
EFICIÊNCIA COMPARATIVA NA MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DA BATATA EM SISTEMA ESTACIONÁRIO E SOB AGITAÇÃO DO MEIO 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 trabalho teve por objetivo comparar a eficiência do cultivo *in vitro* da batata em sistema estacionário e sob agitação do meio líquido, visando otimizar o processo de propagação massal de materiais de alta qualidade genética e fitossanitária. Explantes de batata das cultivares Baronesa, Eliza e Pérola, com 0,8 a 1,0 cm de comprimento e uma gema axilar, foram colocados para se desenvolver em Erlenmeyers com 15 mL de meio de cultura líquido e submetidos a diferentes períodos de agitação: 0 (cultivo estacionário), 6, 12, 18 e 24 horas. Utilizou-se o meio formado pelos sais de MS, adicionado de tiamina (1,0 mg.L⁻¹), ácido pantotênico (5,0 mg.L⁻¹), ácido giberélico (0,25 mg.L⁻¹) e sacarose (20 g.L⁻¹). Após 21 dias de cultivo, verificou-se que a agitação contínua dos explantes foi o tratamento que proporcionou o maior crescimento das brotações, com ganho médio de 26,9% quando comparados ao sistema estacionário. A taxa de multiplicação foi maior quando o cultivo permaneceu sob agitação por 24 horas. Este tratamento foi superior a todos os demais, proporcionando ganhos de até 45,4% nas taxas de multiplicação da cultivar Pérola, quando comparado ao cultivo estacionário. Para as cultivares Baronesa e Eliza, este ganho alcançou 32,8% e 38,8%, respectivamente.

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

ABSTRACT

The aim of this study was to compare the efficiency of two micropropagation systems to optimize the massal propagation of potato shoots with good genetic and sanitary condition: the stationary culture and agitation of the liquid medium. Potato explants of Baronesa, Eliza and Pérola cultivars, with 0.8 to 1.0 cm and one axillary bud, were inoculated in Erlenmeyers with 15 mL liquid medium and submitted to different agitation periods: 0 (stationary culture), 6, 12, 18 and 24 hours. The medium was formed by MS salts, added with thiamine (1,0 mg.L⁻¹), panthotenic acid (5.0 mg.L⁻¹), gibberellic acid (0.25 mg.L⁻¹) and sucrose (20 g.L⁻¹). After 21 days, it was observed that shoot growth was 26.9% higher under continuous agitation than in the stationary system. The multiplication rate was better under continuous agitation. It reached up to 45.4% for Pérola cultivar. This index reached 32.8% and 38.8%, respectively for 'Baronesa' and 'Eliza' cultivars.

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

A técnica de cultivar tecidos de plantas *in vitro* vem sendo rotineiramente aplicada para um grande número de espécies vegetais, tendo como vantagens a possibilidade de manutenção da identidade genética dos indivíduos e a obtenção de um grande número de plantas sadias e de alta qualidade em pequeno espaço físico e em curto período de tempo, independentemente da época do ano. Por outro lado, o uso comercial da cultura de tecidos é ainda limitado, principalmente, pelo elevado custo dos reagentes e equipamentos utilizados, e pela relativa baixa eficiência no desenvolvimento e multiplicação que algumas espécies apresentam sob condições *in vitro* (Ziv, 1995; Kozay *et al.*, 1997; Fortes & Pereira, 2003).

Particularmente para a batata, o cultivo *in vitro* vem sendo aplicado extensivamente procurando atender uma série de objetivos, entre os quais, destacam-se a produção de materiais livres de vírus, proporcionado benefícios diretos aos produtores pelo aumento da produtividade da cultura (Assis, 1999; Lopes & Reifschneider, 1999).

Na literatura, existem referências de vários ensaios e condições de cultivo visando otimizar o processo de multiplicação *in vitro* da batata (Ávila *et al.*, 1994; Pereira & Fortes, 2000; Pereira *et al.*, 2000; Pereira & Fortes, 2004a). O cultivo em meios de consistência líquida tem recebido atenção especial por parte de pesquisadores por apresentar vantagens importantes quando comparado aos meios de consistência semi-sólidos. Além de proporcionar melhor eficiência nas taxas de multiplicação, o uso de meio líquido facilita a preparação e manipulação dos meios e reduz os custos pela eliminação do ágar e menor quantidade de meio de cultura utilizado (Pereira & Fortes, 2004b). No entanto, o cultivo em meio líquido requer, normalmente, um suporte ou agitação para fornecer o oxigênio necessário para a respiração do explante em meio de cultura (Alvard, 1993; Grattapaglia & Machado, 1998).

