

RENATO DE OLIVEIRA RESENDE

CULTURA IN VITRO DE MERISTEMA DE
BATATA (*Solanum tuberosum* L.)

Tese apresentada à Escola Superior
de Agricultura de Lavras, como parte das
exigências do curso de Pós-Graduação em
Agronomia, área de concentração Fitotec-
nia, para obtenção do grau de "MESTRE".

ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA DE LAVRAS

LAVRAS - MINAS GERAIS

1 9 8 5

REMATO DE OLIVEIRA RESENDE

CULTURA IN VITRO DE MERISTEMA DE

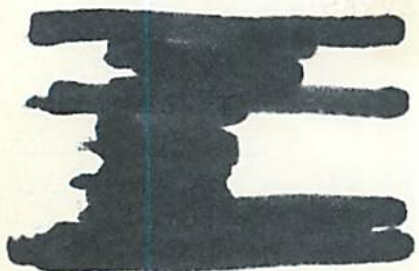
BATAIA, *Stemonium tuberosum* L.

Tese apresentada à Escola Superior
de Agricultura de Lavras, como parte das
exigências do curso de Pós-Graduação em
Agronomia, área de concentração Fitotec-
nia, para obtenção do grau de MESTRE.

ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA DE LAVRAS

AV. BRASIL, 173 - LAVRAS - MINAS GERAIS

1988



CULTURA IN VITRO DE MERISTEMA DE BATATA (Solanum tuberosum L.)

APROVADA:

Marcos Paiva

Prof. MARCOS PAIVA
Orientador

Antônia dos Reis Figueira

Prof^a ANTÔNIA DOS REIS FIGUEIRA

Francisco Dias Nogueira

Pesq. FRANCISCO DIAS NOGUEIRA

aos meus pais, Romeu e
Maria Silvia que muito
contribuíram para minha
formação intelectual.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Escola Superior de Agricultura de Lavras, especialmente ao Departamento de Agricultura, pela oportunidade concedida para a realização deste curso.

Ao professor Marcos Paiva, pelos ensinamentos, eficiente orientação, dedicação, incentivo e amizade durante a condução desta pesquisa.

À professora Antônia dos Reis Figueira e ao pesquisador Francisco Nogueira, pelas valiosas sugestões e incentivo recebidos.

À laboratorista Valéria A. Fernandes pela eficiente ajuda na realização dos trabalhos.

Ao Antônio de Pádua Oliveira pela realização dos serviços fotográficos.

A todos os funcionários do departamento de Agricultura pela ajuda e apoio recebidos.

Aos colegas de curso, em especial ao César Pereira Teixeira pelo apoio e amizade.

À Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais pela contribuição recebida na fase de conclusão desta pesquisa.

Finalmente, a todos que direta ou indiretamente prestaram sua colaboração nas diversas fases do curso e desenvolvimento deste trabalho.

BIOGRAFIA

RENATO DE OLIVEIRA RESENDE, filho de Romeu Resende e Maria Silvia de Oliveira Resende, nasceu em Lavras, Minas Gerais, a 5 de dezembro de 1959.

Obteve o título de Engenheiro Agrônomo pela Escola Superior de Agricultura de Lavras, Minas Gerais, no ano de 1982.

Em março de 1983, iniciou o curso de pós-graduação em Agronomia a nível de Mestrado, na Escola Superior de Agricultura de Lavras.

Atualmente é técnico da EPAMIG - Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO DE LITERATURA	03
3. MATERIAL E MÉTODOS	10
3.1. Cultivares	10
3.2. Operação de remoção dos meristemas.....	11
3.3. Meio de cultura e condições ambientais.....	13
3.4. Fase de Isolamento.....	16
3.5. Fase de Alongamento.....	17
3.6. Fase de multiplicação e enraizamento.....	18
3.7. Aclimação e transplante.....	18
3.8. Testes serológicos.....	19
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
4.1. Comportamento das plantas de batata.....	20
4.2. Desenvolvimento <u>in vitro</u> do meristema de batata..	21
4.3. Fase de isolamento.....	24
4.4. Fase de alongamento	30
4.5. Fase de multiplicação e enraizamento.....	33

LISTA DE QUADROS

Quadro		Página
1	Composição do meio de cultura de Murashige e Skoog (MS) modificado.....	14
2	Desenvolvimento comparativo de cultivares de batata durante a fase de isolamento do meristema em dois meios de cultura.....	25
3	Desenvolvimento comparativo de meristemas de batata em cinco meios de cultura durante a fase de alongamento	31
4	Rendimento da técnica de cultura <u>in vitro</u> de meristema de cultivares de batata.....	40
5	Eficiência da técnica de cultivo <u>in vitro</u> de meristema de batata na erradicação do PVS e PVX nas cultivares Baronesa e Santo Amor.....	42

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Brotação lateral (1 a 2 cm de comprimento) da planta de batata utilizada para a remoção do meristema.	12
2	Meristema de batata contendo os dois primeiros primórdios foliares	15
3	Estádios de desenvolvimento <u>in vitro</u> de meristema de batata. Da esquerda para direita: iniciação e crescimento de callus, callus organogênico, "roseta" e plântula.....	23
4	Desenvolvimento comparativo de meristemas de cultivares de batata aos 30 dias de cultivo em meio básico com 0,01 mg/l de ANA; 0,1 mg/l de GA ₃ e 1,0 mg/l de BAP	26
5	Desenvolvimento comparativo de meristemas de cultivares de batata aos 30 dias de cultivo em meio básico com 0,1 mg/l de GA ₃ e 0,4 mg/l de KINETINA.....	27

Figura	Página	
6	Desenvolvimento comparativo de meristemas de batata aos 45 dias de cultivo <u>in vitro</u> sendo: 1 - meristemas cultivados em meio básico com 0,1 mg/l de GA ₃ e 0,4 mg/l de KINETINA; 2 - meristemas cultivados em meio básico com 0,1 mg/l de ANA; 0,1 mg/l de GA ₃ e 1,0 mg/l de BAP.....	29
7	Desenvolvimento comparativo de meristemas de batata aos 60 dias de cultivo sendo: 1 - meristema em meio básico com 0,0 mg/l de GA ₃ ; 2 - meristema em meio básico com 0,01 mg/l de GA ₃ ; 3 -meristema em meio básico com 1,0 mg/l de GA ₃ ; 4 - meristema em meio básico com 0,1 mg/l de GA ₃ ; 5 - meristema em meio básico com 0,5 mg/l de GA ₃ e 5 mg/l de BAP...	32
8	Plântulas da cultivar Baronesa aos 90 dias de cultivo <u>in vitro</u>	34
9	Desenvolvimento comparativo do tamanho dos segmentos do caule de batata contendo 1, 2 ou 3 gemas aos 21 dias de cultivo in vitro em meio de multiplicação.....	36
10	Plântula de batata da cultivar Baronesa transferida para a vermiculita proveniente do cultivo <u>in vitro</u> de meristema.....	37
11	Planta de batata da cultivar Baronesa transplantada da vermiculita para o vaso contendo mistura de terra e composto orgânico proveniente do cultivo <u>in vitro</u> de meristema.....	38

1. INTRODUÇÃO

A batata Solanum tuberosum L. é originária da América do Sul, sendo hoje cultivada em quase todas as regiões do mundo. Esta espécie olerícola de alta importância econômica e social, ocupa atualmente o 4º lugar em tonelagem absoluta inferior apenas ao do trigo, arroz e milho.

No Brasil a batata também situa-se entre as principais culturas, sendo importante como fonte de subsistência das populações, proporcionando, além da fécula, um bom teor de proteína.

A qualidade da batata semente utilizada para plantio é um fator que incide fundamentalmente no rendimento da cultura, pois trata-se de uma espécie cuja multiplicação vegetativa facilita a perpetuação de moléstias fúngicas, bacterianas e principalmente vióticas que causam enormes perdas de produção (6, 29, 41).

Segundo MIZUBUTI et alii (30) as viroses são o grande problema da bataticultura nacional, devido à dificuldade de se obter no país estoques sadios de batata semente, o que torna necessário a importação, fator que eleva em mais de 50% o custo de produção da batata no Brasil.

De acordo com MELLOR & STACE-SMITH (28) na obtenção de tu bérculos sadios de batata, três métodos têm sido empregados isoladamente ou em combinações; termoterapia, quimioterapia e - cultura de meristema. A termoterapia e a quimioterapia têm mostrado não se rem efetivas na eliminação de todos os principais virus que infec tam a batata, enquanto que a cultura de meristema tem demonstrado ser um método eficiente, entretanto, a utilização deste processo no Brasil é ainda bastante limitada. Diante desta limitação, o pre sente trabalho tem como objetivos:

- a) testar as operações envolvidas na técnica de cultivo in vitro de meristema de batata;
- b) avaliar o comportamento de cultivares de batata diante da referida técnica;
- c) testar meios de cultura visando obter um rápido e vigo roso desenvolvimento dos meristemas in vitro;
- d) testar a eficiência da técnica na eliminação do virus S (PVS) e do virus X (PVX) da batata.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Em 1933, aproximadamente 600 cultivares de batata foram relacionadas por Burton, citado por MELLOR & STACE-SMITH (28), e este número tem aumentado a cada ano. Muitas destas cultivares amplamente utilizadas em todo o mundo, devido às boas características agrônômicas, gradualmente vêm declinando em vigor e produtividade devido à infecção das plantas por uma ou mais viroses, como relatam BEEMSTER & ROZENDAAL (6) e SILBERSCHMIDT (39).

Atualmente os principais virus da batata são: virus do enrolamento da batateira (PLRV), virus Y (PVY) seguido de outros de menor importância, como virus X (PVX), virus S (PVS), virus A (PVA) e virus M (PVM), sendo que todos possuem uma larga distribuição no globo terrestre, causando grandes perdas de produção (6, 29, 41).

- Avaliação de perdas no Brasil causadas por virus na cultura da batata tem mostrado um volume bastante significativo. Segundo MIZUBUTI (29) para virus menos importante com o PVX as perdas variam de 10 a 50%, e entre 44 e 86% para o principal virus que infecta a batata em nossas condições, o PLRV, como relatam CUPPERTINO & COSTA (8).

A estimativa real de perdas causadas por virus foi possível com a obtenção de batatas isentas de virus. Os resultados variaram de acordo com o virus e susceptibilidade das cultivares, entretanto, estas perdas foram sempre significativas (5, 6, 16, 21, 34, 44). Na obtenção de plantas livres de virus, três técnicas têm sido empregadas. A termoterapia, que consta em submeter a planta infectada a uma temperatura média próxima a 37°C por algumas semanas, segundo KASSANIS (20), visa inibir e/ou retardar a multiplicação viral; a quimioterapia, baseada no fato de que alguns antimetabólitos decrescem a concentração de virus nos tecidos, sem causar danos a estes, NORRIS (33); e a cultura in vitro de meristemas, que após serem regenerados, dão origem à plantas livres de virus, MELLOR & STACE-SMITH (28). As duas primeiras técnicas isoladamente não têm demonstrado eficiência na erradicação das principais viroses da batata. A cultura in vitro de meristema de batata como um método de obter-se plantas livres de virus, a partir de plantas infectadas, tem alcançado sucesso. Segundo KASSANIS (20), a termoterapia tem sido eficiente apenas na eliminação do PLRV, enquanto que a cultura de meristema, além deste, possibilita a obtenção de plantas isentas de todos os demais virus de importância econômica, principalmente quando associada à termoterapia.

