

UFRRJ
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA

DISSERTAÇÃO

Minitubérculos Produzidos '*In Vitro*' como Método de Propagação
Alternativa para a Produção Comercial de Batata (*Solanum*
***Tuberosum* L.)**

MARTIN DE OLIVEIRA FREIRE

1998



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA**

**MINITUBÉRCULOS PRODUZIDOS '*IN VITRO*' COMO
MÉTODO DE PROPAGAÇÃO ALTERNATIVA PARA A
PRODUÇÃO COMERCIAL DE BATATA (*Solanum tuberosum* L.)**

MARTIN DE OLIVEIRA FREIRE

Sob a Orientação do Professor
Ricardo Motta Miranda

e Co-orientação da Pesquisadora
Ana Cristina P. P. Carvalho

Dissertação submetida como requisito
parcial para obtenção do grau de
mestre em Ciências no Curso de Pós-
Graduação em Fitotecnia da UFRRJ

Seropédica, RJ
Março de 1998

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA**

MARTIN DE OLIVEIRA FREIRE

Dissertação submetida Fitotecnia como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências** no Curso de Pós-Graduação em Fitotecnia.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 02/03/1998

Ricardo Motta Miranda. Ph.D. UFRRJ

Mauricio Ballesteiro Pereira. Dr UFRRJ

Mario Sosa Párraga. Dr. UFRRJ

664.80521
F866m
T

Freire, Martin de Oliveira, 1971-
Minitubérculos produzidos ‘*in vitro*’ como método de propagação alternativa para a produção comercial de batata (*Solanum tuberosum* L.) / Martin de Oliveira Freire – 1998.
43 f. : il.

Orientador: Ricardo Motta Miranda.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Fitotecnia.
Bibliografia: f. 40-43.

1. Batata – Teses. 2. Tubérculo (Botânica) – Propagação *in vitro* – Teses. 3. Tecidos (Anatomia e fisiologia) – Cultura e meios de cultura – Teses. I. Miranda, Ricardo Motta, 1951-. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Fitotecnia. III. Título.

É permitida a cópia parcial ou total desta dissertação, desde que citada a fonte.

À minha Família, dedico.

AGRADECIMENTOS

À UFRRJ, pela formação que me proporcionou.

Aos eternos amigos de curso Leonardo Oliveira Médici e Amaury da Silva dos Santos.

Ao professor Ricardo Motta Miranda pela orientação.

Ao professor Mauricio Ballesteiro Pereira pela ajuda e orientação imprescindíveis para o término dessa etapa.

Ao professor Mario Sosa Párraga pelo auxílio no trabalho.

À pesquisadora Ana Cristina P. P. Carvalho pela ajuda na orientação e pelo apoio ao trabalho.

À PESAGRO/EEI pela utilização do Laboratório de Cultura de Tecidos.

Aos professores Gonzalo Moya e Roberto Rossiello pelo empréstimo de equipamentos.

Ao professor e amigo Marcos Gervásio Pereira pelo apoio em todas as horas.

A Everaldo Zonta, pela amizade e a ajuda valiosa de sempre.

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1 – BROTAÇÕES ORIUNDAS DO PLANTIO DE MINITUBÉRCULOS. BANDEJA MANTIDA EM CASA DE VEGETAÇÃO.....	15
FIGURA 2 – BROTAÇÃO DE PLANTAS DE BATATA ORIUNDAS DO PLANTIO DE MINITUBÉRCULOS EM BANDEJAS.	16
FIGURA 3 – PLANTAS ORIUNDAS DE MINITUBÉRCULOS PLANTADAS EM VASOS INDIVIDUAIS EM CASA DE VEGETAÇÃO.....	16
FIGURA 4 – PLANTAS MANTIDAS EM CANTEIRO A CÉU ABERTO, COM 3 MESES DE IDADE.	17
FIGURA 5 – NÚMERO MÉDIO DE MINITUBÉRCULOS PRODUZIDOS EM FUNÇÃO DOS TRATAMENTOS. VALORES NÃO TRANSFORMADOS. LEGENDA: 1 (AIB 1 PPM, BAP 5 PPM, KIN 0 PPM); 2 (AIB 1 PPM, BAP 10 PPM, KIN 0 PPM); 3 (AIB 1 PPM, BAP 15 PPM, KIN 0 PPM); 4 (AIB 1 PPM, BAP 0 PPM, KIN 5 PPM); 5 (AIB 1 PPM, BAP 0 PPM, KIN 10 PPM); 6 (AIB 1 PPM, BAP 0 PPM, KIN 15 PPM); 7 (AIB 1 PPM, BAP 0 PPM, KIN 0 PPM); 8 (AIB 0 PPM, BAP 0 PPM, KIN 0 PPM).	20
FIGURA 6. NÚMERO DE MINITUBÉRCULOS PRODUZIDOS <i>IN VITRO</i> POR CONCENTRAÇÃO DE CITOCININAS COM AS REGRESSÕES LINEARES CORRESPONDENTES. VALORES TRANSFORMADOS PARA $(x + 0,5)$	21
FIGURA 7. PESO TOTAL DE MINITUBÉRCULOS (MG) POR CONCENTRAÇÃO DE CITOCININAS COM AS REGRESSÕES LINEARES CORRESPONDENTES. VALORES DE PESO TRANSFORMADOS PARA $(x + 0,5)$	22
FIGURA 8. PESO MÉDIO DE MINITUBÉRCULOS (MG) POR CONCENTRAÇÃO DE CITOCININAS COM AS REGRESSÕES LINEARES CORRESPONDENTES. VALORES DE PESO TRANSFORMADOS PARA $(x + 0,5)$	24
FIGURA 9 – PESO MÉDIO DE MINITUBÉRCULO (MG) PRODUZIDOS EM FUNÇÃO DO BALANÇO HORMONAL USADO (TRATAMENTOS). VALORES NÃO TRANSFORMADOS. LEGENDA: 1 (AIB 1 PPM, BAP 5 PPM, KIN 0 PPM); 2 (AIB 1 PPM, BAP 10 PPM, KIN 0 PPM); 3 (AIB 1 PPM, BAP 15 PPM, KIN 0 PPM); 4 (AIB 1 PPM, BAP 0 PPM, KIN 5 PPM); 5 (AIB 1 PPM, BAP 0 PPM, KIN 10 PPM); 6 (AIB 1 PPM, BAP 0 PPM, KIN 15 PPM); 7 (AIB 1 PPM, BAP 0 PPM, KIN 0 PPM); 8 (AIB 0 PPM, BAP 0 PPM, KIN 0 PPM).....	26
FIGURA 10 – PESO MÉDIO DOS MINITUBÉRCULOS PRODUZIDOS EM FUNÇÃO DO TIPO DE FRASCO UTILIZADO. NA LEGENDA: TIPO 1 – TUBO DE ENSAIO; TIPO 2 – FRASCO DE BOCA LARGA.....	28

FIGURA 11 – NÚMERO MÉDIO DE MINITUBÉRCULOS PRODUZIDOS POR TRATAMENTO EM FUNÇÃO DO TIPO DE FRASCO UTILIZADO. NA LEGENDA: TIPO 1 – TUBO DE ENSAIO; TIPO 2 – FRASCO DE BOCA LARGA.	29
FIGURA 12 – PERCENTUAL DE PLANTAS QUE APRESENTARAM PRODUÇÃO DE TUBÉRCULOS EM CONDIÇÕES DE CAMPO NOS DOIS PLANTIOS E COM O TOTAL DAS PRODUÇÕES.	36
FIGURA 13 – TUBÉRCULOS AÉREOS FORMADOS EM CAMPO.	37
FIGURA 14 – TUBÉRCULOS ORIUNDOS DE MINITUBÉRCULOS PLANTADOS APRESENTANDO CRESCIMENTO DE ESTÓLON SECUNDÁRIO.	37
FIGURA 15 – TUBÉRCULO PRODUZIDO EM CAMPO APRESENTANDO CRESCIMENTO SECUNDÁRIO.	38

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1. ÁREA E PRODUÇÃO DA CULTURA DE BATATA NO BRASIL.....	2
TABELA 2: IDENTIFICAÇÃO DOS TRATAMENTOS UTILIZADOS NO EXPERIMENTO DE TUBERIZAÇÃO <i>IN VITRO</i>	13
TABELA 3: ANÁLISE QUÍMICA DOS SUBSTRATOS DOS DOIS CANTEIROS ONDE FORAM TRANSFERIDAS AS PLÂNTULAS DE BATATA.	14
TABELA 4. ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO NÚMERO DE MINITUBÉRCULOS PRODUZIDOS <i>IN VITRO</i> . ANÁLISE PRELIMINAR.	18
TABELA 5. ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO NÚMERO DE MINITUBÉRCULOS PRODUZIDOS <i>IN VITRO</i> . DECOMPOSIÇÃO EM CONTRATES ORTOGONAIS E REGRESSÃO LINEAR	19
TABELA 6 – COMPARAÇÕES DOS RESULTADOS DE PRODUÇÃO DE MINITUBÉRCULOS EM LABORATÓRIO USANDO O TESTE DE TUKEY.	22
TABELA 7 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO PESO TOTAL DE MINITUBÉRCULOS PRODUZIDOS <i>IN VITRO</i> . ANÁLISE PRELIMINAR.	23
TABELA 8 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO PESO TOTAL DE MINITUBÉRCULOS PRODUZIDOS <i>IN VITRO</i> . DECOMPOSIÇÃO EM CONTRATES ORTOGONAIS E REGRESSÃO LINEAR	23
TABELA 9 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO PESO MÉDIO DE MINITUBÉRCULOS PRODUZIDOS <i>IN VITRO</i> . ANÁLISE PRELIMINAR.	25
TABELA 10. ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO PESO MÉDIO DE MINITUBÉRCULOS PRODUZIDOS <i>IN VITRO</i> . DECOMPOSIÇÃO EM CONTRATES ORTOGONAIS E REGRESSÃO LINEAR	26
TABELA 11 – TABELAS DE CONTINGÊNCIA PARA NÚMERO DE PLANTAS QUE APRESENTARAM PRODUÇÃO EM RELAÇÃO AO MEIO DE ORIGEM DO MINITUBÉRCULO.	31
TABELA 12 – RESUMO DAS ANÁLISES DE VARIÂNCIA DOS VALORES DE PRODUÇÃO EM CAMPO NO PRIMEIRO PLANTIO, SEGUNDO O BALANÇO HORMONAL UTILIZADO NA PRODUÇÃO DOS MINITUBÉRCULO.	32
TABELA 13 – RESUMO DAS ANÁLISES DE VARIÂNCIA DOS VALORES DE PRODUÇÃO EM CAMPO NO SEGUNDO PLANTIO, SEGUNDO O BALANÇO HORMONAL UTILIZADO NA PRODUÇÃO DOS MINITUBÉRCULO.	32
TABELA 14: PRODUÇÃO DE TUBÉRCULOS PROVENIENTES DO PLANTIO DE MINITUBÉRCULOS EM CANTEIROS.	33

TABELA 15 - CORRELAÇÕES DE SPEARMAN ENTRE PESO DO MINITUBÉRCULO PLANTADO E VALORES DE PRODUÇÃO REFERENTES AO PRIMEIRO PLANTIO EM CAMPO.....	34
TABELA 16 - CORRELAÇÕES DE SPEARMAN ENTRE PESO DO MINITUBÉRCULO PLANTADO E VALORES DE PRODUÇÃO REFERENTES AO SEGUNDO PLANTIO EM CAMPO.....	34

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	5
2.1 TUBÉRCULO	5
2.2 MECANISMOS DE TUBERIZAÇÃO E CULTURA <i>IN VITRO</i> DE BATATA.....	5
3 MATERIAL E MÉTODOS	10
3.1 PROCEDIMENTO EM LABORATÓRIO.....	10
3.2 EXPERIMENTO DE LABORATÓRIO, TUBERIZAÇÃO <i>IN VITRO</i>	12
3.3 EXPERIMENTO DE CAMPO	13
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
4.1 LABORATÓRIO.....	18
4.2 CAMPO	30
5 CONCLUSÃO	39
6 BIBLIOGRAFIA	40

RESUMO

Com o objetivo de estudar a viabilidade da utilização de minitubérculos, produzidos *in vitro*, como propágulo de batata em condições de campo, foi implantado, preliminarmente, um experimento do tipo fatorial 8X2, testando oito diferentes balanços de fitorreguladores e dois tipos de frascos com diferentes números de explantes. A cultivar utilizada foi JeatBintje. Os resultados avaliados foram: número de minitubérculos, peso total e peso médio de minitubérculos. Em relação ao número de minitubérculos produzidos não houve diferença significativa entre os tratamentos. Em relação a peso total e a peso médio, o uso de auxina na concentração 1mg/l apresentou os melhores resultados. Em relação ao frasco, a única diferença significativa foi para peso médio do minitubérculo, sendo o tratamento com 1 explante por frasco (1 explante/ 10 ml de meio) superior ao com 4 explantes por frasco (1 explante/ 6,25 ml de meio). Posteriormente, o material obtido foi plantado, primeiro em casa de vegetação e em seguida transplantado para canteiros em condições semelhantes ao campo. Setenta por cento (70%) do material plantado em canteiro apresentou produção de tubérculos, indicando a possibilidade da utilização do minitubérculo como propágulo em condições de campo. Novos experimentos são recomendados para otimizar a produção de tubérculos em campo utilizando os minitubérculos como propágulos.