O trabalho teve por objetivo comparar a eficiência do cultivo *in vitro* da batata em sistema estacionário e sob agitação do meio líquido, visando otimizar o processo de propagação massal de materiais de alta qualidade genética e fitossanitária.

MATERIAL E MÉTODOS

Utilizou-se material propagativo de batata (*Solanum tuberosum* L.) que encontravam-se sob multiplicação em meio de cultura semi-sólido formado pelos sais e vitaminas de MS (Murashige & Skoog, 1962). O material estava acondicionado em sala de crescimento com temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 16 horas e radiação de $35 \mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$, fornecida por lâmpadas fluorescentes brancas-frias.

Explantos de batata das cultivares Baronesa, Eliza e Pérola, com 0,8 a 1,0 cm de comprimento e uma gema axilar, foram colocados para se desenvolver em Erlenmeyers de 250 mL com 15 mL de meio de cultura líquido e colocados sob diferentes períodos de agitação: 0 (cultivo estacionário), 6, 12, 18 e 24 horas (mesa agitadora do tipo orbital 80 – 90 rpm).

Para o cultivo dos explantes, utilizou-se o meio de cultura M2M, formado pelos sais de MS, adicionado de $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de tiamina, $5,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de ácido pantotênico, $0,25 \text{ mg.L}^{-1}$ de AG_3 (ácido giberélico) e 20 g.L^{-1} de sacarose (Pereira & Fortes, 2003).

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

Os dados foram coletados após 21 dias de cultivo. As variáveis avaliadas foram: altura de brotações (porção compreendida entre a região do colo e a inserção da última folha) e taxa de multiplicação do material (contagem do número de gemas formadas no final do período de cultivo, excluindo-se a apical).

Os dados foram submetidos a análise de regressão a 5% de probabilidade. Os dados referentes à taxa de multiplicação (x) foram transformados em $(x+0,5)^{1/2}$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para altura de brotações não foi observado interação significativa entre os tratamentos (Tabela 1). Entre os genótipos testados, a cultivar Baronesa foi a que apresentou os melhores resultados, com brotações apresentando altura média de 6,1 cm, significativamente superiores aos valores 5,8 cm e 5,7 cm observados respectivamente nas cultivares Eliza e Pérola, as quais não apresentarem diferenças estatísticas significativas entre si para esta variável. Entre os tratamentos com diferentes períodos de agitação do meio líquido, verificou-se que os explantes que permaneceram sob agitação contínua (24 h) foram os que mais cresceram com um ganho de eficiência de 26,9% quando comparados ao sistema estacionário. Nos demais períodos de agitação (6, 12 e 18 horas) não se observou diferenças significativas, embora também tenham proporcionado brotações com altura significativamente superiores àquelas do cultivo estacionário (Tabela 2).

TABELA 1 - Análise da variação para altura de brotações e taxa de multiplicação em cultivares de batata em função do período de agitação do meio de cultura líquido.

Causas da variação	GL	Quadrado Médio	
		Altura de brotação	Taxa de multiplicação
Cultivar (A)	2	1,139**	0,058**
Período de agitação (B)	4	3,072**	0,264**
Blocos (C)	3		
A x B	8	0,136 ^{ns}	0,009*
Resíduo	42	0,185	0,004
C.V. (%)		7,4	2,2

** , * - significativo ao nível de 1% e 5% de probabilidade pelo teste F, respectivamente.

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

TABELA 2 - Altura de brotações¹ (cm) e Eficiência Comparativa da Altura de Brotações (E.C.A.)² no cultivo *in vitro* da batata em sistema estacionário e sob agitação do meio líquido, após 21 dias.

Cultivares	Período de agitação					Média (cultivar)
	0 h (cultivo estacionário)	6 h	12 h	18 h	24 h	
Baronesa	5,2	6,3	6,0	6,0	7,0	6,1 a
(E.C.A.)	(0%)	(21,1%)	(15,4%)	(15,4%)	(34,6%)	(17,3%)
Eliza	5,2	5,8	5,9	5,7	6,5	5,8 b
(E.C.A.)	(0%)	(11,5%)	(13,5%)	(9,6%)	(15%)	(11,5%)
Pérola	5,1	5,7	5,5	5,5	6,3	5,7 b
(E.C.A.)	(0%)	(11,8%)	(7,8%)	(7,8%)	(13,5%)	(11,8%)
Média (agitação)	5,2 C	5,9 B	5,8 B	5,7 B	6,6 A	5,9
(E.C.A.)	(0%)	(13,5%)	(11,5%)	(9,6%)	(26,9%)	(13,5%)

Médias seguidas por letras distintas, minúsculas na vertical e maiúsculas na horizontal, diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade.