A cultura de meristema é baseada no fato de que, numa planta infectada, a concentração de virus diminui das partes mais velhas para as partes vegetativas mais novas. KRYLOVA et alii (23), estudando o PVX em meristemas de batata, verificaram existir uma relação positiva entre o número de partículas virais e o tamanho

da porção meristemática. Várias são as hipóteses que tentam explicar o fato de que plântulas regeneradas a partir de meristemas com o tamanho entre 0,2 e 0,3mm geralmente são livres de vírus, e estas hipóteses estão relacionadas ao sistema vascular da planta e a inativação das partículas virais durante o cultivo in vitro (22, 23, 28). Hollings e Stone, citados por LANGHANS et alii (24) estudando o tamanho do meristema do cravo (Dianthus caryophyllus) na eliminação do vírus do "mosqueado", em cinco tamanhos de meristemas (0,1; 0,25; 0,50; 0,80 e 1,00mm), verificaram que destes 33, 60, 87, 89 e 100%, respectivamente, estavam infectados com vírus. Na batata constataram-se que tanto pelo isolamento do meristema apical, ou da extremidade das raízes de plantas infectadas, seguido de desenvolvimento em meio de cultura, é possível obter-se tecidos isentos de vírus, que posteriormente são regenerados, originando um material sadio, como mostraram BAJAJ & DIONNE (2) e KASSANIS (21).

O método da cultura de tecidos para sua aplicação na produção de plantas sadias, deve obedecer certos requisitos básicos, segundo ROCA et alii (38): as plantas devem ser prontamente regeneradas in vitro, utilizando-se um meio de cultura definido; a técnica deve ser altamente estável para as características varietais; o material propagado deve ser livre de patógenos; o procedimento de propagação deve ser adequado, permitindo a previsão da erradicação de vírus, bem como sistemas de indexação para certificação de sanidade, possibilitando a seleção de materiais isentos de doenças. De acordo com estes requisitos, no caso da batata, o cultivo de meristema é a técnica preferida a outros tecidos da planta. A cultura

de meristema tem sido empregada não somente para a eliminação de viroses da batata, mas também como método de armazenamento e distribuição de germoplasma na forma clonal de acordo com HENSHAW (17).

HOLLINGS (18) observou que o termo cultura de meristema estava sendo aplicado indiscriminadamente para porções de tecidos, a partir de 0,1 a 10mm de tamanho. Sugeriu então que o termo meristema descrevesse a porção meristemática mais o primeiro par de primórdios foliares, sendo este o tecido unitário mais usado para o cultivo in vitro. Porções maiores foram consideradas como sendo ápices caulinares. KASSANIS & VARMA (22) verificaram que o tamanho dos meristemas influencia a formação de raízes no meio de cultura e a presença dos primórdios foliares facilita o desenvolvimento das mesmas. Estes autores usando meristema de 0,1mm de comprimento, encontraram que as maiores taxas de regeneração foram obtidas quando os primórdios foliares estavam incluídos. STACE-SMITH & MELLOR (42) observaram que meristemas de 1mm ou mais de comprimento emitiram raízes mais rapidamente que meristemas menores, entretanto, o tamanho das gemas tem uma marcante influência na eliminação de vírus, particularmente o PVS. Usualmente são rejeitados meristemas menores que 0,1mm, pela dificuldade de desenvolvimento in vitro e maiores que 0,5mm, porque podem estar infectados por vírus.

O meio de cultura constitui o principal fator na regeneração de uma planta completa in vitro, com raízes e parte aérea normais, desenvolvidas a partir da parte meristemática. É necessário que este contenha macro e micronutrientes, vitaminas, açúcar, aminoácidos e principalmente hormônios, substâncias responsáveis pela

regulação do crescimento e desenvolvimento vegetal. MURASHIGE (31), LAM (25) e MELLOR & STACE-SMITH (28), mostraram que auxina endógena, citocininas e giberelinas são indispensáveis para o início do crescimento dos tecidos e que o balanço hormonal nos diversos estádios do desenvolvimento in vitro é extremamente importante na regeração das plântulas. A. RODRIGUEZ et alii (1) constataram que as citocininas (6-benzilaminopurina-BAP e 6-furfuril-aminopurina-KINETINA) em altas concentrações, favorecem o desenvolvimento de gemas e inibem o enraizamento. Por outro lado as auxinas (ácido indol butírico-AIB) em baixas concentrações estimulam a diferenciação de raízes e as giberelinas (ácido giberélico-GA₃) em níveis médios, estimulam o crescimento dos primórdios foliares de meristemas de mandioca. Na batata, OKAZAWA et alii (35) observaram ser a auxina indispensável para o início do crescimento dos tecidos, induzindo a formação de callus, e que as citocininas são requeridas para a continuação do crescimento deste callus. Com relação à giberelina, JARRET et alii (19) verificaram que o GA₃ é responsável pelo alongamento e desenvolvimento da parte aérea após o início do crescimento dos meristemas. Vários meios de cultura foram desenvolvidos e testados, visando obter a relação ideal entre os componentes (Murashige e Skoog; Stace-Smith e Mellor; Huth e Bode; Christensen e Tapio) citados por MELLOR & STACE-SMITH (28). O fator principal é a seleção adequada do meio de cultura para se obter um crescimento rápido e vigoroso das plântulas e dentre todos, o meio básico de MURASHIGE & SKOOG (32) tem se mostrado superior.

As condições ambientais também são importantes para o sucesso do cultivo in vitro de meristema. PENNAZIO & REDOLFI (37), estudando o efeito de luz e temperatura no desenvolvimento das plântulas, encontraram que para a batata, temperaturas variando entre 20 e 25°C, submetidas à luz fluorescente com 2000 a 4000 lux por 16 horas, parecem ser as condições ideais para se obter um bom desenvolvimento das gemas, sendo que o máximo crescimento foi observado sob um regime de 4000 lux, com uma taxa de aproximadamente 80% de plântulas regeneradas. Detalhes sobre a remoção dos meristemas, ingredientes do meio de cultura e sobre as condições ambientais ideais para a regeneração das plântulas, a partir de porções meristemáticas, têm sido intensamente estudados na tentativa de otimizar esta técnica, como relatam MURASHIGE (31) e FOSSARD (13).

Com o objetivo de se aperfeiçoar a obtenção de clones de batata isentos de viroses, tem sido testado com sucesso o uso combinado do tratamento térmico e cultura de meristema, proporcionando uma alta taxa de erradicação da maioria dos vírus da cultura. Principalmente com relação ao PVS, vírus que apresenta maior resistência à eliminação através do cultivo de meristema, STACE-SMITH & MELLOR (42), KASSANIS & VARMA (22), e MACDONALD (26) demonstraram que o pré-tratamento com calor das plantas, por algumas semanas, com posterior cultivo in vitro dos meristemas, aumentou significativamente a erradicação deste vírus.

Com a obtenção de plântulas livres de vírus, tornou-se necessário aumentar a eficiência da multiplicação destes tecidos saudios. Segundo ROCA et alii (38), isto foi possível através do deno

minado cultivo "multi-meristemático", que consiste no cultivo de segmentos do caule das plântulas em meio de cultura líquido, sob constante agitação, para estimular uma rápida multiplicação das gemas, propiciando deste modo a produção em grande quantidade de material para propagação clonal. Este método proporciona altas taxas de multiplicação, contrastando-se com as taxas de 1:1 que normalmente são obtidas para os cultivos convencionais denominados "meristemas simples". Tal fato possibilita a cultura in vitro de meristema ser hoje empregada nos programas de produção de batata semente, melhoramento varietal, assim como no intercâmbio internacional de germoplasma de batata na forma clonal.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos do Departamento de Agricultura da Escola Superior de Agricultura de Lavras, Minas Gerais, no ano de 1984.

3.1. Cultivares

Em todos os testes realizados nesta pesquisa foram utilizadas as cultivares nacionais Baronesa, Santo Amor, Mantiqueira e Chiquita, e as cultivares estrangeiras Achat e Delta, exceto na determinação da eficiência da técnica na erradicação do PVS e PVX na qual empregou-se as cultivares Baronesa e Santo Amor. Estas duas foram provenientes do Centro Nacional de Fruticultura de Clima Temperado, CNPFT-EMBRAPA/RS e as demais provenientes da Fazenda Experimental da EPAMIG de Maria da Fé, MG.

Os tubérculos foram plantados em vasos (5 kg), contendo mistura de terra e composto orgânico, sendo as plantas conduzidas em casa de vegetação. Realizou-se adubação normal de plantio, de acordo com FREIRE et alii e (14) e adubações nitrogenadas semanais, pa

ra promover um maior desenvolvimento vegetativo das plantas, as quais foram utilizadas para fornecimento de meristemas para o cultivo in vitro. O controle de pragas foi realizado regularmente de acordo com as recomendações de BARBOSA & FRANÇA (4).

No período de abril a setembro, meses com dias curtos, as plantas foram submetidas às condições de dias longos, utilizando-se para isto iluminação artificial com lâmpadas incandescentes de 60 W, no sentido de retardar a tuberização e promover o crescimento vegetativo, conseqüentemente, prolongar o ciclo da cultura. Quando as plantas atingiram aproximadamente 40 cm de altura, efetuou-se a retirada das partes apicais para estimular a emissão de brotações laterais, as quais foram usadas para a remoção dos meristemas.