Palavras chave: Batata. Minitubérculos. Cultura de tecidos. Tuberização.

ABSTRACT

The aim of this study is to test the viability of in vitro produced mini-tuber as potato propagules (Jeat Bintje cultivar) under field conditions. We set up a 8X2 factorial type experiment, testing eight different growth regulators balances and the number of explants per vial (1 and 4 explants/vial). The evaluated variables were: number of mini-tubers, total weight and average weight of mini-tubers. The number of mini-tubers produced shows no significant difference between treatments was observed. The use of auxin concentration 1mg/l produced the best results in total and average weight. The number of explants per vial also produced significant difference in the mini-tuber average weight, one explants per vial treatment (1 explant /10 ml medium) showing better results than four explants per vial (1 explant / 6.25 ml media). Subsequently, the material was planted first in a greenhouse, and then transplanted to beds under conditions similar to the field. Seventy percent (70%) of the planted material yielded tubers, indicating the possibility of using mini-tubers as field propagules. Other experiments are suggested to optimize the production of tubers in the field using mini-tubers as propagules.

Key words: Potato. Minitubers. Tissue culture. Tuberization.

1 INTRODUÇÃO

A batata é originária da América do Sul, mais especificamente dos altos platôs Andinos. O primeiro contato dos europeus com a espécie tem registro em 1553, tendo sido levada para Europa em torno de 1570. Sua influência nos hábitos alimentares dos Europeus só ocorreu muito depois de sua descoberta. De início era destinada mais a alimentação de animais e considerada como alimento para populações de baixa renda (BROWN, 1993).

Sua forma de cultivo era muito interessante do ponto de vista alimentício para as populações de baixa renda, assim como estratégico, para uma Europa onde as guerras não eram eventos raros. Com a movimentação de exércitos, era comum o saque, onde a lavoura também era destruída. Como a parte comestível da batata ficava sob o solo, mesmo com a planta sendo destruída, era possível colhê-la. Isso foi muito importante para a disseminação inicial da cultura na Europa (BROWN, 1993).

Uma vez provado seu valor nutricional como alimento, passou a ter importância cada vez maior. Tanto que a “Fome” que assombrou a Irlanda em meados de 1845 foi devido à perda da lavoura da batata causada por uma doença (míldio). Isso mostra o nível que sua importância atingiu (BROWN, 1993).

A batata (*Solanum tuberosum*) é uma cultura de grande importância para o homem, não só devido ao seu alto valor energético como também ao seu teor de proteínas, sais minerais e vitaminas. É a cultura que mais acumula energia/ha/dia (REIFSCHEIDER, 1987).

Na tabela 1 são apresentados dados referentes à cultura da batata no Brasil:

Tabela 1. Área e produção da cultura de batata no Brasil.

Ano	Área plantada (ha)	Área colhida (ha)	Produção (t)	Rendimento médio (kg/ha)
1990	159 089	158 326	2 233 721	14 108
1991	162 232	161 626	2 267 035	14 026
1992	173 712	173 185	2 432 073	14 043
1993	162.433	162 063	2 367 571	14 608
1994	172 024	171 853	2 488 461	14 480
1995	178 774	176 767	2 692 234	15 230

Fonte: Anuário Estatístico do IBGE (1996).

Sua principal forma de propagação é assexuada, pela utilização de tubérculos previamente induzidos, denominados batata-semente (REIFSCHNEIDER, 1987). Essa forma de plantio acarreta uma série de problemas com relação à armazenagem, transporte, quantidade necessária para o plantio e sanidade do tubérculo, devido principalmente a organismos sistêmicos. Tais problemas tornam-se extremamente graves quando levamos em conta que são necessários de 1,5 a 2,0 toneladas de batata-semente para o plantio de um hectare (FEDALTO & MIZUBUTE 1984).

Devido às condições climáticas brasileiras, fica muito difícil produzir batata-semente certificada. Sendo assim, o Brasil importa grande quantidade de batata-semente da Europa para garantir a sanidade do material reprodutivo. A taxa de degenerescência da cultura é em torno de 20%. Isso faz com que seja necessária a utilização de material propagativo livre de vírus para evitar perdas na produção (REIFSCHNEIDER, 1987).

As características apresentadas acima são as responsáveis pelo alto custo da implantação da cultura, do qual de 30% a 70% é devido o custo de plantio (ACCATINO & MALANGARA, 1982).

Outra forma de propagação, usada na China, é a semente botânica. Este tipo de propagação tem como vantagens a redução da disseminação de doenças, entre elas as viroses e nematóides, a redução do custo de implantação, a facilidade do armazenamento e manuseio do material propagativo. São necessárias somente de 100 a 150g de sementes para o plantio de 1 hectare. A desvantagem é que sendo uma espécie tetraplóide com fecundação cruzada, pode ocorrer uma variabilidade genética muito grande, o que resultaria em desuniformidade na produção, para as características agrônômicas desejáveis (FEDALTO, 1982).

A utilização de minitubérculo como propágulos, vem sendo feita para a produção de matrizes de “batata-semente”, tendo sido desenvolvida na União Soviética uma técnica de cultivo hidropônico com este objetivo.

As vantagens do uso de minitubérculos seriam a manutenção do clone através da preservação do germoplasma *in vitro*, que reduziria os custos desse armazenamento, a garantia da sanidade, através da limpeza clonal, e a redução dos custos em relação a transporte, armazenagem e plantio (TOVAR et alli, 1985).

O material propagado através das técnicas da cultura de tecidos possui diversas vantagens. Entre elas, a rápida taxa de multiplicação, a garantia da sanidade do material, preservação do germoplasma. A facilidade de armazenamento de material em laboratório permite que uma grande quantidade de material possa ser preservada utilizando relativamente pouco espaço físico, em comparação com o material sendo preservado em campo.

Existe uma chance de o material sofrer variação somaclonal, por isso a preservação desse material implica em constantes testes para garantir que o material não sofra mutações que não sejam percebidas. Partindo de um explante que cresça na velocidade de 5 gemas por mês, pode-se obter, a partir desse explante, em seis meses, 15625 novas plantas, com garantia de sanidade do material e manutenção do clone.

As técnicas de cultura de tecidos vêm sendo amplamente aplicadas em vários ramos da agricultura principalmente após a descoberta dos hormônios vegetais. Seu grande avanço foi a partir da obtenção de material livre de vírus (TORRES & CALDAS, 1990). Foram obtidas mudas de Dália livre de vírus a partir de cultura de ápice caulinar. Isso aumentou as possibilidades de aplicação das técnicas de cultura de tecidos na produção agrícola.

Propagação *in vitro* de batata por meio de várias subculturas de explantes, tem sido bem documentada por vários autores, e está se estabelecendo como um meio efetivo e rápido de multiplicar cultivares novas ou já existentes em condições livres de doenças (NOZERAN, et al, 1977; GOODWIN, et all, 1980; HUSSEY, STACEY, 1981; WANG & HU, 1982). Plântulas obtidas *in vitro* podem ser transplantadas para o solo sem dificuldade. Neste trabalho propõe-se que o produto final da micropropagação seja o minitubérculo. Minitubérculos são muito convenientes para estocagem e transporte de germoplasma, e ainda podem ser de alguma forma adaptados para plantio mecanizado em larga escala.

Acrescido a isso, existe a possibilidade de automação no trabalho realizado em condições *in vitro*. Essa automação teria como principal objetivo a redução de custos decorrente

da manipulação do material para sucessivas repicagens. Uma das propostas é um medidor ótico, onde a leitura seria interpretada por computador. A partir daí, o meio de cultura seria colocado na medida em que houvesse necessidade por parte do explante (ALCHANATIS et al., 1994).

Assim sendo, o objetivo desse trabalho é testar a viabilidade técnica da utilização dos minitubérculos como meio de propagação em campo para a batata. Para isso serão estudadas as etapas de indução à tuberização em laboratório, e de plantio no campo até a produção de tubérculos, fechando assim o ciclo de produção da batata.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Tubérculo

Um tubérculo de batata é um caule modificado, com nós e entre-nós. Normalmente os tubérculos são formados na extremidade de caules modificados subterrâneos, denominados estólon. A iniciação da tuberização começa na zona sub-apical do estólon, e o enchimento do tubérculo ocorre no sentido acropétalo em entre-nós que estão ali presentes no início da tuberização.

Mais ou menos ao mesmo tempo em que se inicia o processo de enchimento, cessa a atividade meristemática do ápice do estólon. O armazenamento de amido ocorre bem cedo na ontogenia do tubérculo.

Os tubérculos se formam mais prontamente embaixo da terra. O porquê ainda não é inteiramente claro. O fator mais importante parece ser o escuro, mas a resistência física das partículas do solo também deve interferir nesse desenvolvimento. Em algumas circunstâncias anormais alguns tubérculos aéreos são formados, geralmente em gemas axilares. Esses tubérculos aéreos são muito menores e contém clorofila. Geralmente são formados devido a algum ferimento no caule que implique em impedimento à translocação de fotoassimilados (EWING, 1995).

2.2 Mecanismos de Tuberização e cultura *in vitro* de Batata

Para a produção de minitubérculos *in vitro* é necessário se conhecer os mecanismos de tuberização envolvidos no processo.

A primeira vez que a cultura de tecidos foi aplicada para limpeza clonal em batata foi em 1968 (COREL et alli, 1968), utilizando-se a cultivar Belle de Fontenay. Foi feita cultura de meristemas com alguns primórdios foliares (ápice caulinar).

O primeiro relato de tuberização *in vitro* data de 1953, por Braker (citado por LECLERC et alii, 1994). Para tanto ele utilizou brotações estioladas em meio de Murashige & Skoog, 1962 (MS) suplementado com 80 g/l de sacarose.

A tuberização da batata é muito influenciada por fatores ambientais, principalmente a temperatura e o fotoperíodo. Aceita-se que dias curtos com noites frias causam estímulos que induzem à tuberização, enquanto que o contrário retarda ou inibe o processo (GREGORY, 1956; EWING & WAREING, 1978).

Foi sugerida a existência de um estímulo tuberizante, que se formaria nas folhas e depois seria translocado para o estolon. Este estímulo seria formado sob condições específicas de temperatura e fotoperíodo (GREGORY, 1956; LAWRENCE & BARKER, 1963; HARMEY et alii, 1966; MAUK & LANGILLE, 1978; SEABROOK et alii, 1993).

Os primeiros trabalhos visando compreender esse mecanismo de tuberização usaram experimentos com enxertia. Estes trabalhos mostraram que os segmentos do caule de uma planta induzida transmitia estímulo tuberizante, o que mais tarde sugeriu que esse estímulo fosse de natureza hormonal (GREGORY, 1956). PALMER & SMITH, 1969; LANGILLE & FORSLINE, 1974; HARMEY & CROWLEY, 1966, constataram que o ácido indolacético (AIA) e a hidrazidamaleica promoviam a tuberização, enquanto que a giberelina (GA) inibia fortemente o processo.

A giberelina age retardando a tuberização, apresentando efeitos de reduzir a produção em campo, e inibir a formação de tubérculos em cultura *in vitro* (GARCIA-TORRES & GOMEZ-CAMPO, 1973; HARMEY, et alii, 1966.). O estado não indutivo em plantas inteiras cultivadas em condições de dias longos é correlacionado com altos níveis endógenos de GA nas folhas, enquanto em dias curtos a condição é inversa (MENZEL, 1981; MENZEL, 1983; VREUGDENHIL & STRUIK, 1989). A GA afeta a distribuição dos carboidratos favorecendo as folhas e o caule, numa resposta que se assemelha aos efeitos de alta temperatura (MENZEL, 1983). O contrário ocorre quando é aplicado algum inibidor de giberelina (HANNAPPEL et alii, 1985; HUSSEY & STACEY, 1984). Várias substâncias foram propostas como tendo ação antigiberelina na tuberização (KRAUSS, 1978). Substâncias que inibem a giberelina possuem a capacidade de favorecer a tuberização. Este favorecimento é, possivelmente, devido a uma ação indireta, pelo controle de níveis endógenos da giberelina.