⁽¹⁾ porção compreendida entre a região do colo e a inserção da última folha.

⁽²⁾ Diferença de altura das brotações entre o sistema estacionário e os diferentes períodos de agitação dos cultivos, em porcentagem.

Para a taxa de multiplicação houve interação entre os tratamentos e, de maneira geral, assim como para a variável altura de brotações, os melhores resultados foram observados quando o cultivo permaneceu sob agitação por 24 horas. Este tratamento foi superior a todos os demais, proporcionando ganhos de até 45,4% nas

taxas de multiplicação da cultivar Pérola, quando comparado ao cultivo estacionário. Para as cultivares Baronesa e Eliza, este ganho alcançou 32,8% e 38,8%, respectivamente (Tabela 3).

Quando se avaliou a taxa de multiplicação dos genótipos em cultivo estacionário, verificou-se que a cultivar Baronesa apresentou os melhores resultados, sendo que as cultivares Eliza e Pérola não diferiram estatisticamente entre si (Tabela 3).

Com os resultados deste trabalho observou-se que mesmo que os resultados tenham se mostrado significativamente superiores com 24 horas de agitação, o sistema estacionário também proporcionou um bom crescimento e multiplicação do material vegetal. França (2000), trabalhando com a cultivar Baronesa em meio de MS semi-sólido, obteve taxa de multiplicação de 5,9 inferior, portanto, à obtida com este genótipo no sistema estacionário. Por isso, questiona-se a necessidade de manter os explantes sob contínua agitação, especialmente pelos custos dos sistemas, embora os resultados com esta cultura em meio líquido sejam bastante satisfatórios (Pereira & Fortes, 2003, 2004b). Apesar de não terem sido realizados testes mais aprofundados para verificar tal hipótese, é possível que, de acordo com a metodologia utilizada neste trabalho, a maior necessidade de agitação aconteça na primeira semana de cultivo, pois neste período, os explantes em meio de cultura estacionário permanecem totalmente imersos no meio de cultura, fato que pode dificultar o crescimento inicial dos explantes. Além disso, observou-se atraso no crescimento dos explantes mantidos nestas condições, quando comparados aos demais tratamentos sob agitação (dados não apresentados), fato este, possivelmente ocasionado pela falta de oxigenação do meio de cultura.

TABELA 3. Taxa de multiplicação¹ e Eficiência Comparativa da Multiplicação (E.C.M.)² no cultivo *in vitro* da batata em sistema estacionário e sob agitação do meio líquido, após 21 dias.

Cultivares	Período de agitação					Média (cultivar)
	0 h (cultivo estacionário)	6 h	12 h	18 h	24 h	
Baronesa (E.C.M.)	6,4 aC (0%)	7,5 aB (17,2%)	7,1 aB (10,9%)	7,3 aB (14,1%)	8,5 aA (32,8%)	7,4 a (17,3%)
Eliza (E.C.M.)	5,4 bC (0%)	6,8 bB (25,9%)	7,1 aAB (31,5%)	7,1 aAB (31,5%)	7,5 cA (38,8%)	6,8 c (11,5%)
Pérola (E.C.M.)	5,5 bC (0%)	7,0 bB (27,2%)	7,1 aB (29,0%)	7,2 aB (30,9%)	8,0 bA (45,4%)	7,0 b (11,8%)
Média (sistemas) (E.C.M.)	5,8 C (0%)	7,1 B (22,4%)	7,1 B (22,4%)	7,2 B (24,1%)	8,0 A (37,9%)	7,1 (22,4%)

Médias seguidas por letras distintas, minúsculas na vertical e maiúsculas na horizontal, diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade.

⁽¹⁾Número de gemas formadas no final do período de cultivo, excluindo-se a apical.

⁽²⁾Diferença na taxa de multiplicação entre o sistema estacionário e os diferentes períodos de agitação dos cultivos, em porcentagem.

LITERATURA CITADA

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

ALVARD, D; COTE, F.; TEISSON, C. Comparison of methods of liquid medium cultures for banana micro-propagation. Effect of temporary immersion of explants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Dordrecht, v.32, p.55-60, 1993.

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.

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.

GRATTAPAGLIA, D; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Eds.). *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: Embrapa: SPI, 1998. p.183–260.

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.

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.

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.; 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.