3.2. Operação de remoção dos meristemas

O primeiro passo foi retirar as brotações laterais das plantas doadoras conduzidas na casa de vegetação. Estas brotações com aproximadamente 1 a 2 cm de comprimento (Figura 1) foram então levadas para o laboratório onde sofreram desinfecção com hipoclorito de sódio a 1%, por um período de 10 minutos. Logo após foram enxaguadas por 3 vezes, com água destilada e autoclavada, para a remoção do desinfectante. A operação de retirada foi realizada sobre uma placa de petri contendo papel de filtro umedecido, sob uma capela de fluxo laminar esterelizada com álcool 70%. A remoção dos meristemas foi feita com o auxílio de uma lupa estereoscópica com aumento de até 40 vezes, utilizando-se uma pinça de ponta fina e bistu-

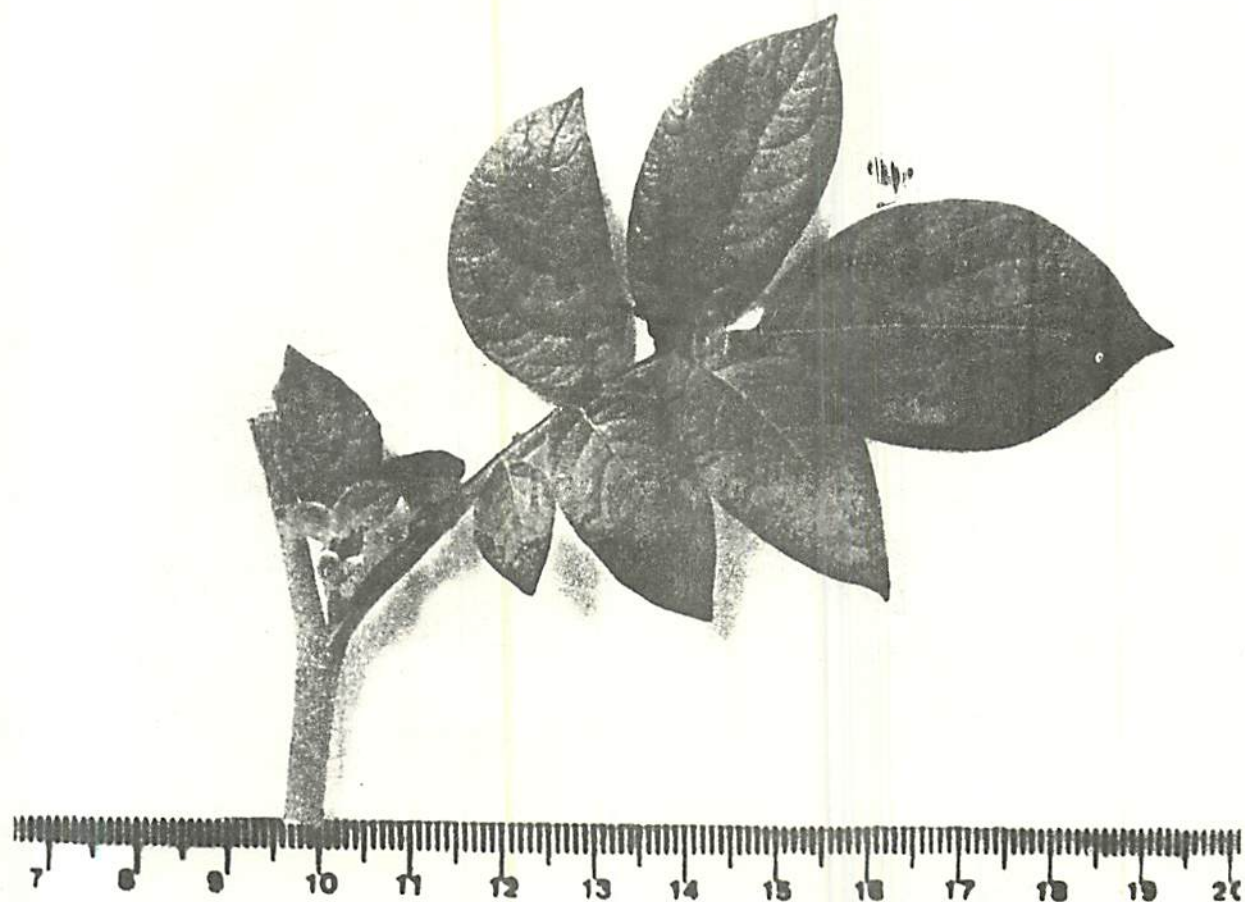


FIGURA 1. Brotação lateral (1 a 2 cm de comprimento) da planta de batata utilizada para a remoção do meristema.

ris cirúrgicos. As pequenas folhas que envolvem a porção meristemática foram removidas cuidadosamente até atingir o meristema, sendo este cortado com o tamanho de aproximadamente 0,2 a 0,3mm contendo os dois primeiros primórdios foliares (Figura 2). Todo o material utilizado durante a operação (placas de petri, pinças e bituris) foi previamente autoclavado a 120°C a 1 atm por 20 minutos. Após a remoção, os meristemas foram rapidamente colocados em tubos de ensaio contendo meio de cultura e levados para a sala de crescimento com ambiente controlado, onde permaneceram até atingirem o estágio de plântula.

3.3. Meio de cultura e condições ambientais

O meio de cultura básico utilizado foi o de MURASHIGE & SKOOG (32), cujos componentes e suas respectivas concentrações estão no Quadro 1. O meio de cultura básico (MB) foi suplementado com os seguintes reguladores de crescimento: auxina (ácido nafenilacético-ANA); giberelina (ácido giberélico-GA₃) e citocininas (6-benzilaminopurina-BAP e 6-furfuril-aminopurina-KINETINA), em concentrações variando de acordo com as exigências das várias fases de desenvolvimento in vitro. Soluções estoques de todos os componentes do meio de cultura foram preparadas e armazenadas em geladeira a 4°C, exceto a sacarose e o agar que foram pesados no momento da preparação de cada meio. As soluções estoques dos hormônios foram preparadas utilizando-se 2-3 ml de uma solução a 0,5 N de NaOH como solvente para auxinas e giberelinas e 2-3 ml de uma solução 0,5 N de HCl como solvente para as citocininas. Em to

QUADRO 1. Composição do meio de cultura de Murashige e Skoog (MS) modificado.

Solução estoque	Compostos	Concentração final do meio de cultura (mg/l)
A	$\text{NH}_4 \text{NO}_3$	1650
B	KNO_3	1900
C	H_3BO_3	6,2
	KH_2PO_4	170
	KI	0,83
	$\text{Na}_2 \text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0,25
	$\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	0,025
D	$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	440
E	$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	370
	$\text{MnSO}_4 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	22,3
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	8,6
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	0,025
F	$\text{Na}_2 \text{EDTA}$	37,25
	$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	27,85
	TIAMINA	0,5
	PIRIDOXINA	0,5
	ÁCIDO NICOTÍNICO	0,5
	MIO-INOSITOL	100
	SACAROSE	30000
	ÁGAR	8000
	GLICINA	2,0

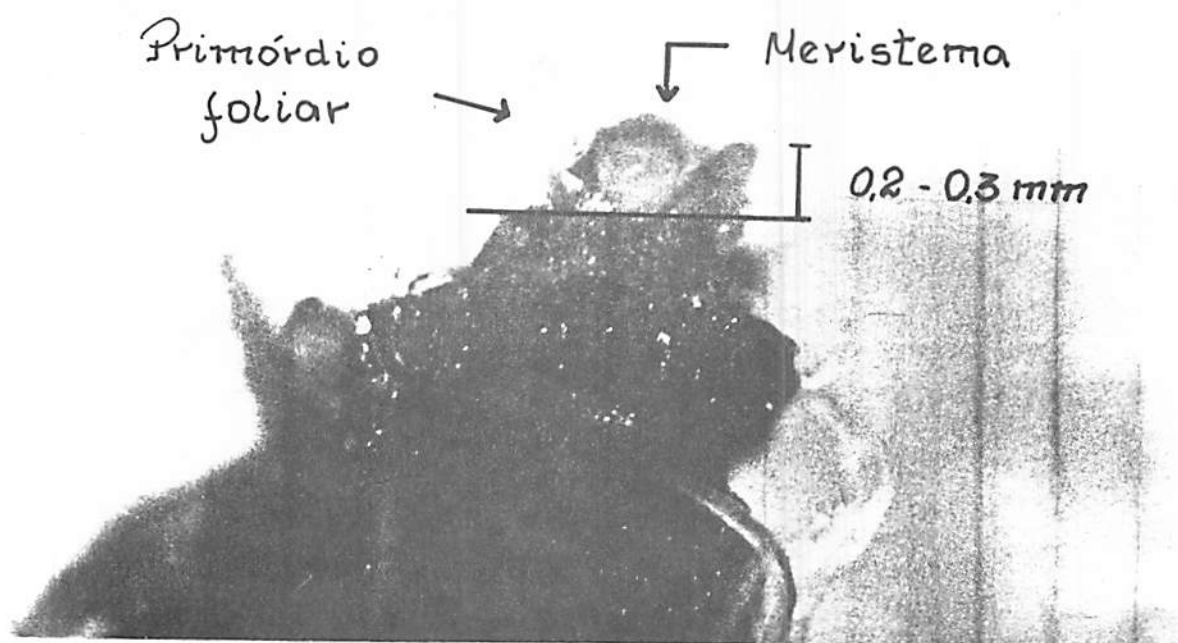


FIGURA 2. Meristema de batata contendo os dois primeiros primórdios foliares.

dos os meios de cultura utilizados durante a pesquisa, o pH foi ajustado para $5,7 \pm 0,1$, utilizando-se NaOH e/ou HCl. Após a preparação, os meios de cultura foram colocados em tubos de ensaio ou Erlenmeyer, tampados com papel alumínio e autoclavados a uma temperatura de 120°C a 1 atm, por um período de 20 minutos.

Os tubos de ensaio após receberem os meristemas foram colocados em suportes de madeira e levados para a sala de crescimento, sendo mantidos a uma temperatura de $24^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ com uma intensidade luminosa de aproximadamente 3000 lux. Empregou-se uma combinação de lâmpadas GRO-LUX e Branca Fria, com um regime de 16 horas de luz.

O desenvolvimento do meristema desde o seu cultivo até a formação de plântula completa (raiz e parte aérea normais) in vitro, foi dividido em três fases: Isolamento, Alongamento, e Multiplicação e Enraizamento.

3.4. Fase de Isolamento

Na fase de isolamento, compreendida desde a remoção do meristema até um período de aproximadamente 30 a 35 dias de cultivo in vitro, foram testados dois meios de cultura: MB suplementado com 0,4 mg/l de KINETINA e 0,1 mg/l de GA_3 e MB + 1 mg/l de BAP, 0,01 mg/l de ANA e 0,1 mg/l de GA_3 . Após a preparação dos meios de cultura colocou-se 10 ml por tubo de ensaio (18 x 150mm) utilizando-se no mínimo dez meristemas por variedade e para cada tratamento. Avaliou-se o desenvolvimento dos meristemas de cada culti

var determinando-se taxas de crescimento através de observações visuais periódicas, empregando-se um sistema de notas onde: 0 - meristema não desenvolvido; 1 - meristema pouco desenvolvido; 2- formação de callus (tecido não diferenciado); 3 - formação de callus com brotações (callus organogênico); 4 - formação de brotações com folhas expandidas e desenvolvidas ("roseta") e 5 - formação de plântulas.