Alguns hormônios estão envolvidos no controle da tuberização, as evidências indicam, por exemplo, que uma baixa atividade de GA3 é um fator importante na iniciação e no subsequente desenvolvimento dos tubérculos de batata.

Então, a diminuição dos níveis de GA3 em dias curtos tem efeito duplo: diminui a alongação do estólón e permite a iniciação do tubérculo. Isto, entretanto, não implica que o GA3 seja unicamente o fator determinante na iniciação do tubérculo, porém, indica causar um efeito negativo, enquanto que outros fatores têm um papel de regulação positiva. Por exemplo, em condições de dias curtos a aplicação de GA3 não impede a formação do tubérculo (HAMMES & NEL, 1975).

Existem poucas evidências de que o etileno possa causar um efeito positivo na iniciação do tubérculo (CATHPOLE, HILLMAN, 1969; GARCIA-TORRES, GOMEZ-CAMPO, 1973). Algumas evidências relatam o contrário (MINGO-CASTEL, 1976). Essa discrepância é por causa dos efeitos que o etileno causa. Ele tanto inibe o alongamento do estólón, o que favorece a iniciação da tuberização, quanto inibe o processo da mesma iniciação de tuberização (VREUGDENHIL & STRUIK, 1989). Em conclusão, aceita-se que tanto o etileno quanto o GA3 possuem efeitos prejudiciais na formação do tubérculo.

A promoção de tuberização por citocininas *in vitro* foi demonstrado por PALMER & SMITH (1969, 1970) que usaram cinetina (KIN) e benzilaminopurina (BAP), e por MAUK e LANGILLE (1978) que usaram zeatina.

Citocininas promovem iniciação de tubérculos em estolons isolados cultivados *in vitro* (PALMER & SMITH, 1969; FORSLINE, LANGILLE 1976; MAUK, LANGILLE, 1978). FORSLINE e LANGILLE (1975), OBATA-SASAMOTO e SUZUKI (1979) e KODA (1982) mostraram que o nível endógeno de citocininas nas raízes e nos estolons aumentam em condições de dias curtos, esses dados indicam a importância desse hormônio no processo de tuberização. Mauk e Langille, 1978, também mostraram aumentos no nível de zeatinriboside em tecidos subterrâneos alguns dias após as plantas terem sido sujeitas à dias curtos com noites frias. A partir dessas informações, podemos concluir que a citocinina promove a iniciação do tubérculo.

O enchimento do tubérculo é resultado do acúmulo de amido. Na planta inteira, os carboidratos são supridos pela fotossíntese. Em condições de cultivo *in vitro*, a fotossíntese não dá autonomia à planta, em outras palavras, a planta não é autotrófica. Para suprir as necessidades energéticas da planta, é necessária a adição de açúcar ao meio de cultura

(TORRES & CALDAS, 1990). Mesmo que haja indução à tuberização, se não tiver disponível uma quantidade mínima de carboidratos, os tubérculos não se formarão (WARDLAW, 1990).

Para garantir que haja tuberização existe a necessidade de pelo menos 6% de sacarose no meio de cultura. Mesmo a aplicação de fitorreguladores em meio de cultura contendo baixo teor de sacarose não promovia a tuberização, o que sugere a necessidade de um suprimento mínimo de carboidratos para que ocorra a tuberização (CASTEL *et alli*, 1976; TEIXEIRA & PINTO, 1991).

PALMER & SMITH (1969) descobriram que o efeito promotor da citocinina era aumentado quando em condições com 6% de sacarose. HUSSEY e STACEY (1981) obtiveram como resultado, que em meio sem BAP, a alta concentração de sacarose favoreceu tuberização em 8h-dia de luz, mas não em luz contínua, e o efeito de BAP foi aumentado em ambos fotoperíodos em níveis altos de sacarose (7%).

LECLERC *et alli* (1994) trabalhando com sacarose a 8%, fotoperíodo de 8 horas e baixa temperatura (15°C) observaram que a produção de minitubérculo foi maior em meio sem adição de Bezilaminopurina (BAP), Cycocel(Cloreto de clorocolina ouCCC) ou cumarina. Esse trabalho mostra como as condições de crescimento dos explantes podem influenciar na produção de minitubérculo, assim como a importância da sacarose na microtuberização.

Outra substância referida como tendo ação tuberizante é o ácido jasmônico. Foi isolado em plantas que tinham recebido estímulo de tuberização e que estavam formando tubérculos. Em trabalhos usando este ácido, foi observado seu poder de tuberização (KODA, *et al.*, 1991; PELACHO & MINGO-CASTEL, 1991). Estudos recentes estão apontando para um novo grupo hormonal, os Jasmonatos (GORSS & PARTHIER, 1994).

O mais eficiente tratamento que promove formação de estolon seguido de tuberização é a adição de citocinina ao meio. Esse efeito é maior em condições de dias curtos do que em dias longos. A adição de GA3 inibe a tuberização, enquanto que inibidores, como o CCC, aumentam a tuberização e reforçam o efeito da citocinina. Ácido abscísico em certas condições pode estimular a tuberização, mas geralmente inibe tanto o crescimento quanto a tuberização. Restrições à troca gasosa entre o ar dentro dos vidros e o meio externo inibem a tuberização, num efeito que parece ser principalmente devido à acumulação do etileno. (HUSSEY, STACEY, 1984).

A temperatura tem grande efeito na tuberização, relacionado com o fotoperíodo. A faixa ótima para a tuberização *in vitro* está entre 20 e 25°C. Temperaturas mais elevadas (28 a 30°C) reduzem significativamente a tuberização (EWING, 1981; WANG & HU, 1982; MONTIEL & SALDAÑA, 1987; NOWAK & COLBORNE, 1989). Em situações desfavoráveis à tuberização, os efeitos de alta temperatura são mais acentuados. Foi proposto que o efeito da alta temperatura é causado por um aumento de produção de giberelinas nas gemas e nas folhas jovens (MENZEL, 1983).

Existem alguns trabalhos que apontam a influência do nitrogênio na tuberização (TEIXEIRA, 1989). Quando diminui a disponibilidade de nitrogênio ocorre um aumento na tuberização. Possivelmente devido à influência que o nitrogênio tem na ontogenia da planta, direcionando-a a um crescimento vegetativo.

O quanto exatamente uma ou outra substância causa no processo de tuberização ainda não é muito claro. Possivelmente, a tuberização ocorre por causa de uma combinação de fatores, não todos necessariamente hormonais. Com o avanço da genética molecular pode-se esperar que o mecanismo de tuberização torne-se mais claro.

Levando em conta os fatores acima, vários autores chegaram a protocolos diferentes no que diz respeito à tuberização *in vitro*.

PRADO (1992) obteve os seguintes resultados em relação à tuberização “*in vitro*”: o pré-tratamento dos explantes por 10 horas a 15°C aumentou o peso da matéria fresca dos minitubérculos; O balanço hormonal que resultou na produção de maior número de minitubérculos foi de 1,0 mg/l de AIB e 10,0 mg/l de BAP; o fotoperíodo para o crescimento dos explantes e dos minitubérculos foi de 16 horas, e a temperatura foi mantida em 25°C ± 2; a intensidade luminosa de 3000 lux produziu minitubérculos com maior peso de matéria fresca, e a ausência de luz um maior número de minitubérculos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

A metodologia para a produção de minitubérculos foi baseada no protocolo desenvolvido por Prado (1992), a partir do qual foram implantados experimentos visando otimizar a produtividade de minitubérculos e avaliar o efeito da sua qualidade na regeneração de plantas.

O trabalho de Prado foi realizado com a cultivar Chiquita, plantada em MG. Apesar dessa cultivar fazer parte da coleção do laboratório, devido à idade do material e à baixa resposta ao estímulo de tuberização, o que foi constatado em um ensaio preliminar, julgou-se necessária a troca da cultivar. Após alguns testes (FREIRE, et alli, 1997), optou-se pela cultivar Jeat Bintje, que apresentou melhores resultados de regeneração em condições *in vitro*.

Para simplificação dos experimentos optou-se por manter a concentração de auxina (AIB) em 1 ppm, e trabalhar com variações na concentração da citocinina, que é apontada pela literatura como tendo efeito significativo na tuberização (PALMER & SMITH, 1969; FORSLINE, LANGILLE 1976; MAUK, LANGILLE, 1978). A escolha de duas citocininas diferentes partiu da idéia de testar se diferentes produtos sintéticos com a mesma ação fisiológica teriam respostas diferentes na tuberização do material *in vitro*.

3.1 Procedimento em Laboratório

Todas as operações de repicagem do material e inoculação dos explantes em meio de tuberização foram feitas em sala apropriada em condições assépticas. A manipulação do material foi feita usando uma capela de fluxo laminar horizontal.

Todo material usado, vidraria, pinças, bisturi e meios de cultura, foi previamente autoclavado a 121 °C por 20 minutos. Antes da utilização, esse material foi submetido à desinfecção por luz ultravioleta, durante 20 minutos.

Os meios de cultura foram preparados a partir de soluções estoques previamente preparadas e mantidas em refrigeração no próprio laboratório. As soluções de hormônios foram preparadas no momento do preparo do meio. Os hormônios foram mantidos em freezer a 4°C e só retirados na ocasião do preparo da solução.

Meio de Cultura

O meio de cultura básico utilizado foi o MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), com duas alterações. O meio de iniciação foi denominado meio A, contendo toda composição básica do MS com 0,8% de ágar e pH 5,7. O meio de tuberização foi denominado meio B, diferindo do meio A na concentração de sacarose (8%) e na suplementação de 8 diferentes balanços de fitorreguladores (combinação de auxina/citocinina).

Para a inoculação no meio de cultura foram utilizados explantes de segmentos nodais da cultivar JeatBintje. Esse material foi obtido a partir de material mantido em cultura *in vitro*, isentos de contaminação sistêmica e oriundos de brotações estioladas de tubérculos. Este material ficou disponível no Laboratório de Cultura Tecidos Vegetais do Departamento de Fitotecnia, Instituto de Agronomia da UFRRJ.

O protocolo básico utilizado neste projeto, desenvolvido por PRADO (1992), a partir de cultura já estabelecida *in vitro*, tem as seguintes etapas:

- 1) A partir de plântulas estabelecidas *in vitro* foram seccionados os explantes em segmentos nodais, contendo duas gemas, e transferido em meio de cultura A em frascos de 250 ml, e mantidos na sala de crescimento a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 16 horas;
- 2) Em cerca de 4 semanas os segmentos nodais desenvolveram-se e deram origem a plântulas que foram seccionadas em segmentos com 3 gemas, e cultivadas em meio de cultura B, também em frascos de 250 ml;
- 3) Os explantes inoculados em meio de tuberização passaram por um pré-tratamento de 10 horas no escuro a 15°C;
- 4) Em seguida foram removidos para a sala de crescimento a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, e mantidos por 3 semanas em ausência de luz;

5) Foram então transferidos para prateleiras iluminadas a 3.000 lux e fotoperíodo de 16 horas e mesma temperatura, para receber o estímulo equivalente a dias curtos;

6) Após 8 semanas os minitubérculos formados no ápice das brotações podem ser destacados, pesados, medidos e utilizados.

Os explantes foram inicialmente inoculados no meio de cultura A, de forma a aumentar a quantidade de material propagativo disponível para a produção de minitubérculos. Para as repicagens foram utilizados pinças e bisturi cirúrgico, dentro de placa de petri, previamente esterilizados. Os segmentos nodais excisados foram rapidamente transferidos para o meio de cultura em frascos de 250 ml, que eram vedados com filme de polietileno. Todo esse processo foi realizado no interior da capela de fluxo laminar horizontal, para evitar contaminação do material. O processo descrito foi utilizado para repicar material nos dois meios (implantação e tuberização).

