) verificaram aumento significativo de plântulas enraizadas precocemente quando utilizaram 0,07 mg/l de ANA ao invés de ácido giberélico; altas concentrações de ANA também inibiu enraizamento e brotações.

Uma vez obtidas as plântulas com os sistemas caulinar e radicular devidamente desenvolvidos, elas foram transplantadas para vasos de plástico de 250 ml contendo mistura de terra ou vermiculita e areia esterilizada na proporção de 1:1. Foram cobertas com campânulas de vidro por dez dias para manter alta umidade e irrigadas periodicamente com solução mineral de Hoagland e Arnon a 30%. Após o pegamento das plântulas foram retiradas as campânulas. As plantas foram transferidas para vasos de 3 kg contendo terra esterilizada (Fig. 2). O pegamento normal das plântulas obtidas a

partir de meio MS e transplantadas ao solo foi conseqüência do vigor inicial e alta taxa de enraizamento em meios de cultura.

CONCLUSÕES

1. MS foi superior a WB na manutenção do desenvolvimento e do vigor das plântulas que surgiram a partir dos meristemas de batata;
2. O melhor tratamento foi o MS-6 seguido do MS-5;
3. WB mostrou-se ineficiente para a manutenção de gemas formadas a partir dos meristemas de batata;
4. A transferência de plântulas formadas num meio de cultura para um recém-preparado, sem reguladores de crescimento, deu continuidade ao seu crescimento; isso permitiu alta taxa de multiplicação "in vitro" através de pequenas estacas.

REFERÊNCIAS

- ANSTIS, P.J.P. & NORTHCOTE, D.H. The initiation, growth, and characteristics of a tissue culture from potato tubers. *J. Exp. Bot.*, Cambridge, 24(79): 425-1, 1973.
- CHAMPMAN, H.W. Potato tissue culture. *Am. Potato J.*, 32(6):207-10, 1955.
- DUNWELL, J.M. & SUNDERLAND, N. Anther culture of *Solanum tuberosum* L. *Euphytica*, 22(3):317-23, 1973.
- HIRANO, E. Cultura de anteras de cebola "in vitro" para a diferenciação de tecido haplóide. Viçosa, UFV, 1973. 29p. Tese Mestrado.
- IRIKURA, T. & SAKAGUCHI, S. Induction of 12-chromosome plants from anther culture in a *tuberosum solanum*. *Potato Res.*, 15:170-3, 1972.
- LAM, S.L. Shoot formation in potato tubers discs in tissue culture. *Am. Potato J.*, 52(4):104-6, 1975.
- MOREL, G. The impact of the tissue culture on plant breeding. In: CONGRESS OF EUCARPIA 6, Cambridge, 1971. The way ahead in plant breeding ... Cambridge, 1973. p.185-93.
- MURASHIGE, T. Plant propagation through tissue culture. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 25(7565):135-66, 1974.
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant*, 15(3):473-97, 1962.
- NITSCH, J.P. & NITSCH, C. Haploid plant from pollen grains. *Science*, 163:85-7, 1969.
- OKAZAWA, Y.; KATSURA, N. & TAGAWA, T. Effects of auxin and kinetin on the development and differentiation of potato tissue cultured "in vitro". *Physiol. Plant*, 20(4):826-9, 1967.



FIG. 2. Planta de batata obtida de cultura de meristema, 145 dias após o plantio em meio de cultura.

- PENNAZIO, S. & RODOLFI, P. Potato virus x eradication in cultures potato meristem tips. *Potato Res.*, 17: 333-5, 1974.
- PENNAZIO, S.; APPIANO, A.; VECCHIATI, M. & D'AGOSTINO, G. Thiamine requirement of potato meristem tips culture "in vitro". *Physiol. Vég.*, 14 (1):121-6, 1976.
- PENNAZIO, S. & VECCHIATI, M. Effects of naphthalen-acetic acid on potato meristem tip development. *Potato Res.*, 19:257-61, 1976.
- SIP, V. Eradication potato viruses A and S by thermotherapy and sprout tip culture. *Potato Res.*, 15:270-3, 1972.
- SKIRVIN, R.M.; LAM, S.L. & JANICK, J. Plantlet formation from potato callus "in vitro". *Hort. Sci.*, 10(4):413, 1975.
- STACE-SMITH, R. & MELLOR, F.C. Eradication of potato virus x and S by thermotherapy and axillary bud culture. *Phytopathology*, 58(130):199-203, 1968.