3.5. Fase de Alongamento

A fase de alongamento compreendeu o período entre o final da fase de isolamento do meristema até este atingir o estágio de plântula. Baseado em observações de alguns pesquisadores (15, 16, 19) que consideram o GA_3 como um dos principais reguladores de cres-cimento responsáveis pelo alongamento dos tecidos, utilizaram-se várias concentrações deste hormônio e também uma combinação gibereli-na-citocinina como controle. Os meios de cultura testados foram MB suplementado com 0,5 mg/l de GA_3 e 5 mg/l de BAP; MB + 0,0 mg/l de GA_3 ; MB + 0,01 mg/l de GA_3 ; MB + 0,1 mg/l de GA_3 e MB + 1,0 mg/l de GA_3 . Após um período de aproximadamente 30 dias de cultivo no meio de isolamento, os meristemas foram transferidos para tubos de ensaio contendo os meios de alongamento. Cada meio de cultura teve pelo menos um representante de cada cultivar e avaliou-se um mínimo de 10 meristemas por tratamento, utilizando-se o mesmo critério de notas adotado para as observações realizadas na fase de isolamento.

3.6. Fase de multiplicação e enraizamento

Quando os meristemas atingiram o estágio de plântula, estes foram transferidos para o meio de multiplicação e enraizamento, com posto pelo meio básico suplementado com 1,0 mg/l de KINETINA, 0,01 mg/l de ANA e 0,1 mg/l de GA₃. Os caulículos das plântulas foram cortados em vários segmentos contendo 1, 2 e 3 gemas e colocados em Erlenmeyers de 250 ml, contendo aproximadamente 30 ml do meio de cultura, onde permaneceram até o desenvolvimento completo com formação de raízes e parte aérea normais. As avaliações foram realizadas através de observações visuais, considerando-se um mínimo de 10 segmentos por tratamento.

3.7. Aclimação e transplântio

As plântulas com sistema radicular e parte aérea bem formadas foram transferidas primeiramente para sacos plásticos contendo vermiculita, sendo regadas inicialmente com solução nutritiva contendo os sais minerais de Murashige e Skoog. Durante a fase de aclimação as plântulas permaneceram em ambiente onde não receberam luz solar direta e após este período foram transplantadas para vasos contendo mistura de terra e matéria orgânica, sendo conduzidas em casa de vegetação.

3.8. Testes serológicos

As cultivares Baronesa e Santo Amor, as quais apresentavam tubérculos comprovadamente infectados ou não, com o complexo viral PVS-PVX, determinados através de testes serológicos, foram utilizadas para avaliar a eficiência da técnica de cultura in vitro de meristema na eliminação destes dois vírus da batata. As plantas infectadas e sadias das duas cultivares foram empregadas como controle durante a realização de todos os testes de sanidade. Os testes serológicos foram realizados antes da retirada dos meristemas para a comprovação do estado de infectividade das plantas doadoras, em relação aos 2 vírus citados e posteriormente em todas as plântulas regeneradas de meristemas das cultivares Baronesa e Santo Amor infectadas. A metodologia empregada para os testes serológicos foi aquela descrita por DANIELS et alii (10) e PAIVA et alii (36), utilizando-se antissoros sensibilizados com látex específicos para o PVS e PVX, provenientes do CNPFT-EMBRAPA/Pelotas-RS. A eficiência da técnica na eliminação dos vírus em estudo foi determinada avaliando-se a percentagem de plântulas livres do PVS e PVX em relação ao total de plântulas testadas.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Comportamento das plantas de batata

Um fator que mostrou ser fundamental no controle da capacidade vegetativa foi o fotoperíodo. Após a instalação de iluminação artificial na casa de vegetação, verificou-se que as plantas mantidas sob 24 horas de luz apresentaram uma pequena formação de tubérculos e intenso estado vegetativo, aumentando a capacidade de fornecimento de brotações em todas as cultivares estudadas.

Deste modo verificou-se que com o recurso de iluminação e também como a realização de adubações nitrogenadas periódicas (semanais), foi possível obter-se um adequado fornecimento de brotações das quais retiraram-se os meristemas para o cultivo in vitro.

A condução em casa de vegetação foi vantajosa, pois facilitou o manejo das plantas e permitiu o escalonamento na produção de brotações com um eficiente controle do estado vegetativo. Cada planta forneceu em média 40 a 60 brotações durante seu ciclo.

Na operação de remoção dos meristemas observou-se que o estágio das brotações laterais foi muito importante para o sucesso da operação. As plantas em fase de tuberização apresentaram um grande número de brotações diferenciadas em gemas florais, fato que inviabilizou estas porções de crescimento serem utilizadas para a retirada dos meristemas. O tamanho das brotações também foi importante, pois este influenciou na facilidade da operação. Verificou-se que brotações mais novas (menores que 1 cm) apresentaram os meristemas bastante tenros e pouco desenvolvidos, dificultando a visualização e remoção dos mesmos. O tamanho entre 1 e 2 cm mostrou ser ideal, sendo que um aumento de 20 até 40 vezes na lupa estereoscópica foi adequado para a realização de toda a operação.

Observou-se diferenças entre as cultivares com relação à facilidade e/ou dificuldade na remoção dos meristemas, sendo que a cultivar Chiquita apresentou maior dificuldade devido à grande quantidade de pelos presentes nas brotações, fato que prejudicou a visualização da porção meristemática, o que não ocorreu, por exemplo com a cultivar Baronesa.

4.2. Desenvolvimento in vitro do meristema de batata

Em todas as seis cultivares estudadas, observou-se que durante o cultivo in vitro, o meristema passa por estádios distintos de desenvolvimento até este atingir o estágio de plântula com parte aérea e sistema radicular completamente formados. Após um período de 7-8 dias de cultivo, observou-se leve crescimento do meriste

ma com início da formação de callus, e aproximadamente aos 20 dias após o isolamento, havia formado massa de callus não friável, esverdeada e granulosa abaixo e ao redor do meristema isolado. Ao final de 30 dias já podia observar-se a diferenciação dos tecidos, com a emissão de inúmeras brotações na superfície desta massa de callus, sendo esta formação denominada callus organogênico.

Tal fato se verificou principalmente em relação à cultivar Baronesa, que apresentou uma estrutura mais desenvolvida em relação às demais cultivares. As brotações emitidas a partir do callus organogênico alongaram-se e as primeiras folhas começaram a desenvolver-se, sendo que após um período de 10 a 12 dias posterior ao seu surgimento, estas encontraram-se bastante expandidas. A esta estrutura denominou-se "roseta". Ao final de aproximadamente 2 meses de cultivo in vitro o meristema apresentou-se regenerado em plântula, com parte aérea completamente desenvolvida e início de formação do sistema radicular, fato que foi observado em todas as cultivares, porém com maior precocidade nas cultivares Baronesa e Santo Amor. Estas observações realizadas durante o desenvolvimento in vitro de meristema de batata foram semelhantes às aquelas encontradas por ROCA et alii (38) trabalhando com a propagação in vitro de cultivares de batata. A Figura 3 mostra os vários estádios de desenvolvimento do meristema em meio de cultura. Estes estádios podem ser inseridos dentro de três fases distintas que caracterizam todo o processo de desenvolvimento in vitro de meristema de batata, sendo: fase de isolamento, de alongamento e de multiplicação e enraizamento.

[REDACTED]



FIGURA 3. Estádios de desenvolvimento in vitro de meristema de batata. Da esquerda para direita: iniciação e crescimento de callus, callus organogênico, "roseta" e plântula.

4.3. Fase de isolamento

Os resultados observados na fase de isolamento, onde procurou-se avaliar o desenvolvimento de cada cultivar em dois meios de cultura, estão apresentados no Quadro 2.

Observou-se após 30 dias de cultivo um comportamento diferenciado entre as cultivares em ambos os meios de cultura (Figura 4 e 5) sendo a cultivar Baronesa a que mostrou maior desenvolvimento com emissão de um grande número de brotações a partir da formação de callus organogênico. As cultivares Mantiqueira, Chiquita e Delta foram as que apresentaram menor desenvolvimento, com reduzida formação de callus e pequena emissão de brotações. Um desenvolvimento intermediário foi observado nas cultivares Santo Amor e Achat, com formação de callus e brotações ao final da fase de isolamento, porém em intensidade menor que a cultivar Baronesa.

Apesar das cultivares de batata terem recebido as mesmas notas nos dois meios de cultura, os meristemas cultivados no meio básico suplementado com 0,01 mg/l de ANA; 0,1 mg/l de GA₃ e 1,0 mg/l de BAP, apresentaram formação mais abundante de callus, sendo que ao final da fase de isolamento, várias brotações haviam emergido na superfície desta massa de callus, principalmente na cultivar Baronesa (Figura 4).

Por outro lado, os meristemas cultivados no meio de cultura suplementado com 0,4 mg/l de KINETINA e 0,1 mg/l de GA₃, apresentaram pequena formação de callus e após aproximadamente 30 dias

QUADRO 2. Desenvolvimento comparativo de cultivares de batata durante a fase de isolamento do meristema em dois meios de cultura.

Meio de cultura ^{1/}	Cultivares	Nº meristemas avaliados	Notas médias ^{2/}
MB + 0,01 ANA 0,1 GA ₃ +1,0 BAP	Baronesa	10	3,0
	Santo Amor	10	3,0
	Achat	10	3,0
	Delta	10	2,0
	Chiquita	10	2,0
	Mantiqueira	10	2,0
MB + 0,1 GA ₃ + + 0,4 KINETINA	Baronesa	10	3,0
	Santo Amor	10	3,0
	Achat	10	3,0
	Delta	10	2,0
	Chiquita	10	2,0
	Mantiqueira	10	2,0

^{1/} MB - Meio Básico de Murashige e Skoog

^{2/} Notas: 0 - Meristema não desenvolvido

1 - Meristema pouco desenvolvido

2 - Formação de callus

3 - Formação de callus organogênico

4 - Formação de "roseta"

5 - Formação de plântulas

MS 0,01 ANA
0,1 GA₃ 1 BAP

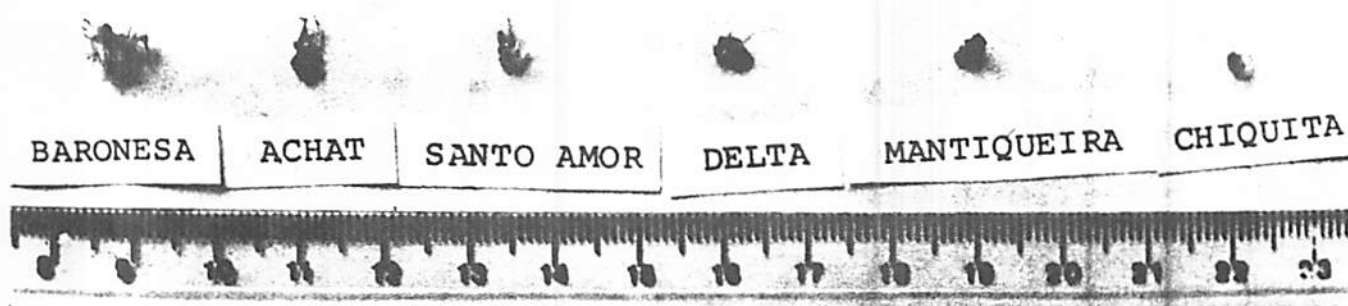


FIGURA 4. Desenvolvimento comparativo de meristemas de cultivares de batata aos 30 dias de cultivo em meio básico com 0,01 mg/l de ANA; 0,1 mg/l de GA₃ e 1,0 mg/l de BAP.