3.2 Experimento de laboratório, tuberização *in vitro*

Teve como objetivo escolher o tratamento que produzisse o maior número ou maior peso de minitubérculos e a partir disso otimizar a produção de minitubérculos *in vitro*. A hipótese a ser testada é a de que o balanço de fitorreguladores no meio interfere na produtividade dos minitubérculos *in vitro*. Para isto foram utilizadas duas citocininas, Kinetina (KIN) e Benzilaminopurina (BAP) nas concentrações de 5,0; 10,0 e 15,0 ppm e uma auxina, o Ácido Indol-Butírico (AIB) na concentração de 1,0 ppm, acrescido de duas testemunhas, uma apenas com a auxina (1,0 ppm de AIB) e outra sem qualquer fitoregulador. Além disso, foram usados dois tipos de frascos, com diferentes número de explantes.

O experimento foi um fatorial 8X2, no delineamento Blocos ao Acaso, com 3 blocos, considerando como unidade experimental o conjunto de 12 explantes.

1º Fator: 7 balanços de fitorreguladores com auxina e citocinina e testemunha (Tabela 2).

2º Fator: tipo de frasco e número de explantes por frasco.

Tipo 1 – frasco estreito tipo tubo de ensaio (15 X 2,5 cm), com 10 ml de meio e um explante (10ml de meio por explante).

Tipo 2 - frasco largo tipo vidro de maionese (250 ml), com 25 ml de meio e quatro explantes (6,25 ml de meio por explante).

Tabela 2: Identificação dos tratamentos utilizados no experimento de tuberização *in vitro*.

Tratamentos	AIB (ppm)	BAP (ppm)	KIN (ppm)
1	1	5	0
2	1	10	0
3	1	15	0
4	1	0	5
5	1	0	10
6	1	0	15
7	1	0	0
8	0	0	0

Os 16 tratamentos (8x2) foram inicialmente instalados no meio de implantação (meio A) e mantidos em câmara de crescimento com temperatura de 25°C e fotoperíodo de 16 horas (3000 lux). Após o desenvolvimento inicial os explantes foram inoculados no meio de tuberização (meio B).

Os parâmetros avaliados foram o número total de minitubérculos produzidos, peso total e peso médio.

Os dados foram submetidos à análise da variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5%.

3.3 Experimento de campo

Plantio 1

Foi realizado com minitubérculos provenientes do experimento realizado no laboratório, observando-se o tratamento de origem (balanço hormonal). Dessa forma o ensaio

teve 8 tratamentos, correspondendo aos oito balanços hormonais. O tipo de frasco não foi considerado na separação do material.

Os minitubérculos foram inicialmente plantados em bandejas de isopor com substrato de matéria orgânica: areia, na proporção de 2:1, no próprio laboratório. Logo em seguida foram levados para a casa de vegetação onde permaneceram 90 dias (Figuras 1 e 2). Depois de brotarem e as plântulas atingirem aproximadamente 10 cm de altura foram transplantadas para vasos, com um substrato composto de matéria orgânica, areia e argila na proporção de 2:1:1 (Figura 3). Passado os 90 dias, foram transplantados para canteiros a céu aberto, visando simular as condições em campo da cultura (Figura 4). O material foi irrigado periodicamente, tomando cuidado para não encharcar, visto que umidade em excesso pode prejudicar a formação dos tubérculos.

Plantio 2

Foi realizado da mesma forma que o plantio um, com a diferença que o tratamento 3 (AIB 1ppm, BAP 15ppm e KIN 0ppm) não foi utilizado tendo em vista que não produziu número suficiente de minitubérculos. Além disso, o tempo de permanência nas bandejas e vasos foi de 60 dias. No mais, os demais procedimentos foram idênticos, bem como as condições de campo foram similares.

Para os dois plantios os canteiros foram preparados com areia e matéria orgânica. A análise química do substrato usado nos canteiros, feita no Laboratório de Fertilidade do Solo do Departamento de Solos IA/UFRRJ, encontra-se na tabela 3.

Tabela 3: Análise química dos substratos dos dois canteiros onde foram transferidas as plântulas de batata.

Canteiro	pH	Ca	Mg	Al	Al+H	Na	K	P	C-org
		cmol _c .dm ⁻³				mg/Kg			%
1	5,6	4,6	1,6	0,0	1,65	0,1	106	>30	2,85
2	5,7	2,2	0,8	0,0	1,81	0,04	31	>30	3,59

Foi feita adubação foliar usando o adubo comercial OURO VERDE na décima semana de plantio, seguindo recomendação de rotina (Párraga, comunicação pessoal, 1997).

O material colhido foi pesado imediatamente e deixado secando ao ar durante 2-5 dias. Depois desse período foi colocado em estufa a 65-70°C por mais 2 – 5 dias. O material foi secado no Laboratório de Sementes do Departamento de Fitotecnia IA/UFRRJ.

Foram avaliados número de plantas que produziram tubérculos; número de tubérculos produzidos, peso fresco total e médio, peso seco total e médio

Os parâmetros que foram avaliados são: número de tubérculos, produção total, produção média de tubérculos por planta, produção por planta peso médio dos tubérculos.



Figura 1 – Brotações oriundas do plantio de minitubérculos. Bandeja mantida em casa de vegetação.



Figura 2 – Brotação de plantas de batata oriundas do plantio de minitubérculos em bandejas.



Figura 3 – Plantas oriundas de minitubérculos plantadas em vasos individuais em casa de vegetação.



Figura 4 – Plantas mantidas em canteiro a céu aberto, com 3 meses de idade.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 LABORATÓRIO

O experimento de tuberização *in vitro* foi avaliado após 11 semanas da implantação. A análise da variância para número de minitubérculos obtidos não indicou diferença estatisticamente significativa (Tabela 4) para tipo de frasco, balanço e interação. A não significância dos resultados pode ser atribuído à baixa precisão, já que o coeficiente de variação foi elevado. Assim, recomenda-se que em próximos experimentos dessa natureza um maior número de repetições seja utilizado. Dessa forma espera-se que haja diminuição no coeficiente de variação.

Apesar das médias de número e peso dos minitubérculos obtidos não terem apresentado diferença estatisticamente significativa apenas de forma especulativa, observamos que os balanços 4, 5 e 7 apresentaram tendência de produzir um maior número de minitubérculos (Figura 5), enquanto que o balanço número 3 apresentou a menor produção de minitubérculos.

Tabela 4. Análise de Variância do número de minitubérculos produzidos *in vitro*. Análise preliminar.

Fontes de Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F ^z	Sig
Total	47	32,41426			
Total de Redução	17	10,83838	0,6375518	0,89	n.s.
Repetição	2	1,054717	0,5273583	0,73	n.s.
Frasco	1	0,3960331	0,3960331	0,55	n.s.
Balanço	7	8,163932	1,166276	1,62	n.s.
Frasco X Balanço	7	1,223700	0,1748143	0,24	n.s.
Resíduo	30	21,57588	0,7191960		

C.V. = 39.383

Os resultados da análise mostram que não houve diferença em relação ao meio indutor de tuberização para a característica número de tubérculos produzidos (Tabela 4). A análise foi feita com a transformação dos dados usando raiz quadrada de $(x+0,5)$. A transformação dos dados foi necessária devido a não normalidade da distribuição dos mesmos.

Não foi observada diferença significativa para o tratamento frasco nem para a interação entre balanço X frasco para o número de minitubérculos produzidos.

Considerando a estrutura dos tratamentos, é admissível realizar um desdobramento dos graus de liberdade de balanços, em contrastes ortogonais (tabela 5). Assim, de acordo com a natureza dos tratamentos, foi estudado o contraste do tratamento 8 (média 38,83 minitubérculos) com os demais (47,79 minitubérculos), que representa a diferença entre a testemunha e os balanços hormonais, o qual foi não significativo. Outro contraste foi entre o tratamento 7 (116,37 minitubérculos) e os tratamentos de 1 a 6 (36,37 minitubérculos), que representa a diferença entre o balanço apenas com AIB contra os que receberam também Auxinas. Este contraste foi altamente significativo, sugerindo que somente a presença da auxina, de modo geral, atrapalhou a tuberização. O outro contraste foi entre os tratamentos 1, 2 e 3 (34,44 minitubérculos) contra 4, 5 e 6 (38,29 minitubérculos), que representa a diferença entre BAP e KIN, foi significativo ao nível de 5%, sugerindo que a KIN foi superior ao BAP em número de tubérculos.

Tabela 5. Análise de Variância do número de minitubérculos produzidos in vitro. Decomposição em contrastes ortogonais e regressão linear

Fonte de Variação	G.L.	SQ	QM	F	Prob	
8 X (1-7)	1	0,007	0,007	0,010	0,923	NS
7 X (1-6)	1	0,147	0,147	0,204	0,655	Ns
(1-3) X (4-6)	1	0,505	0,505	0,702	0,409	Ns
Dentro BAP	2	5,125	2,562	3,563	0,041	*
Regr Linear	1	3,982	3,982	5,536	0,025	*
Desvios	1	1,143	1,143	1,589	0,217	Ns
Dentro KIN	2	2,381	1,191	1,655	0,208	Ns
Regr Linear	1	1,874	1,874	2,606	0,117	Ns
Desvios	1	0,507	0,507	0,705	0,408	Ns
Resíduo	30		0,719			

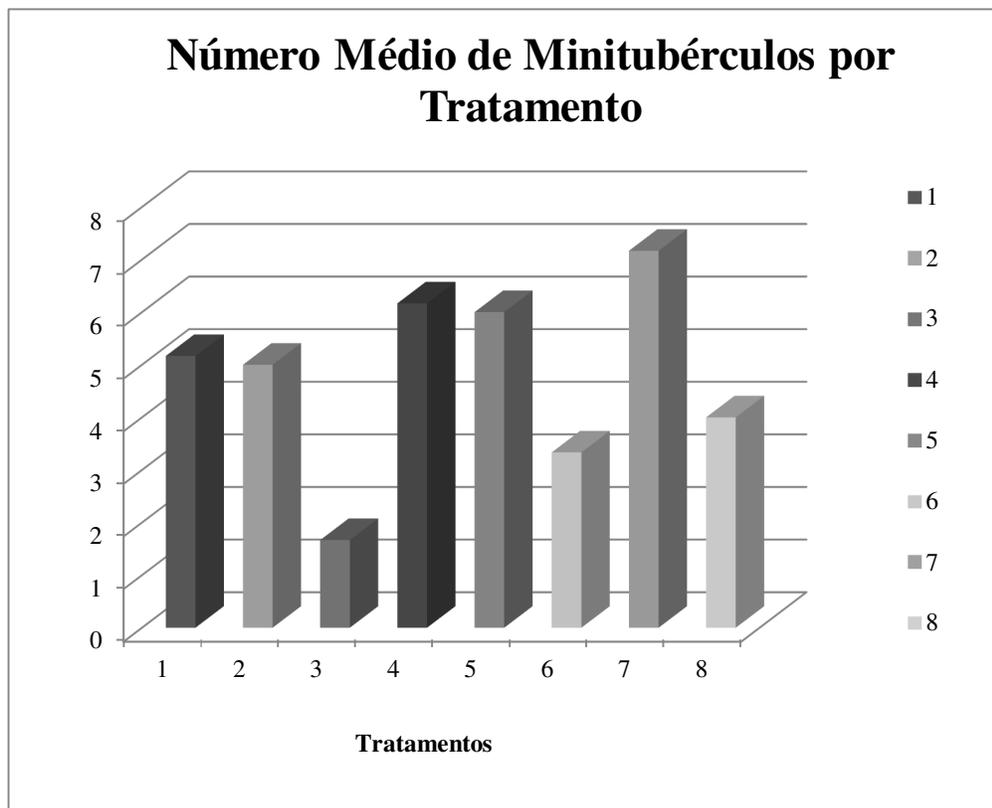


Figura 5 – Número médio de minitubérculos produzidos em função dos tratamentos. Valores não transformados. Legenda: 1 (AIB 1 ppm, BAP 5 ppm, KIN 0 ppm); 2 (AIB 1 ppm, BAP 10 ppm, KIN 0 ppm); 3 (AIB 1 ppm, BAP 15 ppm, KIN 0 ppm); 4 (AIB 1 ppm, BAP 0 ppm, KIN 5 ppm); 5 (AIB 1 ppm, BAP 0 ppm, KIN 10 ppm); 6 (AIB 1 ppm, BAP 0 ppm, KIN 15 ppm); 7 (AIB 1 ppm, BAP 0 ppm, KIN 0 ppm); 8 (AIB 0 ppm, BAP 0 ppm, KIN 0 ppm).

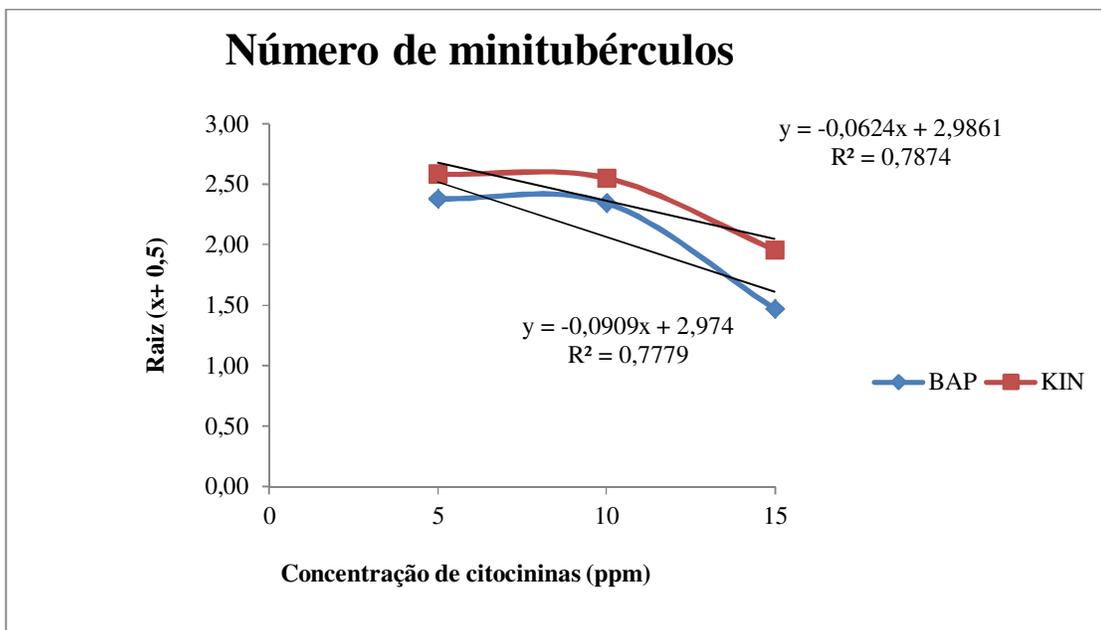


Figura 6. Número de minitubérculos produzidos *in vitro* por concentração de citocininas com as regressões lineares correspondentes. Valores transformados para $\sqrt{(x + 0,5)}$.

Considerando que foram usadas três diferentes concentrações de citocinina para a dose única de auxina, cabe o estudo da regressão linear para identificar se há alguma tendência das doses influenciarem os resultados. Observamos que BAP teve uma tendência de aumentar o número de minitubérculos na última dose e KIN diminuiu (figura 5), mas a regressão em ambos os casos foi não significativa, não confirmando a tendência observada (Figura 6). É necessário um estudo que inclua doses maiores das diferentes citocininas utilizada para uma análise de regressão que permita confirmar ou não a tendência de aumento ou diminuição do número de minitubérculos produzidos. Dessa forma poderá ser possível identificar em qual concentração a citocinina passa a ser prejudicial ao desenvolvimento dos tubérculos, uma vez que seja mantida a concentração de auxina.

Em relação a peso total de minitubérculos foi observada diferença significativa em nível de 1% para o tratamento balanços (Tabela 7 e 8). A análise de regressão apresenta a tendência de redução no peso total em níveis maiores das diferentes citocininas (figura 7).

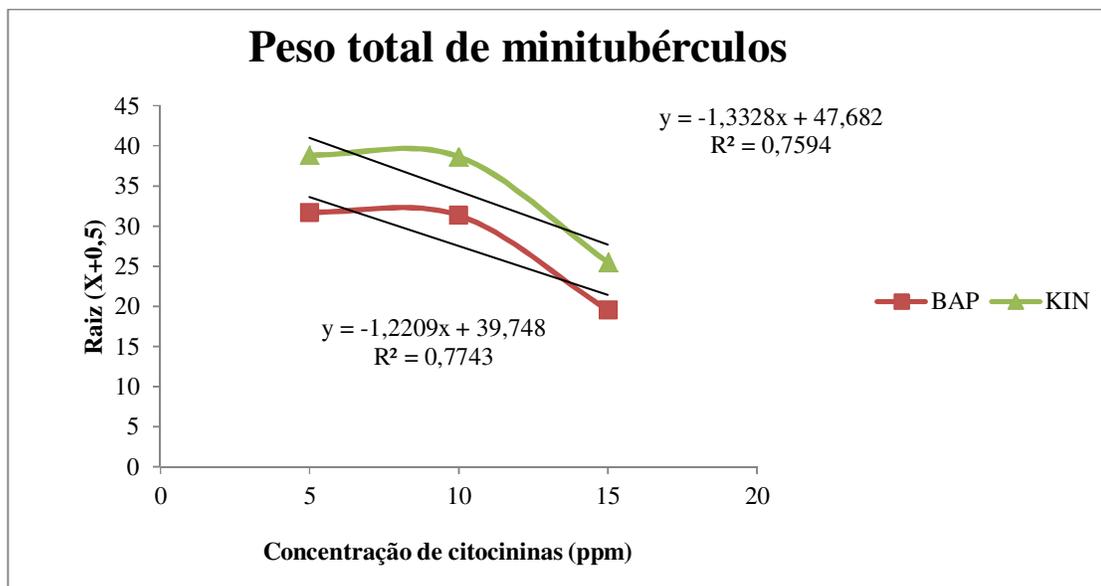


Figura 7. Peso total de minitubérculos (mg) por concentração de citocininas com as regressões lineares correspondentes. Valores de peso transformados para $\sqrt{(x + 0,5)}$.

Os testes de tukey aplicados confirmaram a não diferença entre os balanços para a produção de minitubérculo em número (Tabela 6). Em relação ao peso total e peso médio dos minitubérculo, foi observado que o balanço 7 (AIB 1ppm) apresentou diferença em relação aos balanços 6 e 3 (para peso total) e em relação aos balanços 1, 3 e 6 (para peso médio) (Tabela 2).

TABELA 6 – Comparações dos resultados de produção de minitubérculos em laboratório usando o teste de Tukey.

Tratamento	Número médio	Peso total	Peso médio
BAP 5; AIB 1	5,16 ^a	1007 ^{a b}	32,48 ^b
BAP 10; AIB 1	5 ^a	982 ^{a b}	32,73 ^{a b}
BAP 15; AIB 1	1,66 ^a	381 ^b	38,1 ^b
KIN 5; AIB 1	6,16 ^a	1509 ^{a b}	40,78 ^{a b}
KIN 10; AIB 1	6 ^a	1496 ^{a b}	41,55 ^{a b}
KIN 15; AIB 1	3,33 ^a	651 ^b	32,55 ^b
AIB 1	7,16 ^a	5004 ^a	116,37 ^a
CONTROLE	4 ^a	932 ^{a b}	38,83 ^{a b}

Obs: médias seguidas pela mesma letra, por coluna, não diferem significativamente pelo teste de tukey a 5%. O teste foi feito com os valores transformados, os valores apresentados não estão transformados.

Em relação ao tipo de frasco utilizado, não houve diferença entre o frasco 1 e 2 para número de minitubérculo produzidos nem para peso total (Tabela 4 e 7). Porém houve diferença para a característica peso médio, sendo o frasco 1 (tubo de ensaio) superior ao 2 (vidro de maionese) (Tabela 9). Essa diferença pode ser explicada pela quantidade de nutrientes e sacarose disponíveis no meio nutritivo em relação ao número de explantes por frasco. No frasco 1 a proporção era 10ml de meio para 1 explante e no frasco 2 era 25 ml de meio para 4 explantes (6,25 ml/explante).

Em relação a peso médio do minitubérculo, foram observadas diferenças significativas tanto para balanço quanto para frasco (Tabela 9 e 10, Figura 9), sendo que os tratamentos 7, 4 e 5 foram os melhores e o tratamento 3 o pior desempenho. O mesmo resultado foi observado para peso total dos minitubérculos.

Tabela 7 - Análise de Variância do peso total de minitubérculos produzidos in vitro. Análise preliminar.

Fontes de Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F ^z	Sig
Total	47	4047,466			
Total de redução	17	2138,016	125,7656	1,98	*
Rep	2	132,2490	66,12450	1,04	n.s.
Fras	1	228,2460	228,2460	3,59	n.s.
Bal	7	1492,245	213,1779	3,35	**
FrasXBal	7	285,2755	40,75365	0,64	n.s.
Resíduo	30	1909,451	63,64835		

C.V. = 62.030

Tabela 8 - Análise de Variância do peso total de minitubérculos produzidos in vitro. Decomposição em contrastes ortogonais e regressão linear

Fonte de Variação	G.L.	SQ	Qm	FZ	Prob	
8 X (1-7)	1	5,065	5,065	0,080	0,780	NS
7 X (1-6)	1	247,553	247,553	3,889	0,058	NS
(1-3) X (4-6)	1	43,605	43,605	0,685	0,414	NS
Dentro 1-3	2	656,058	328,029	5,154	0,012	*
Regr Linear	1	507,789	507,789	7,978	0,008	**
Desvios	1	148,269	148,269	2,330	0,137	NS
Dentro 4-6	2	539,964	269,982	4,242	0,024	*
Regr Linear	1	409,833	409,833	6,439	0,017	*
Desvios	1	130,131	130,131	2,045	0,163	NS
Resíduo	30		63,648			

Os minitubérculos produzidos em tubo de ensaio apresentaram maior peso médio do que os produzidos no frasco tipo maionese (Figura 10), sendo que não houve diferença em relação ao número de minitubérculos produzidos (Figura 11). Essa diferença de peso médio pode ter sido causada pela menor quantidade de meio disponível por explante nos vidros de boca larga. Essa menor quantidade significa menor disponibilidade de sacarose, que como vimos, é necessária para o enchimento dos minitubérculos. O que pode ter acontecido é que o explante tenha recebido o estímulo de tuberização, mas não teve sacarose disponível em níveis suficientes para permitir a formação do minitubérculo.

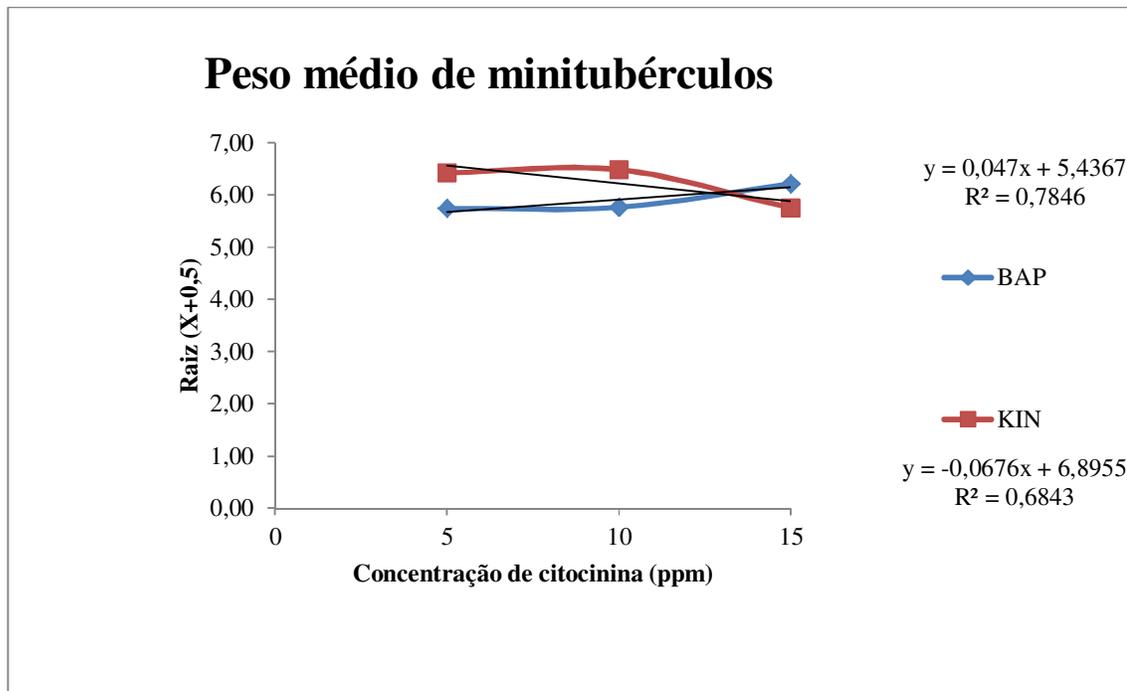


Figura 8. Peso médio de minitubérculos (mg) por concentração de citocininas com as regressões lineares correspondentes. Valores de peso transformados para $\sqrt{(x + 0,5)}$.