MS 0,1 GA₃
0,4 KINETINA

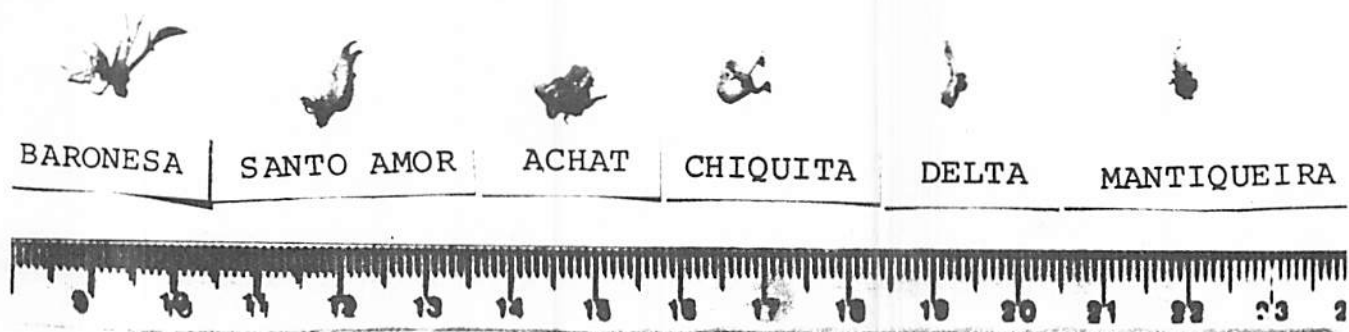


FIGURA 5. Desenvolvimento comparativo de meristemas de cultivares de batata aos 30 dias de cultivo em meio básico com 0,1 mg/l de GA₃ e 0,4 mg/l de KINETINA.

de cultivo in vitro observou-se que os dois primórdios foliares fo-
havam se desenvolvido e mostraram aspecto estiolado de cor verde
pouco intensa (Figura 5). A menor formação de callus neste meio
certamente deve-se à ausência de auxina no meio de cultura, fato
que concorda com observações feitas por vários autores (16, 31, 35),
que demonstraram ser as auxinas os principais hormônios responsá-
veis pela indução e formação de callus nos tecidos.

Observou-se então que nas cultivares em estudo a formação
de uma estrutura intermediária de callus organogênico promoveu me-
lhor desenvolvimento dos meristemas. Tipo semelhante de organogêne-
se foi descrito por EARLE & LANGHANS (12) em Chrysantemum e por BO-
XUS (7) em morango, em cultivos de ápices caulinares utilizando-se
a combinação auxina-citocinina.

Portanto, a formação de massa de callus durante o cultivo
in vitro favoreceu a emissão de grande número de brotações a par-
tir do callus organogênico. Tal fato não ocorreu com aqueles meris-
temas cultivados em meio de cultura com ausência de auxina, os
quais, na maioria das vezes, emitiram uma e/ou duas brotações com
aspecto retorcido e menor vigor. Com a continuação do desenvolvi-
mento, estas observações tornaram-se ainda mais evidentes como mos-
tra a Figura 6.

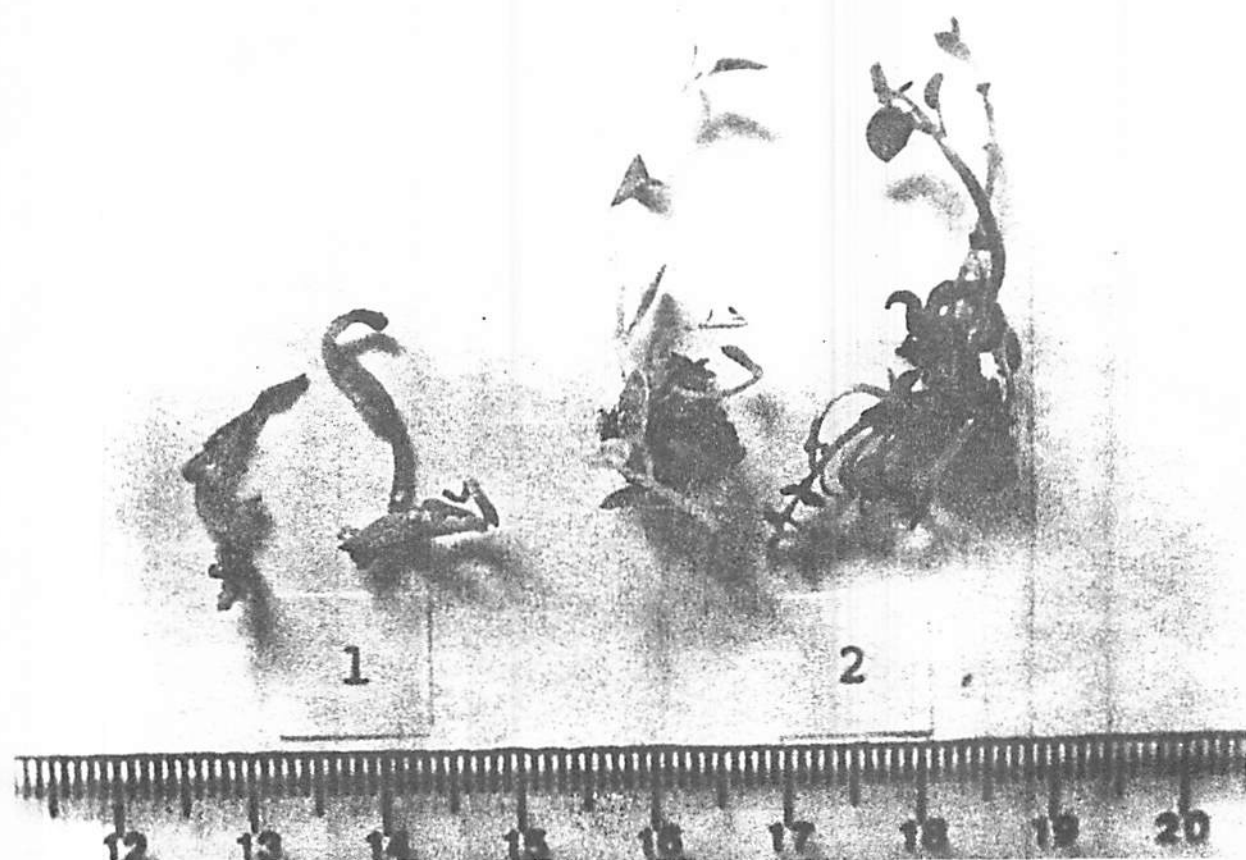


FIGURA 6. Desenvolvimento comparativo de meristemas de batata aos 45 dias de cultivo in vitro sendo: 1 - meristemas cultivados em meio básico com 0,1 mg/l de GA₃ e 0,4 mg/l de KINETINA; 2 - meristemas cultivados em meio básico com 0,1 mg/l de ANA; 0,1 mg/l de GA₃ e 1,0 mg/l de BAP.

4.4. Fase de alongamento

Na fase de alongamento observou-se uma grande diferença no desenvolvimento das brotações provenientes do callus organogênico nos cinco meios de cultura testados, sendo estes resultados representados no Quadro 3. O meio de cultura que apresentou maiores taxas de desenvolvimento foi aquele composto pelo meio básico suplementado com 0,5 mg/l de GA₃ e 5,0 mg/l de BAP, com a formação de plântulas mais vigorosas em relação aos demais meios de cultura (Figura 7). A combinação BAP + GA₃ promoveu um rápido alongamento das brotações originadas a partir do callus organogênico e simultaneamente a formação e expansão das folhas originadas nas gemas. Tal fato deveu-se provavelmente à ação sinérgica do BAP e GA₃, promovendo um rápido e vigoroso alongamento das brotações, como também foi observado por MARANI & PISA (27) e ROCA et alii (38), os quais verificaram que a ação combinada destes dois hormônios promoveu melhor desenvolvimento in vitro. O meio de cultura que continha a concentração de 0,1 mg/l de GA₃ foi o único que apresentou desenvolvimento satisfatório, sendo que nas demais concentrações observou-se uma pequena taxa de alongamento e um pequeno número de brotações emitidas. Ao final de aproximadamente 20 a 25 dias de cultivo no meio de alongamento, os meristemas atingiram o estágio de plântulas com parte aérea bem desenvolvida e início de formação do sistema radicular. Nesta fase não observou-se grande influência do genótipo nas taxas de alongamento das brotações, sendo que todas as cultivares apresentaram desenvolvimento semelhante dentro de cada tratamento.

QUADRO 3. Desenvolvimento comparativo de meristemas de batata em cinco meios de cultura durante a fase de alongamento.

Meios	Nº de meristemas avaliados	Média das ^{2/} notas
MB + 0,5 GA ₃ + 5,0 de BAP	10	5,0
MB + 0,0 GA ₃	10	3,0
MB + 0,01 GA ₃	10	4,0
MB + 0,1 GA ₃	10	5,0
MB + 1,0 GA ₃	10	4,0

1/ MB = Meio básico de Murashige e Skoog

2/ Notas: 0 - Meristema não desenvolvido

1 - Meristema pouco desenvolvido

2 - Formação de callus

3 - Formação de callus organogênico

4 - Formação de "roseta"

5 - Formação de plântula.

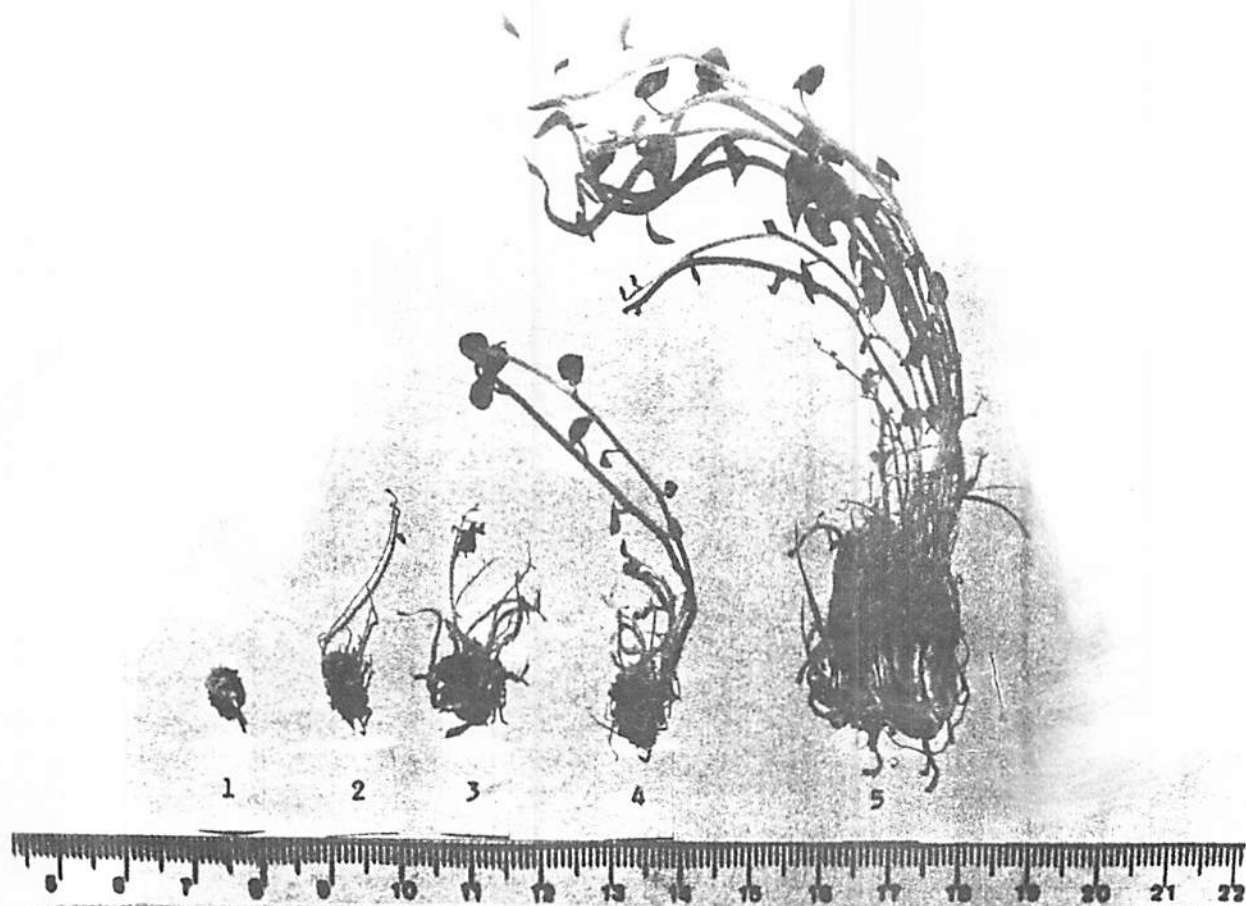


FIGURA 7. Desenvolvimento comparativo de meristemas de batata aos 60 dias de cultivo sendo: 1 - meristema em meio básico com 0,0 mg/l de GA_3 ; 2 - meristema em meio básico com 0,01 mg/l de GA_3 ; 3 - meristema em meio básico com 1,0 mg/l de GA_3 ; 4 - meristema em meio básico com 0,1 mg/l de GA_3 ; 5 - meristema em meio básico com 0,5 mg/l de GA_3 e 5 mg/l de BAP.

4.5. Fase de multiplicação e enraizamento

Geralmente a multiplicação in vitro de batata é realizada em meio de cultura líquido sob constante agitação, fato que propicia uma rápida proliferação das plântulas, como relatam ROCA et alii (38) e DRIESSEN (11). Entretanto nesta pesquisa o meio básico suplementado com 0,01 mg/l de ANA, 0,1 mg/l de GA₃ e 1,0 mg/l de KINETINA solidificado com 0,6% de agar, também promoveu uma rápida e vigorosa multiplicação das plântulas regeneradas durante a fase de alongamento e ao final de aproximadamente 30 dias de cultivo no meio de multiplicação, observou-se um aumento significativo do número de plântulas e desenvolvimento do sistema radicular (Figura 8).

Através de observações visuais periódicas, verificou-se que as taxas de desenvolvimento variaram com o número de gemas contidas nos segmentos transferidos para o meio de multiplicação e enraizamento. Os segmentos contendo apenas 1 gema apresentaram desenvolvimento mais rápido das brotações e após aproximadamente 2 a 3 semanas de cultivo, já mostraram início da formação do sistema radicular e vários outros brotos emitidos a partir da brotação inicial. Por outro lado, nos segmentos com 3 gemas, observou-se a emissão simultânea de três brotações, porém estas apresentaram taxa de desenvolvimento mais lenta, devido provavelmente ao efeito de competição ocorrido entre as gemas. O segmentos contendo 2 gemas mostraram desenvolvimento intermediário, com lançamento simultâneo de duas brotações que posteriormente ramificaram-se produzindo novos brotos. O desenvolvimento comparativo entre os tamanhos de seg

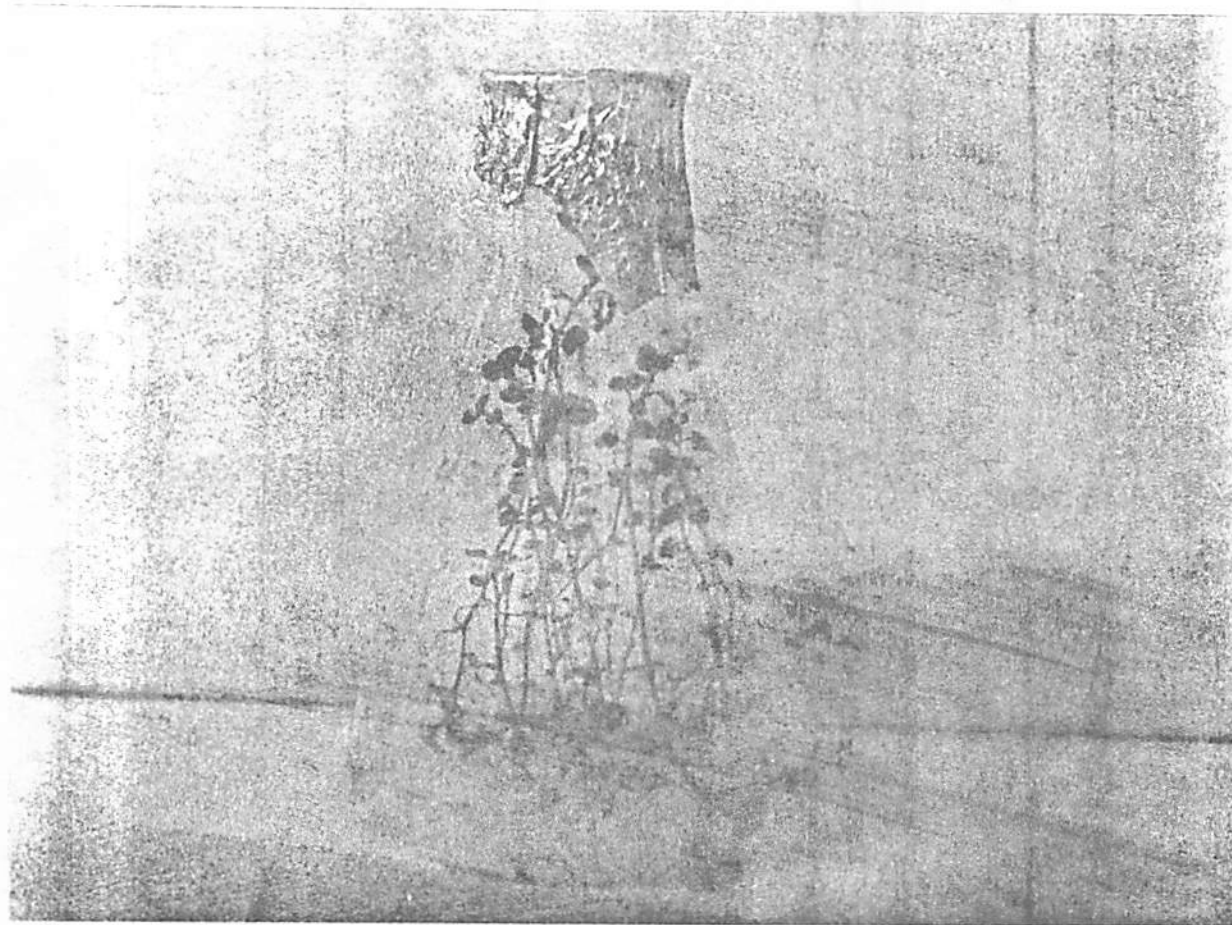


FIGURA 8. Plântulas da cultivar Baronesa aos 90 dias de cultivo in vitro.

mentos pode ser visualizado na Figura 9.

Um grande problema surgido durante a fase de multiplicação e enraizamento foi a contaminação do meio de cultura por bactérias e fungos. Na tentativa de minimizar este problema, adicionou-se ao meio de cultura uma solução combinada dos antibióticos Streptomicina e Despacilina na dosagem de 50 ppm/l, após a autoclavagem do meio. Este processo foi efetivo, proporcionando uma sensível redução nos níveis de contaminação por bactérias. Com relação à contaminação por fungos, a princípio utilizou-se algodão e papel alumínio para tampar os Erlenmeyers, mas posteriormente verificou-se que o algodão favorecia o desenvolvimento de fungos (principalmente do gênero Penicillium) que esporulavam e contaminavam o meio de cultura. Passou-se então a utilizar apenas o papel alumínio, reduzindo-se a contaminação a níveis aceitáveis.

4.6. Aclimação e transplântio

Nesta pesquisa realizou-se estudos preliminares de transferência para o solo de plântulas produzidas em laboratório. Das 6 plântulas transferidas, 4 sobreviveram até à maturidade, indicando que esta operação pode ser realizada com certa facilidade, como relatam MARANI & PISI (27), que obtiveram taxas de 95% de sobrevivência das plântulas transplantadas.

O pegamento ocorreu entre 5 e 6 dias após a transferência das plântulas para o meio com vermiculita (Figura 10), sendo então transplantadas para vasos de barro (Figura 11) contendo mistura de



FIGURA 9. Desenvolvimento comparativo do tamanho dos segmentos do caule de batata contendo 1, 2 ou 3 gemas aos 21 dias de cultivo in vitro em meio de multiplicação.