TABELA 9 - Análise de Variância do peso médio de minitubérculos produzidos in vitro. Análise preliminar.

Fontes de Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F ^Z	Sig
Total	47	371,0874			
Total de Redução	17	215,8574	12,69749	2,45	*
Rep	2	0,8091162	0,4045581	0,08	n.s.
Fras	1	34,29011	34,29011	6,63	*
Bal	7	139,5609	19,93727	3,85	**
Fras X Bal	7	41,19725	5,885321	1,14	n.s.
Resíduo	30	155,23	5,174334		

C.V.= 40.369

^Z - n.s.: não significativo; * - significativo a nível de 5 %; ** - significativo a nível de 1%

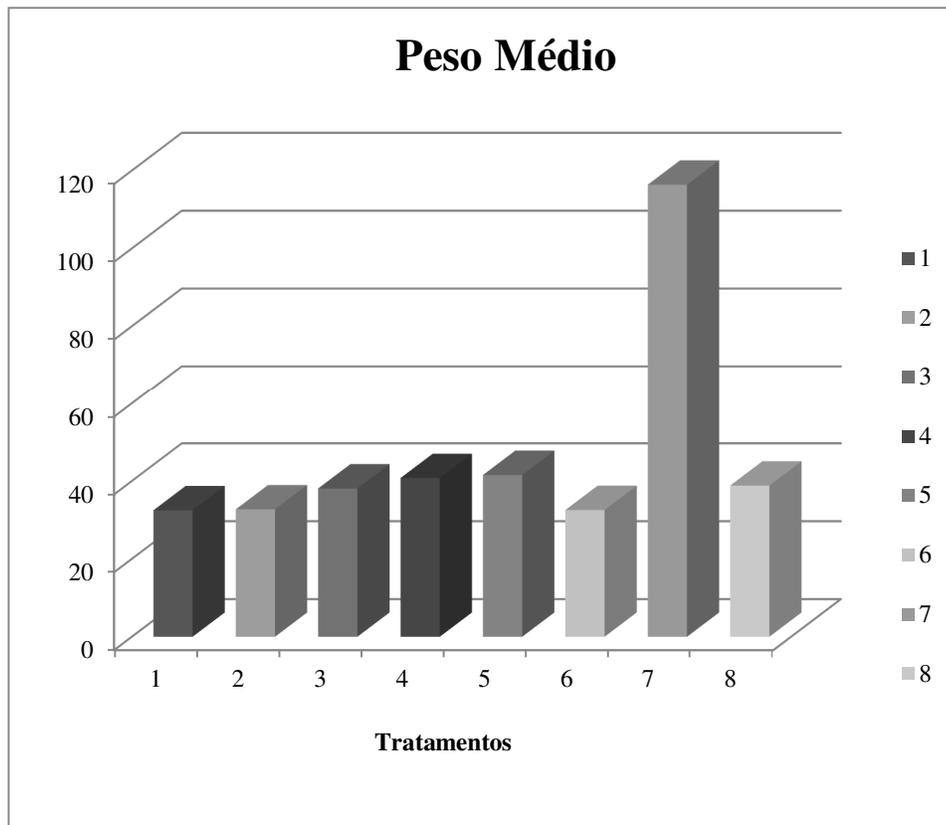


Figura 9 – Peso médio de minitubérculo (mg) produzidos em função do balanço hormonal usado (tratamentos). Valores não transformados. Legenda: 1 (AIB 1 ppm, BAP 5 ppm, KIN 0 ppm); 2 (AIB 1 ppm, BAP 10 ppm, KIN 0 ppm); 3 (AIB 1 ppm, BAP 15 ppm, KIN 0 ppm); 4 (AIB 1 ppm, BAP 0 ppm, KIN 5 ppm); 5 (AIB 1 ppm, BAP 0 ppm, KIN 10 ppm); 6 (AIB 1 ppm, BAP 0 ppm, KIN 15 ppm); 7 (AIB 1 ppm, BAP 0 ppm, KIN 0 ppm); 8 (AIB 0 ppm, BAP 0 ppm, KIN 0 ppm).

Tabela 10. Análise de Variância do peso médio de minitubérculos produzidos in vitro. Decomposição em contrastes ortogonais e regressão linear

Fonte de Variação	G.L.	SQ	Qm	FZ	Probab.	Sig.
8 X (1-7)	1	0,078	0,078	0,015	0,903	ns
7 X (1-6)	1	90,720	90,720	17,533	0,000	**
(1-3) X (4-6)	1	21,917	21,917	4,236	0,048	*
Dentro 1-3	2	17,130	8,565	1,655	0,208	ns
Linear	1	13,430	13,430	2,595	0,118	ns
Desvio	1	3,700	3,700	0,715	0,404	ns
Dentro 4-6	2	9,444	4,722	0,913	0,412	ns
Linear	1	6,460	6,460	1,248	0,273	ns
Desvio	1	2,984	2,984	0,577	0,454	ns
Resíduo	30		5,174			

^Z - n.s.: não significativo; * - significativo a nível de 5 %; ** - significativo a nível de 1%

A vantagem dos frascos de boca larga nesse tipo de trabalho, que visa uma aplicação comercial, é em relação ao manuseio do material. Usando esse tipo de frasco há uma economia muito grande de tempo na manipulação do material na hora da inoculação. Por isso é importante tentar fazer com que sua produção, em minitubérculos, seja igual ao alcançado com os tubos de ensaio. Recomenda-se que novos experimentos sejam realizados respeitando a proporção entre meio de cultura e número de explantes.

O resultado que aponta como melhor balanço para peso médio de minitubérculos o meio com AIB somente, contraria a maior parte da literatura (CASTEL et alli, 1976; FORSLINE & LANGILLE, 1975; FORSLINE & LANGILLE, 1976; LECLERC et alli, 1994; MAUK & LANGILLE, 1978; EWING, 1995). Nos estudos realizados a ênfase sempre foi em relação aos efeitos da citocinina e outros fitorreguladores sobre a tuberização. O papel da auxina na tuberização não é suficientemente estudado. Não existem relatos indicando seu grau de importância, sendo seu estudo ainda muito pouco aprofundado (EWING, 1995).

Esses resultados nos levam a um problema em relação a qual melhor balanço deve ser utilizado para a tuberização *in vitro*. Como a resposta à tuberização *in vitro* parece ser influenciada pelo material genético utilizado, não recomendamos que um único protocolo seja recomendado como o melhor meio de tuberização para todas as cultivares de batata.

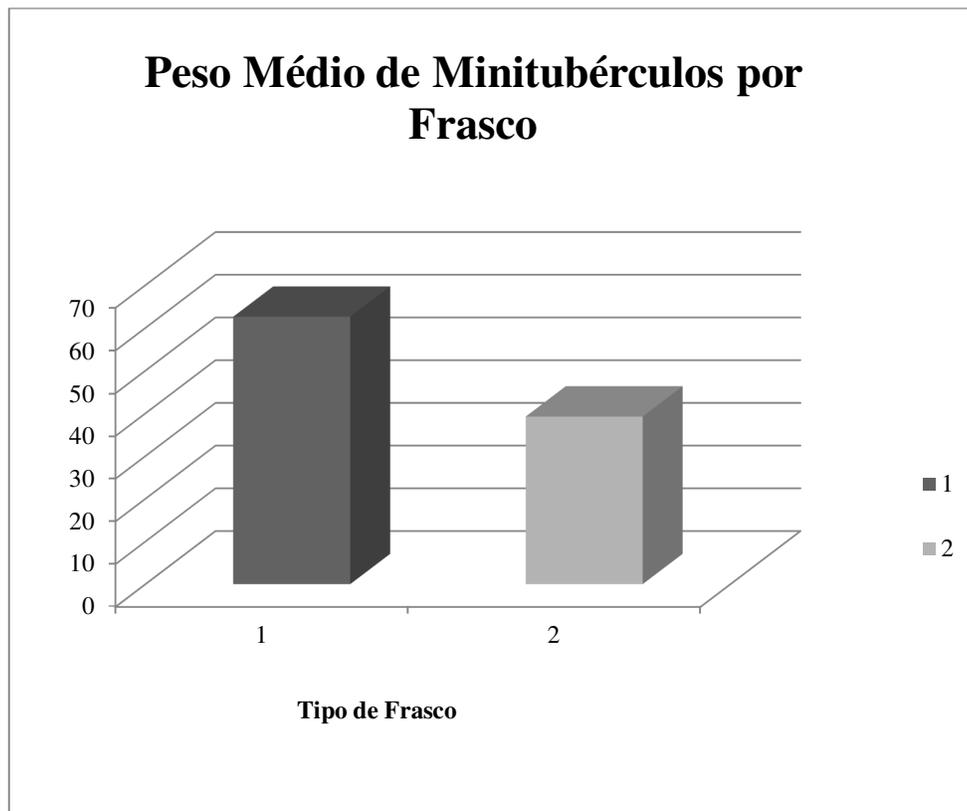


Figura 10 – Peso médio dos minitubérculos produzidos em função do tipo de frasco utilizado. Na legenda: Tipo 1 – Tubo de ensaio; Tipo 2 – Frasco de boca larga.

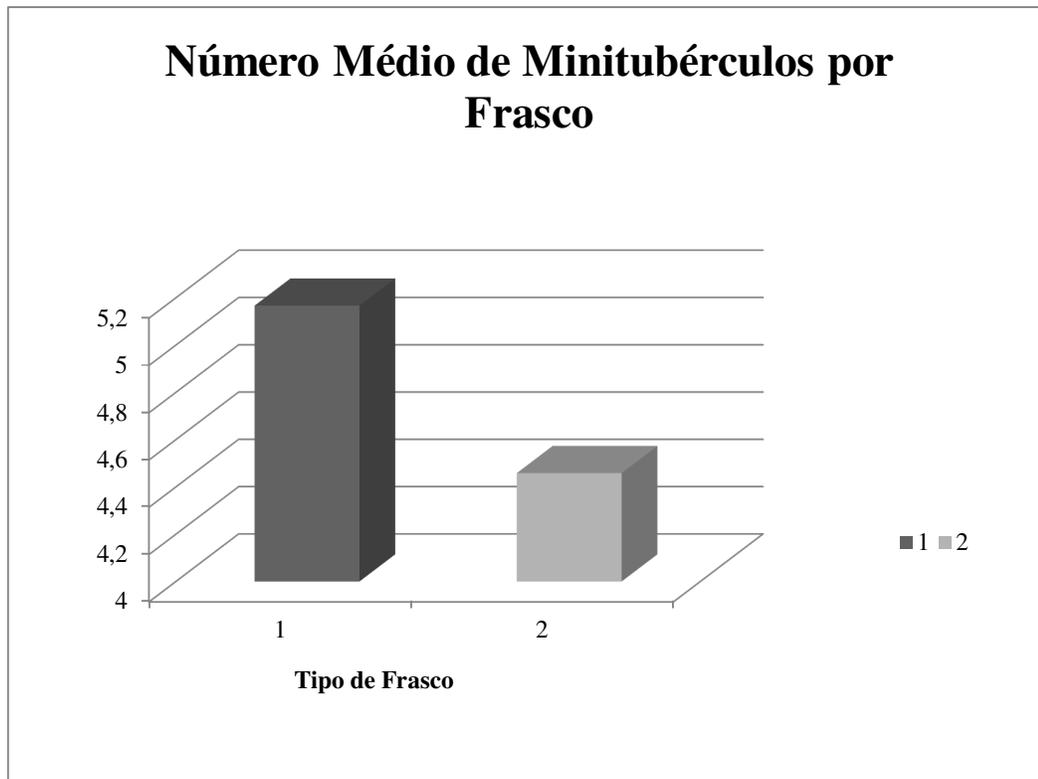


Figura 11 – Número médio de minitubérculos produzidos por tratamento em função do tipo de frasco utilizado. Na legenda: Tipo 1 – Tubo de ensaio; Tipo 2 – Frasco de boca larga.

4.2 CAMPO

Como mostram as tabelas de contingência (Tabela 11), em nenhum dos dois plantios o meio de origem interferiu na capacidade do minitubérculo de apresentar produção. A análise foi feita para cada plantio separadamente, e depois para os valores totais dos dois plantios. A porcentagem dos minitubérculos plantados que produziram tubérculos no canteiro foi de 70 % (Figura 9). Isso ainda é um valor baixo quando se pensa em utilização comercial do produto.

De acordo com as análises, a produção em campo não foi influenciada pelo meio de origem do minitubérculo (Tabela 12 e 13), em nenhum dos dois plantios.