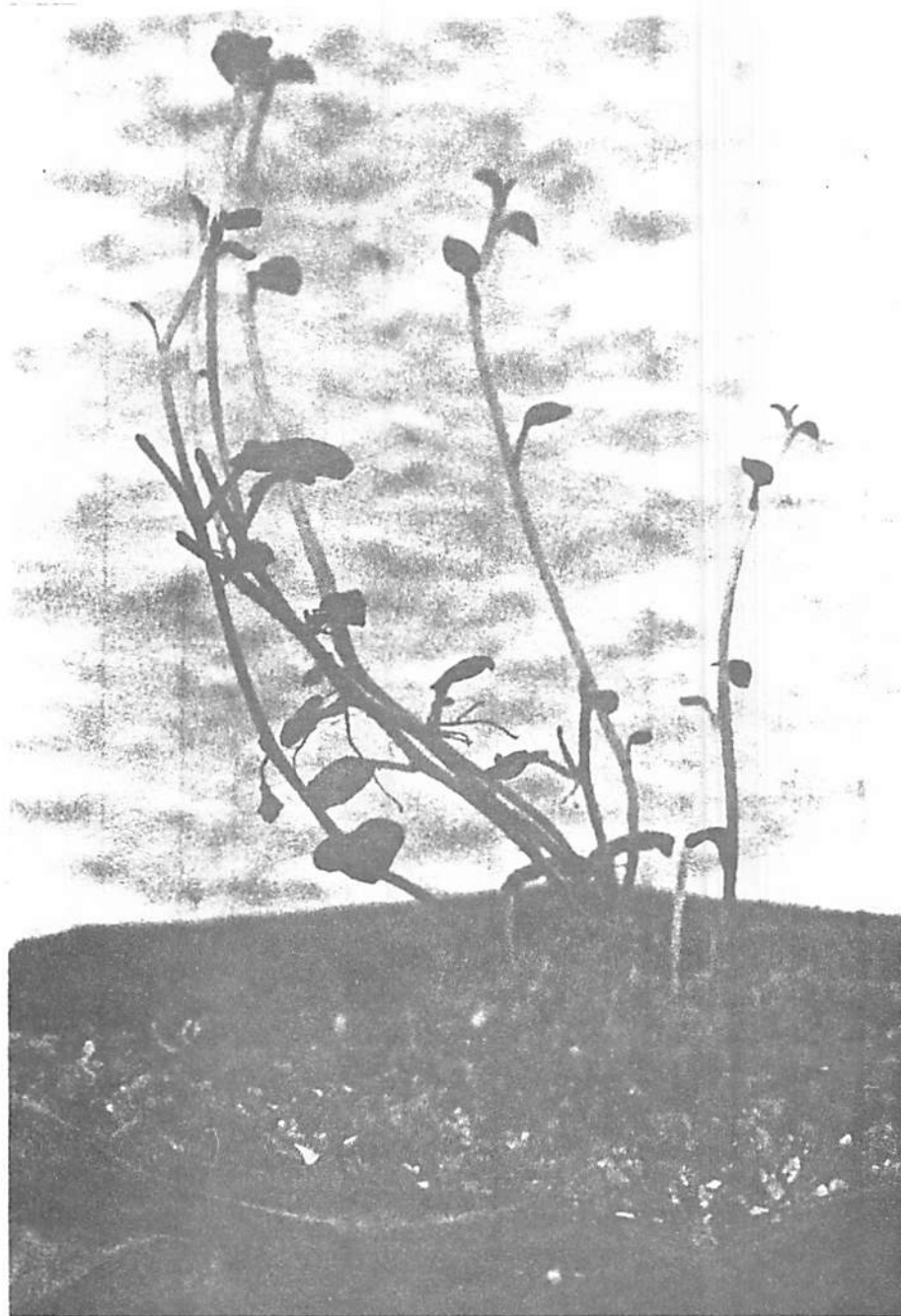


FIGURA 10. Plântula de batata da cultivar Baronesa transferida para a vermiculita proveniente do cultivo in vitro de meristema.



FIGURA 11. Planta de batata da cultivar Baronesa transplantada da vermiculita para o vaso contendo mistura de terra e composto orgânico proveniente do cultivo in vitro de meristema.

terra e matéria orgânica.

4.7. Rendimento da técnica de cultura in vitro de meristemas de batata.

O rendimento da técnica de cultura de tecido in vitro de meristema foi determinado ao final do trabalho avaliando-se as percentagens de regeneração de plântulas em relação ao número de meristemas isolados, cujos resultados estão apresentados no Quadro 4.

Verificou-se um comportamento diferenciado entre as cultivares, sendo Baronesa e Santo Amor as que apresentaram maiores taxas de regeneração, produzindo plântulas vigorosas com grande número de brotações, principalmente em relação à Baronesa. As cultivares Mantiqueira e Chiquita mostraram menor resposta ao cultivo in vitro, originando plântulas com aspecto estiolado e com menor vigor. Uma percentagem de regeneração intermediária foi verificada nas cultivares Achat e Delta.

Estes resultados mostraram existir influência varietal de terminando as taxas de regeneração das plântulas durante o processo de desenvolvimento in vitro de meristema de batata, como também foi verificado por Quak citado por MELLOR & STACE-SMITH (28), e ROCA et alii (38).

As taxas de regeneração de plântulas obtidas neste trabalho podem ser consideradas elevadas quando comparadas àquelas observadas por KASSANIS & VARMA (22), 10,5%; MACDONALD (26), 11,6%,

QUADRO 4. Rendimento da técnica de cultura in vitro de meristema de cultivares de batata.

Cultivar	Total de meristemas isolados (nº)	Nº plântulas regeneradas	% de regeneração
Mantiqueira	40	17	42,5
Chiquita	40	19	47,5
Delta	40	23	57,5
Achat	40	21	52,5
Santo Amor	120	72	60,0
Baronesa	80	51	72,9

MARANI & PISI (27), 21%; STACE-SMITH & MELLOR (42), 37%; SIP (40), 42% e Pennazio e Vecchiati citado por MARANI & PISI (27), 52,6%.

4.8. Eficiência na Erradicação do vírus S e vírus X da batata

O emprego do teste serológico de látex sensibilizado com anticorpos mostrou ser um método prático, rápido e sensível para a diagnose de viroses de batata, principalmente quando comparado ao uso de plantas indicadoras que, segundo CUPPERTINO & COSTA (9) podem levar de 35-50 dias para fornecer resultados seguros. O uso desta técnica possibilitou a certificação da sanidade das plantas regeneradas in vitro, provenientes de meristemas extraídos de plantas infectadas com o PVS e PVX. Para a verificação de sanidade retirou-se uma pequena porção do tecido das plântulas, sendo necessário apenas uma gota do suco celular para a realização dos testes serológicos. A leitura dos resultados positivos foi facilmente identificada pela formação de precipitados em meio ao líquido clarificado da gota.

Os resultados obtidos das plântulas regeneradas de meristemas provenientes das cultivares Baronesa e Santo Amor, ambas infectadas com o complexo viral PVS-PVX, são mostrados no Quadro 5.

Constatou-se que nas cultivares Santo Amor e Baronesa, a cultura de meristema foi mais eficiente na erradicação do PVX apresentando 71 e 77%, respectivamente das plântulas testadas livres de vírus. Estas percentagens foram superiores às encontradas por WANG & HUANG (43) de 46%, e MACDONALD (26) de 50%, porém inferiores às percentagens obtidas por KASSANIS & VARMA (22) de aproximadamente 100%. Com relação ao PVS, as taxas de erradicação nas

QUADRO 5. Eficiência da técnica de cultivo in vitro de meristema de batata na erradicação do PVS e PVX nas cultivares Baronesa e Santo Amor.

Cultivar	Nº plântulas testadas	Nº plântulas livres de PVX	Nº plântulas livres de PVS	Nº plântulas livres do PVS e PVX
Baronesa	30	23 (77%)	13 (43%)	12 (40%)
Santo Amor	41	29 (71%)	10 (24%)	8 (20%)

cultivares Santo Amor e Baronesa decresceram sensivelmente apresentando 24 e 43% respectivamente das plântulas livres deste virus. Estes resultados confirmam as observações realizadas por vários autores (22, 26, 42, 45) indicando que o PVS apresenta maior resistência em ser erradicado, empregando-se apenas o método de cultura de meristemas. Entretanto, a eficiência da técnica pode ser aumentada com a aplicação de tratamento prévio com calor (termoterapia), como demonstraram STACE-SMITH & MELLOR (42) e MACDONALD (26), onde o uso combinado do tratamento térmico e cultura de meristema possibilitaram a obtenção de taxas de erradicação do PVS de aproximadamente 60%. Na cultivar Baronesa as taxas de erradicação dos dois virus testados foram superiores à Santo Amor mostrando existir uma variabilidade entre as cultivares com relação à erradicação do PVS e do PVX.

É interessante observar que todas as plântulas, exceto uma, livres do PVS também estavam livres do PVX apresentando uma taxa de erradicação variando entre 20 e 40% nas cultivares Santo Amor e Baronesa, respectivamente. Um ponto a ser ressaltado é que a obtenção de 1 única planta sadia deve ser considerada sucesso, pois esta plântula poderá ser multiplicada indefinidamente em condições de laboratório, possibilitando o aumento geométrico do material livre de virus, não necessitando portanto, retornar-se ao processo inicial de remoção do meristema.



5. CONCLUSÕES

Este trabalho mostrou que plântulas completas das cultivares Baronesa, Santo Amor, Chiquita, Mantiqueira, Delta e Achat foram regeneradas e multiplicadas em grande quantidade in vitro através do cultivo de meristema.

Durante o cultivo in vitro, em todas as cultivares estudadas observou-se que o meristema passa por estádios distintos de desenvolvimento até este ser regenerado em plântula completa.

Na fase de isolamento o meio de cultura contendo auxina promoveu melhor desenvolvimento com abundante formação de callus. O crescimento das brotações foi superior no meio de alongamento contendo a combinação giberelina-citocinina e o meio de cultura semi-sólido propiciou uma rápida e vigorosa multiplicação das plântulas regeneradas in vitro.

A técnica permitiu a obtenção de plântulas livres do PVS e PVX provenientes de meristema de plantas das cultivares Baronesa e Santo Amor comprovadamente infectadas, sendo que o PVS apresentou maior resistência em ser erradicado por este método. Na culti-



var Baronesa as taxas de erradicação foram superiores, mostrando existir uma variabilidade entre as cultivares com relação à erradicação do PVS e do PVX.

Das cultivares estudadas, a Baronesa e Santo Amor apresentaram as maiores taxas de regeneração, indicando existir um comportamento diferenciado das cultivares de batata diante da técnica de cultura de meristema.

6. RESUMO

Seis cultivares de batata (Baronesa, Santo Amor, Mantiqueira, Chiquita, Delta e Achat) foram submetidas à técnica de cultura in vitro de meristema no Laboratório de Cultura de Tecidos da Escola Superior de Agricultura de Lavras, no ano de 1984.

Durante o processo de desenvolvimento in vitro até à formação de plântula completa, verificou-se que o meristema passa por três fases distintas, cada uma requerendo combinação e concentrações específicas de hormônios.

- Na fase de isolamento do meristema o meio básico suplementado com 0,01 mg/l de ANA; 0,1 mg/l de GA₃ e 1,0 mg/l de BAP promoveu melhor desenvolvimento, sendo a cultivar Baronesa aquela que apresentou melhor resposta com abundante formação de callus e emissão de maior número de brotações.

O alongamento das brotações foi maior no meio de cultura suplementado com 0,5 mg/l de GA₃ e 5,0 mg/l de BAP com a obtenção de plântulas mais vigorosas e destacadamente mais desenvolvidas, sendo que na fase de alongamento as cultivares apresentaram comportamento semelhante.

O meio de multiplicação e enraizamento suplementado com 0,01 mg/l de ANA; 0,1 mg/l de GA₃ e 1,0 mg/l de KINETINA promoveu uma rápida e vigorosa multiplicação in vitro, possibilitando a produção de um grande número de plântulas completas.