Os valores de produção obtidos no experimento em campo estão apresentados na tabela 14, separados em primeiro e segundo plantio.

O peso inicial do minitubérculo plantado teve correlação negativa com o número de tubérculos produzidos por planta e positiva em relação aos pesos unitários fresco e seco no primeiro plantio (Tabela 15). A correlação usada foi a não paramétrica (correlação de Spearman) devido a não distribuição normal dos mesmos (SIEGEL, 1975; CAMPOS, 1983). O programa SAEG foi utilizado para os cálculos.

Não foi medida correlação significativa para os mesmos valores no segundo plantio (Tabela 16). O coeficiente de variação foi bem alto, o que pode estar interferindo na não significância dos resultados. É necessária a implantação de um novo plantio e um novo acompanhamento do ciclo da cultura para que se possa confirmar as correlações observadas no primeiro plantio.

Os valores da correlação obtidos para o primeiro plantio correspondem ao esperado de acordo com a revisão, pois existe uma correlação positiva entre o peso inicial da batata-semente e a produção em campo (REIFSCHNEIDER, 1987). O valor negativo para número de tubérculos é contrário à essa informação, mas esses dados não se repete no segundo plantio.

Tabela 11 – Tabelas de contingência para número de plantas que apresentaram produção em relação ao meio de origem do minitubérculo.

A) Valores do primeiro plantio.

Meio de origem	Total plantado	Plantas que produziram	Não produziram/morreram
1	10	9	1
2	12	7	5
3	4	2	2
4	10	7	3
5	16	14	2
6	8	7	1
7	6	3	3
8	5	2	3
Total	71	51	20

X^2 calculado = 10,54 – não significativo

B) Valores do segundo plantio.

Meio de origem	Total plantado	Plantas que produziram	Não produziram/morreram
1	13	9	4
2	8	5	3
4	14	11	3
5	26	18	8
6	15	8	7
7	24	17	7
8	8	6	2
Total	108	74	34

X^2 calculado = 2,65 – não significativo

C) Valores somados para os dois plantios.

Meio de origem	Total plantado	Plantas que produziram	Não produziram/morreram
1	23	18	5
2	20	12	8
3	4	2	2
4	24	18	6
5	42	32	10
6	23	15	8
7	30	20	10
8	13	8	5
Total	179	125	54

X^2 calculado = 4,38 – não significativo

Tabela 12 – Resumo das análises de Variância dos valores de produção em campo no primeiro plantio, segundo o balanço hormonal utilizado na produção dos minitubérculo.

Fontes de Variação	GL	Características avaliadas				
		NT	PFT	PST	PFUT	PSUT
QM Tratamento	7	80,17	265,74	9,07	1,57	0,06
QM do Resíduo	42	78,35	158,10	4,91	0,95	0,03
F		1,023	1,681	1,847	1,650	1,718
Sig		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
CV%		60,5	70,7	77,7	69,2	80,8

n.s.: não significativo.

Obs.: NT – número de tubérculos; PFT – Peso fresco total; PST – Peso seco total; PFUT – Peso fresco unitário de tubérculos e PSUT – Peso seco unitário de tubérculos.

Tabela 13 – Resumo das análises de Variância dos valores de produção em campo no segundo plantio, segundo o balanço hormonal utilizado na produção dos minitubérculo.

Fontes de Variação	GL	Características avaliadas				
		NT	PFT	PST	PFUT	PSUT
QM Tratamento	6	96,79	300,05	10,79	2,58	0,09
QM do Resíduo	66	85,02	497,88	15,31	2,19	0,07
F		1,138	0,603	0,705	1,182	1,272
Sig		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
CV%		56,7	56,3	63,3	53,3	62,3

n.s.: não significativo.

Obs.: NT – número de tubérculos; PFT – Peso fresco total; PST – Peso seco total; PFUT – Peso fresco unitário de tubérculos e PSUT – Peso seco unitário de tubérculos.

Como essas correlações não se repetiram nos dois plantios, fica a incerteza em quanto o peso inicial do minitubérculo pode interferir na produção, ou se ele não interfere. Essa resposta é necessária para escolher o meio de produção dos minitubérculo em condições *in vitro*, e para selecionar/classificar os minitubérculos em função de peso para plantio comercial.

Se considerarmos a correlação positiva, temos que trabalhar com os maiores minitubérculos produzidos *in vitro*, para que se possa aumentar o peso dos tubérculos

formados. Caso essa correlação não se confirme, o aumento do peso do tubérculo será devido somente ao manejo adotado.

Tabela 14: Produção de tubérculos provenientes do plantio de minitubérculos em canteiros.

	Primeiro plantio	Segundo plantio
Número de tubérculos	731	1190
Produção total (gramas)	888,8	1166,9
Produção média de tubérculos por planta	14,62	16,081
Produção por planta (gramas)	17,776	15,769
Peso médio dos tubérculos (gramas)	1,216	0,98

Como está comprovada a capacidade de produção em campo do minitubérculo utilizado como propágulo, falta adequar um manejo que permita aumentar os valores obtidos, principalmente em relação ao peso médio dos tubérculos formados. Esses tubérculos produzidos com peso de 1g podem ser usados como um novo propágulo para multiplicação do material.

Foi observada a formação de tubérculos aéreos em ambos os plantios (Figura 13). Examinando as plantas onde isso ocorreu, pode-se constatar a presença de lesões em todos os caules onde foram formados os tubérculos aéreos. Isso confirma o encontrado na literatura, que cita a possível formação destes tubérculos aéreos devido à presença dessas lesões. Sua formação é causada por uma interrupção do fluxo de fotoassimilados que deveriam ser translocados para os tubérculos em formação. Com essa interrupção, a gema imediatamente acima da lesão inicia um processo de tuberização, e os fotoassimilados são então armazenados neste tubérculo (EWING, 1995).

Foi observada também a formação de estolons secundários. Esses estolons iniciam seu desenvolvimento em tubérculos subterrâneos e podem formar novos tubérculos em seus ápices (Figuras 14 e 15). A normalidade fisiológica dessa formação é provocada por alta temperatura em razão do aumento do nível de GA endógeno (LUGT, 1960; LUGT, 1964; MAVES et alli, 1981; RANDENI & CAESAR, 1986). Para estudar melhor esse efeito teria que se monitorar a variação de temperatura local e do solo, o que pode ser feito em próximos experimentos.

Temos como conclusão em ambos os plantios, que o balanço hormonal do meio onde o minitubérculo foi formado em laboratório não interferiu nos parâmetros avaliados (tabela 12 e 13). Como dito anteriormente, no primeiro plantio houve uma correlação negativa entre o peso inicial do minitubérculo e o número de tubérculos produzidos (Tabela 15). Foi constatada também uma correlação positiva entre o peso do minitubérculo plantado e o peso unitário dos tubérculos formados (Tabela 15). Esses resultados, porém, não se repetem nos dois plantios (Tabela 16), o que nos leva à necessidade de montar um novo experimento em condições de campo para estudar melhor essas correlações.

Em experimentos futuros existe a necessidade de se plantar, junto aos minitubérculos, batata-semente para que se possa comparar a produção em campo. Em próximo experimento será realizado o plantio lado a lado dos dois tipos de propágulos, o que irá permitir uma melhor avaliação do desempenho dos minitubérculos em campo.

Tabela 15 - Correlações de Spearman entre peso do minitubérculo plantado e valores de produção referentes ao primeiro plantio em campo.

VARIÁVEL	CORRELAÇÃO	SIGNIFICÂNCIA
Número de tubérculos	-0,3538	**
Peso fresco total dos tubérculos	-0,1005	n.s.
Peso seco total dos tubérculos colhidos	-0,735	n.s.
Peso fresco unitário dos tubérculos	0,3753	**
Peso seco unitário dos tubérculos.	0,3603	**

Obs: n.s. – não significativo; * - significativo a nível de 5%; ** - significativo a nível de 1%.

Tabela 16 - Correlações de Spearman entre peso do minitubérculo plantado e valores de produção referentes ao segundo plantio em campo.

VARIÁVEL	CORRELAÇÃO	SIGNIFICÂNCIA
Número de tubérculos	0,0184	n.s.
Peso fresco total dos tubérculos	-0,0635	n.s.
Peso seco total dos tubérculos colhidos	-0,0156	n.s.
Peso fresco unitário dos tubérculos	-0,031	n.s.
Peso seco unitário dos tubérculos.	0,0171	n.s.

Obs: n.s. – não significativo.

Isso traz de volta a questão inicial da produção dos minitubérculos em laboratório. Como o tratamento para balanço hormonal não apresentou nenhuma interferência na produção em campo, os balanços escolhidos para futuros experimentos devem ser aqueles que apresentaram maior número de minitubérculos. Um problema a ser superado no futuro é o número de minitubérculo formados por explante e seu peso médio.

A produção de minitubérculos utilizando biorreatores já foi demonstrada (AKITA & TAKAYAMA, 1994). Esse método pode aumentar muito a produtividade dos minitubérculos. A utilização de meio líquido aos explantes já inoculados pode também ser usada para aumentar essa produtividade (LECLERC et alli, 1994).

Os resultados obtidos em nosso laboratório apontam para uma produção de menos de 1 minitubérculo por explante no melhor tratamento utilizado. Alguns trabalhos citam valores de produção bem maiores, inclusive para peso médio dos minitubérculos (WIERSEMA et alli, 1987). Como o papel da auxina e a interação dos balanços precisa ser adequada para cada cultivar, são necessários novos experimentos usando diferentes balanços hormonais e diferentes cultivares.

Os trabalhos disponíveis na literatura apresentam várias cultivares diferentes, e a maioria não são plantadas aqui no Brasil. Alguns ensaios precisam ser montados com as cultivares mais plantadas aqui para testar a capacidade delas produzirem minitubérculo *in vitro*. Como foi constatado em ensaios no laboratório, alguns materiais genéticos se desenvolvem melhor do que outros em meio de cultura, como exemplo a cultivar Achat.

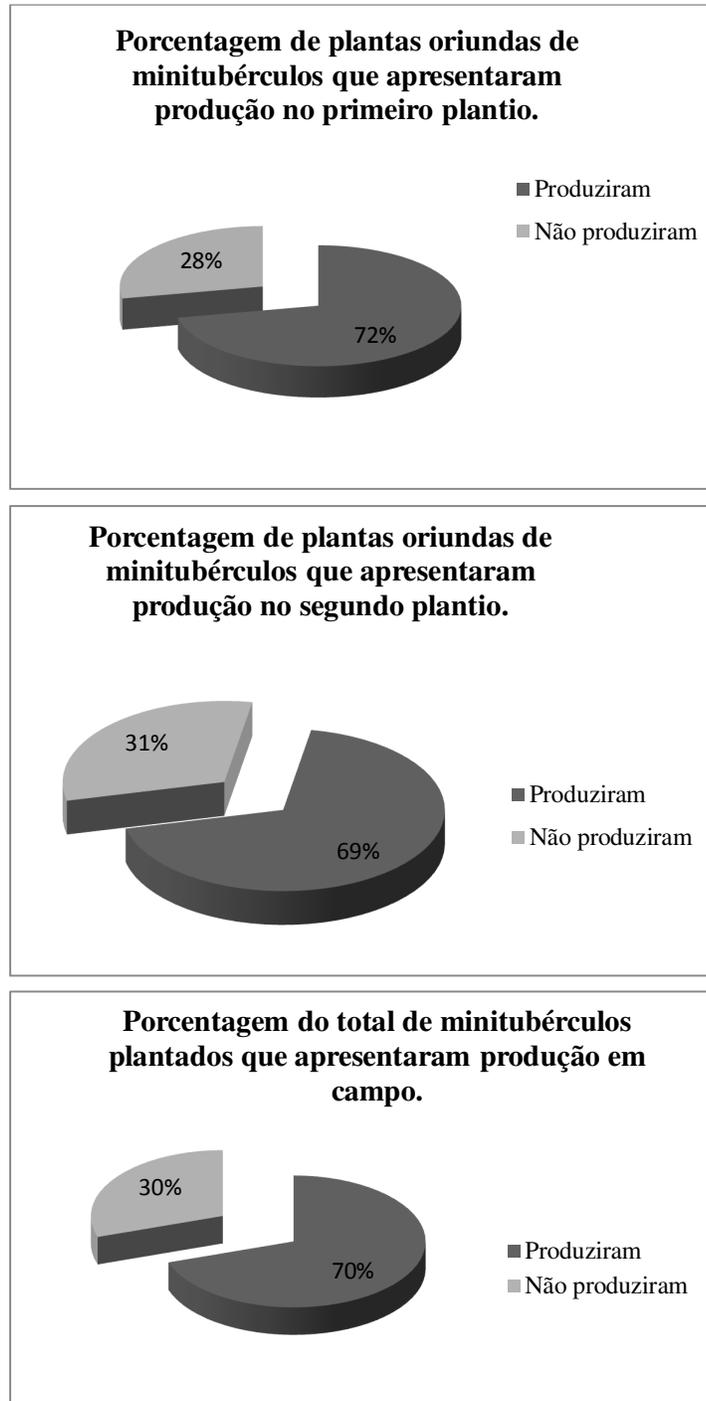


Figura 12 – Percentual de plantas que apresentaram produção de tubérculos em condições de campo nos dois plantios e com o total das produções.



Figura 13 – Tubérculos aéreos formados em campo.



Figura 14 – Tubérculos oriundos de minitubérculos plantados apresentando crescimento de estólion secundário.



Figura 15 – Tubérculo produzido em campo apresentando crescimento secundário.

5 CONCLUSÃO

Os resultados indicam que o número dos minitubérculos produzidos *in vitro* não dependeu do equilíbrio dos fitorreguladores, pois os tratamentos não apresentaram diferenças significativas. Porém em relação a peso total e peso médio de minitubérculo, o balanço somente com AIB (1 ppm) apresentou os melhores resultados para a cultivar JeatBintje.

Como o papel da Auxina ainda não é bem claro no processo de tuberização, é necessário que se conduzam estudos visando elucidar melhor sua função. Tanto no processo de indução quanto na tuberização.

No protocolo estabelecido por PRADO (1992), para a cultivar Chiquita, foi determinado que o balanço hormonal de AIB com BAP, nas concentrações de 1 e 10 ppm respectivamente, foi o que apresentou a maior produção de minitubérculos. Isso não foi observado para a cultivar JeatBintje, o que indica, provavelmente, que a regulação fisiológica da tuberização é cultivar dependente. Ou seja, o protocolo deve ser otimizado para cada cultivar. Deve-se fazer um teste inicial antes de iniciar uma produção comercial para cada cultivar. Podem ocorrer variações de produção devido a condições intrínsecas de cada laboratório. Isso é confirmado em trabalhos utilizando outras cultivares.

Os minitubérculos produzidos *in vitro* possuem a capacidade de regenerar uma planta inteira em campo, com subsequente fechamento do ciclo no tocante à produção de tubérculos.

Aparentemente existe uma correlação negativa para produção em número de tubérculos por planta, e uma correlação positiva entre o peso inicial e o peso unitário do tubérculo produzido. Porém os resultados não se repetem nos dois plantios realizados.

Visto que foi provada a viabilidade do aproveitamento do minitubérculo, passa a ser necessário o estudo de tratos culturais adequados visando aumentar a produção dos tubérculos em condições de campo. Um estudo mais detalhado quanto à época de plantio, adubação e irrigação, assim como ao tempo que o material deve ficar em estufas ou se deve ou não ser plantado diretamente em canteiros.

6 BIBLIOGRAFIA

1. ACCATINO, P. & MALAGAMBA, P. 1982. Potato production from true seed. Annual Report CIP 1981. Lima, Peru.
2. AKITA, M., TAKAYAMA, S. (1994) Induction and development of potato tubers in a jar fermentor. *Plant Cell Tiss. and Org. Cult.* 36, 177-182.
3. ALCHANATIS, V., PELEG, K., ZIV, M. (1994) Morphological control and mensuration of potato plantlets from tissue culture for automated micropropagation. *Plant Cell Tiss. and Org. Culture* 36, 331-338.
4. ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO BRASIL (IBGE, 1996).
5. BROWN, C.R. (1993) Origin and history of the potato. *Am. Potato J.* 70, 363-373.
6. CAMPOS, H. (1983) *Estatística experimental não-paramétrica.* Ed. ESALQ-Piracicaba/SP, 349p.
7. CASTEL, A. M.; YOUNG, R. E. & SMITH, O. E. 1976. Kinetin-induced tuberization of potato in vitro: on the mode of action of Kinetin. *Plant and Cell Physiology* 17, 557-570.
8. EWING, E.E (1995) The role of hormones in potato (*Solanum tuberosum* L.) tuberization – Do livro: *PLANT HORMONES – physiology, biochemistry and molecular biology.*
9. EWING, E.E., WAREING, P.F. (1978) Shoot, stolon, and tuber formation on Potato (*Solanum tuberosum* L.) cuttings in response to photoperiod. *Plant. Physiol.* 61, 348-353.
10. FEDALTO, A.A. (1982) Avaliação da produtividade de tubérculos de plantas oriundas de sementes sexuadas de batata (*Solanum tuberosum* L.) e da primeira geração de propagação vegetativa. Tese de Mestrado Viçosa Minas Gerais.
11. FEDALTO, A. A. & MIZUBUTI, A. (1984) Avaliação de densidade populacionais com plântulas de batata oriundas de sementes botânicas. *Horticultura Brasileira* 2 (2), 15-21.
12. FORSLINE, P.L., LANGILLE A. R. (1975) Endogenous cytokinins in *Solanum tuberosum* as influenced by photoperiod and temperature. *Physiol. Plant.* 34, 75-77.
13. FORSLINE, P.L., LANGILLE A. R. (1976) An assessment of the modifying effect of kinetin on in vitro tuberization of induced and non-induced tissues of *Solanum tuberosum*. *Can. J. Bot.* 54, 2513-2516.

14. FREIRE, M. O. ; SILVA, F.G. ; CARVALHO, A.C.P.P. ; NENARTAVIS, E. G. ; MIRANDA, R. M. . Implantação de quatorze cultivares de batata (*Solanum tuberosum*), visando a produção de minitubérculos *in vitro*. In: VII Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal, 1997, Belém - PA. Resumos do VII Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal, 1997. p. 135-135.
15. GARCIA-TORRES, L., GOMEZ-CAMPO, C. (1973) *In vitro* tuberization of potato sprouts as affected by ethrel and gibberellic acid. *Potato Res.* 16, 73-79.
16. GREGORY, L. E. (1956) Some factors for tuberization in the potato plant. *American Journal of Botany* 43 (4), 281-288.
17. GROSS, D., PARTHIER, B. (1994) Novel natural substances acting in plant growth regulation. *J. Plant Growth Regul.* 13, 93-114.
18. HANNAPPEL, D.J., MILLER, J.C., Jr, PARK, W.D. (1985) Regulation of potato tuber protein accumulation by gibberellic acid. *Plant Physiol.* 78, 700-703.
19. HARMEY, M.A., CROWLEY, M.P., CLINCH, P.E.M. (1966) The effect of growth regulators on tuberization of cultured stem pieces of *Solanum tuberosum*. *Eur. Potato J.* 9, 146-151.
20. HUSSEY, G. STACEY, N.J. (1981) *In vitro* propagation of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Ann. Bot.* 48, 787-796.
21. HUSSEY, G. STACEY, N.J. (1984) Factors affecting the formation of *in vitro* tubers of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Ann. Bot.* 53, 565-578.
22. KODA, Y., KIKUTA, Y., TAZAKI, H., TSUJINO, Y., SAKAMURA, S., YOSHIHARA, T. (1991) Potato tuber-inducing activities of jasmonic acid and related compounds. *Phytochemistry* 30, 1435-1438.
23. LANGILLE, A.R., FORSLINE, P.L. (1974) Influence of temperature and photoperiod on cytokinin pools in the potato *Solanum tuberosum* L. *Plant Sci. Lett.* 2, 189-191.
24. LAWRENCE, C. H. & BARKER, W. G. (1963) A study of tuberization in the potato *Solanum tuberosum*. *American Potato Journal* 40, 349-356.
25. LECLERC, Y., DONNELLY, D.J., SEABROOK, J.E.A. (1994) Microtuberization of layered shoots and nodal cuttings of potato: The influence of growth regulators and incubation periods. *Plant Cell Tiss. and Org. Cult.* 37, 113-120.
26. LUGT, C.K. (1960) Second growth phenomena. *Eur. Potato J.* 3, 307-325.

27. LUGT, C.K., BODLEANDER, B.A., GOODJIK, C. (1964) Observations on the induction of second-growth in potato tubers. *Eur. Potato J.* 7, 219-227.
28. MAUK, C. S. & LANGILLE, A. R. (1978). Physiology of tuberization in *Solanum tuberosum*. *Plant Physiology* 62, 438-442.
29. MAVES, D.J., MARSHNER, H., SPURR, A.R. (1981) Effect of gibberellic acid on growth and carbohydrate metabolism of the developing tubers of potato (*Solanum tuberosum* L.) *Physiol. Plant.* 52, 267-274.
30. MENZEL, C.M. (1981) Tuberization in potato at high temperatures: promotion by disbudding. *Ann. of Bot.* 47, 727-733.
31. MENZEL, C.M. (1983) Tuberization in potato at high temperatures: interaction between shoot and root temperatures. *Ann. of Bot.* 52, 65-69.
32. MINGO-CASTEL, A.M., SMITH, O.E., KUMAMOTO, J. (1976). Studies on the carbon dioxide promotion and ethylene inhibition of tuberization in potato explants cultured *in vitro*. *Plant Physiol.* 57, 480-485.
33. MONTIEL, G. O. & SALDAÑA, H. L. (1987) Potato minitubers: technology validation in México. *American Potato Journal* 64, 535-544.
34. MURASHIGE, T., SKKOG, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with Tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15, 473-497.
35. NOWAK, J. & COBORNE, D. (1989) In vitro tuberization and tuber proteins as indicators of heat stress tolerance in potato. *American Potato Journal* 66, 35-45.
36. PALMER, C. E. SMITH, O. E. (1969) Cytokinins and tuber initiation in the potato *Solanum tuberosum*. *Nature* 221, 279-280.
37. PALMER, C.E., SMITH, O.E. (1970) Effects of kinetin on tuber formation on isolated stolons of *Solanum tuberosum* L. cultured *in vitro*. *Plant Cell Physiol.* 11, 303-314.
38. PELACHO, A.M., MINGO-CASTEL, A.M. (1991) Jasmonic acid induces tuberization of potato stolons cultured *in vitro*. *PlantPhysiol.* 97, 1253-1255.
39. PRADO, M. A. (1992) Estudo de tuberização “in vitro” de batata (*Solanum tuberosum*). Tese de Mestrado UFRRJ.
40. RANDENI, G., CAESAR, K. (1986) Effect of soil temperature on the carbohydrate status in the potato plant (*Solanum tuberosum* L.). *J. Agron. Crop Sci.* 156, 217-224.
41. REIFSCHNEIDER, F. J. B. (1987) Produção de Batata. Linha Gráfica e Editora, 239p.

42. SEABROOK, J.E.A., COLEMAN, S., LEVY, D. (1993) Effect of photoperiod on *in vitro* tuberization of potato. *Plant. Cell Tiss. And Org. Cult.* 34, 43-51.
43. SIEGEL, S. (1975) Estatística não paramétrica. Ed McGraw-Hill Ltda, 350p.
44. TEIXEIRA, D.M.C. (1989) Influência do N, Sacarose, BAP e idade da plântula sobre a minituberização de Batata (*Solanum tuberosum* L. cvBintje) *in vitro*. Tese de mestrado. ESAL – Lavras/MG. 55p.
45. TEIXEIRA, D. M. C. & PINTO, J. E. B. P. (1991) Minituberização de batata em diferentes níveis de sacarose e BAP. *Rev. Bras/ de Fisiologia Vegetal* 3(2), 77-81.
46. TORRES, A.C., CALDAS, L.S. (1990) Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas. ABCTP/EMBRAPA – CNPH 433p.
47. TOVAR, P. et alli (1985) Induccion y utilizacion de tubérculos “in vitro” de papa. Circular del CIP (Centro Internacional de la Papa).
48. VREUGDENHIL, D., STRUIK, P.C. (1989) An integrated view of the hormonal regulation of tuber formation in potato (*Solanum tuberosum*). *Physiol. Plant.* 75, 525-531.
49. WANG, P. & HU, C. (1982) In vitro mass tuberization and virus-free seed-potato production in Taiwan. *American Potato Journal* 59, 33-37.
50. WARDLAW, I.F. (1990) The control of carbon partitioning in plants. *New Phytol.* 116, 341-381.
51. WIERSEMA, S.G.; CABELLO, R.; TOVAR, P. & DODDS, J.H. (1987) Rapid seed multiplication by planting into beds micro tubers and in vitro plant. *Potato Research* 30: 117-120.