Das cultivares estudadas, a Baronesa e Santo Amor apresentaram as maiores taxas de regeneração in vitro (72,9 e 60,0% respectivamente), produzindo plântulas com maior vigor, indicando existir um comportamento diferenciado das cultivares de batata diante da técnica de cultura de meristema.

Empregando-se o teste de látex sensibilizado com anticorpos para certificação de sanidade das cultivares Baronesa e Santo Amor, constatou-se que o vírus X da batata (PVX) foi facilmente eradicado pela cultura in vitro de meristema, com a média de 74% das plântulas testadas livres deste vírus, enquanto o vírus S (PVS) apresentou maior resistência com a taxa média de erradicação em torno de 34%. Na cultivar Baronesa as taxas de erradicação foram superiores, mostrando existir uma variabilidade entre as cultivares com relação à erradicação do PVS e do PVX.

7. SUMMARY

Complete virus-free plantlets of the cultivars Baronesa, Santo Amor, Mantiqueira, Chiquita, Achat e Delta were regenerated in vitro, in a sequential procedure from a single isolated shoot tip. During the development in vitro the meristem went through three distinct stages: culture initiation, growth, and proliferation and rooting. The medium in each stage that provided the best development was for culture initiation: Murashige-Skoog (MS) basal components supplemented with 0,01 mg/l of NAA, 0,1 mg/l of GA₃ and 1,0 mg/l of BAP; growth stage: MS supplemented with 5,0 mg/l of BAP and 0,5 mg/l of GA₃; and proliferation and rooting stage: MS supplemented with 0,01 mg/l of NAA, 0,1 mg/l of GA₃ and 1,0 mg/l of Kinetin.

Among the cultivars studied Baronesa and Santo Amor had the best survival rate (72,9% and 60,0% respectively) and vigor.

Plantlets of the cultivars Baronesa and Santo Amor were indexed by Latex Sensitized Antiserum against Potato Virus X (PVX) and Potato Virus S (PVS). Erradication was 74% for PVX and 34% for PVS.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. A. RODRIGUEZ, J.; ROA, J. & BELTRAN, J. El cultivo de meristema de yuca. Cali, CIAT, 1980. 40p.
2. BAJAJ, Y.P.S. & DIONNE, L.A. Virus x free roots from infected potato plants. American Potato Journal, Washington, 43(10): 384, Oct. 1966.
3. BARBOSA, S.; AVILA, A.C.; FRANÇA, G.H. & OGAWA, S. Vetores das principais viroses de batata no Brasil e seu controle. s.n. t. 2p. (Mimeografado. Trabalho apresentado no Seminário "Álvaro Santos Costa" sobre viroses de batata, Campinas, 8-9 maio, 1984).
4. BARBOSA, S. & FRANÇA, F.H. Pragas da batata e seu controle. In forme Agropecuário, Belo Horizonte, 7(76):55-61, abr. 1981.
5. BAWDEN, F.C. & KASSANIS, B. The potato variety King Edward VII and paracrinkle virus. Report Rothamsted Experimental Station, St. Albans, 1964:282-90, 1965..

6. BEEMSTER, A.B.R. & ROZENDAAL, A. Potato viruses: properties and symptoms. In: BOKX, J.A., ed. Viruses of potatoes and seed - potato production. Wageningen, Centre for Agricultural Publishing and Documentation, 1972. p.115-43.
7. BOXUS, P. The production of strawberry plants by in vitro micropropagation. The Journal of Horticultural Science, London, 49:209-10, 1974.
8. CUPERTINO, F.P. & COSTA, A.S. Avaliação das perdas causadas por virus na produção de batata. I. virus do enrolamento da folha. Bragantia, Campinas, 29(31):337-45, out. 1970.
9. _____ & _____. Determinação do virus do enrolamento em batatal para semente pelo uso de plantas indicadoras. Bragantia, Campinas, 29(12):127-38, abr. 1970.
10. DANIELS, J.; PAIVA, E.; ASSIS, M. & CASTRO, L.A. Obtenção e utilização de antissoros para diagnose do virus S da batata. Pelotas, EMBRAPA-UEPAE/Pelotas, 1963. 16p. (Boletim de Pesquisa, 6).
11. DRIESSEN, A.C. Estágio de capacitação desenvolvido no laboratório de cultura de tecidos da Unidade de Execução de Pesquisa de Âmbito Estadual de Cascata - UEPAE/CASCATA. Pelotas, EMPASC, 1983. 15p. (Mimeografado).

12. EARLE, E.D. & LANGHANS, R.W. Propagation of Chrysanthemum in vitro. I. Multiple plantlets from shoot tips and the establishment of tissue cultures. Journal of the American Society Horticultural Science, Mount Vernon, 99:128-32, 1974
13. FOSSARD, R.A. Tissue culture of plant propagation. New England, University of New England, 1976. 270p.
14. FREIRE, F.M.; MARTINS FILHO, C.A.S. & MONNERAT, P.H. Nutrição mineral e adubação da batata. Informe Agropecuário, Belo Horizonte, 7(76):23-30, abr. 1981.
15. GOODWIN, P.B. An improved medium for the rapid growth of isolated potato buds. Journal of Experimental Botany, London, 17(52):590-5, Aug. 1966..
16. GREGORINI, G. & LORENZI, R. Meristem - tip culture of potato plants as a method of improving productivity. Potato Research, Wageningen, 17:24-33, 1974.
17. HENSHAW, G.G. Plant tissue culture: its potential for dissemination of pathogen-free germplasm and multiplication of planting material. In: EBBELS, D.L. & KING, J.E. Plant health. Oxford, Blackwell Scientific, 1979. p.139-47.
18. HOLLINGS, M. Disease control through virus free stock. Annual Review Phytopathology, Palo Alto, 3:367-96, 1965.

19. JARRET, R.L.; HASEGAWA, P.M. & BRESSAN, R.A. Gibberellic acid regulation of adventitious shoot formation from tuber discs of potato. In vitro, Gaithersburg, 17(9):825-30, Sept. 1981.
20. KASSANIS, B. Heat inactivation of leaf-roll virus in potato tubers. Annals Applied Biology, London, 37:339-41, 1950.
21. _____. The use of tissue cultures to produce virus-free clones from infected potato varieties. Annals Applied Biology, London, 45:422-7, 1957.
22. _____ & VARMA, A. The production of virus-free clones of some British potato varieties. Annals Applied Biology, London, 59:447-50, 1967.
23. KRYLOVA, N.V.; STEPANENKO, V.I. & REIFMAN, V.G. Potato virus X in potato apical meristems. Acta Virologica, Bratislava, 17:172, 1973.
24. LANGHANS, R.W.; HORST, R.K. & EARLE, E.D. Disease-free plants via tissue culture propagation. Hortiscience, St. Joseph, 12(2):149-50, Apr. 1977.
25. LAM, S.L. Plantlet formation from potato tuber discs in vitro. American Potato Journal, Washington, 54(10):465-68, Oct. 1977.
26. MACDONALD, D.M. Heat treatment and meristem culture as a means of freeing potato varieties from viruses X and S. Potato Research, Wageningen, 16:263-9, 1973.

27. MARANI, F. & PISI, A. Meristem-tip culture and vegetative propagation in potato. Acta Horticulturae, Hague, (78):415-25, 1977.
28. MELLOR, F.C. & STACE-SMITH, R. Virus-free potatoes by tissue culture. In: REINERT, J. & BAJAJ, Y.P.S. Applied and fundamental aspects of plant cell tissue and organ culture. Berlin, Springer-Verlag, 1977. p.616-46.
29. MIZUBUTI, A. Principais viroses da batateira sob condições de Brasil Central. Informe Agropecuário, Belo Horizonte, 7(76): 46-50, abr. 1981.
30. _____; FILHO, F.S.; CARDOSO, M.R. de O. Cultivares de batata obtidas em Minas Gerais. Informe Agropecuário, Belo Horizonte, 7(76):17-9, abr. 1981.
31. MURASHIGE, T. Plant propagation through tissue cultures. Annual Review Plant Physiology, Palo Alto, 25:135-66, 1974.
32. _____ & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assay with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum, Copenhagen, 15(3):473-97, 1962.
33. NORRIS, D.A. Development of virus-free stock of Green Mountain by treatment with malachite green. Australian Journal of Agriculture Research, Melbourne, 5:658-63, 1954.

34. NORRIS, D.A. The effect of virus X on yield potatoes. Journal Australian Institute Agriculture Science, Melbourne, 19:251-6, 1953.
35. OKAZAWA, Y.; KATSURA, N. & TAGAWA, T. Effects of auxin and kinetin on the development and differentiation of potato tissue cultured in vitro. Physiologia Plantarum, Copenhagen 20(4): 862-9, 1967.
36. PAIVA, E.; DANIELS, J.; ASSIS, M. & CASTRO, L.A. Obtenção e utilização de antissoro para diagnose do virus X da batata. Pelotas, EMBRAPA-UEPAE/Pelotas, 1984. 16p. (Boletim de Pesquisa, 8).
37. PENNAZIO, S. & REDOLFI, P. Factors affecting the culture in vitro of potato meristem tips. Potato Research, Wageningen. 16:20-9, 1973.
38. ROCA, W.M.; ESPINOZA, M.R.; ROCA, M.R. & BRYAN, J.E. A tissue culture method for the rapid propagation of potatoes. American Potato Journal, Washington, 55(12):691-701, Dec. 1978.
39. SILBERSCHMIDT, K. A degenerescência da batatinha. O Biológico, São Paulo, 3(9):247-54, set. 1937.
40. SIP, V. Eradication of potato viruses A and S by thermotherapy and sprout tip culture. Potato Research, Wageningen, 15:270-3, 1972.

41. SIQUEIRA, O. Principais viroses de batata no Brasil. In: SÃO PAULO. Secretaria de Agricultura. Coordenadoria de Assistência Técnica Integral. Curso Nacional de Batata, Campinas, 1976. 25p.
42. STACE-SMITH, R. & MELLOR, F.C. Eradication of potato viruses X and S by thermotherapy and axillary bud culture. Phytopathology, St. Paul, 58(2):199-203, Feb. 1968.
43. WANG, P.J. & HUANG, L.C. Callus cultures from potato tissues and the exclusion of potato virus X from plants regenerated from stem tips. Canadian Journal of Botany, Ottawa, 53(22): 2565-7, Nov. 1975.
44. WRIGHT, N.S. Combined effects of potato viruses X and S on yield of Netted Gem and White Rose potatoes. American Potato Journal, Washington, 47(12):475-8, Dec. 1970..
45. YORA, K. & TSUCHINZAKI, T. The elimination of latent viruses from potatoes of Danshaku variety by use of tissue culture. Annals of the Phytopathological Society of Japan, Tokyo, 27: 219:21, 1962.
46. YUKI, V.A. Epidemiologia do virus do enrolamento da folha de batata em São Paulo. s.n.t. 2p. (Mimeografado. Trabalho apresentado no Seminário "Álvaro Santos Costa" sobre viroses de batata, Campinas, 8-9, maio, 1984).