



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

**OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO *in vitro* DE MINITUBÉRCULOS
DE *Solanum tuberosum* cv. Jeat Bintje, DESTINADOS À BATATA
SEMENTE**

ERICH GUIMARÃES NENARTAVIS

*Sob a Orientação do Professor
Ricardo Motta Miranda*

Tese submetida como requisito
parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciências em Fitotecnia,
Área de Concentração em
Fisiologia da Produção.

Seropédica, RJ
Outubro de 2001

631.532

N437o

T

Nenartavis, Erich Guimarães,

Otimização da produção *in vitro* de minitubérculos
de *Solanum tuberosum* cv. Jeat Bintje, destinados à
batata semente/ Erich Guimarães Nenartavis. -2001.
XIV, 56f. : il., tabs.

Orientador: Ricardo Motta Miranda.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal
Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Agronomia.

Bibliografia: f.

1. Batata - Propagação *in vitro* - Teses. 2.
Plantas Propagação *in vitro* - Teses. 3. Células
vegetais - Cultura e meios de cultura - Teses. 4.
Tecidos vegetais - Cultura e meios de cultura -
Teses. I. Miranda, Ricardo Motta. II. Universidade
Federal Rural do Rio de Janeiro. Instituto de
Agronomia.

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

ERICH GUIMARÃES NENARTAVIS

Dissertação/Tese submetida ao Curso de Pós-Graduação em Fitotecnia, área de Concentração em Fisiologia da Produção, como requisito parcial para obtenção do grau de **Magister Scientiae** em Fitotecnia.

APROVADA EM 31/10/2001

**Ricardo Motta Miranda. Ph.D. UFRRJ.
(Orientador)**

Ana Cristina P. P. de Carvalho. Dr^a. EMBRAPA-CNPAT

Nídia Majerowicz. Dr^a. UFRRJ

RESUMO

NENARTAVIS, Erich Guimarães. **Otimização da produção *in vitro* de minitubérculos de *Solanum tuberosum* L. cv. Jeat Bintje, destinados à batata semente.** Seropédica: UFRRJ, 2001. 56p. (Dissertação - Mestrado em Fitotecnia).

Foram avaliados índices físico-morfológicos e de produção na cultura *in vitro* de *Solanum tuberosum* L. cv Jeat Bintje, em resposta a tratamentos fatoriais. Combinou-se BAP ou KIN (0; 5; 10 ou 15 mg/litro); AIB (0 ou 1 mg/litro); sacarose (0; 3; 6; 9 ou 12%) e ausência ou presença de luz por 16 h/dia (3000 lux) por 80 dias, com alternância entre estas condições aos 40 dias. Explantes excisados de matrizes *in vitro*, foram pré-expostos à 15°C/10h no escuro, estímulo suficiente para ocorrência de tuberização, quando em presença de sacarose. A tuberização foi favorecida pelo balanço de KIN e MB (5 e 1 mg/litro) e por concentração de sacarose superior a 6%. A ausência de luz nos primeiros 40 dias foi desfavorável à sobrevivência, principalmente quando as culturas foram transferidas para 16 h/dia de luz. Condições adversas foram atenuadas pelo AIB (1 mg/litro), que em condições favoráveis, incrementou a produtividade e o crescimento dos minitubérculos, tornando concentrações de sacarose supraótimas para alguns índices. Acredita-se que o MB favoreça o fluxo de assimilados. A formação de minitubérculo séssil, em altas concentrações de sacarose (9 e 12%), pode ser vantajosa. Propõe-se o ajuste do protocolo ao conceito de “stem and tuber” (GREGORY, 1956).

Palavras chave: tuberização *in vitro*, minitubérculo séssil, produtividade *in vitro*.

ABSTRACT

NENARTAVIS, Erich Guimarães. **Optimization of *in vitro* production of *Solanum tuberosum* L. cv. Jeat Bintje minitubers, suitable for “seed potato”.** Seropédica: UFRRJ, 2001. 56p. (Dissertation - Master of Science in Fitotecnia)

The work evaluated production data and morphological parameters, in the *in vitro* culture of *Solanum tuberosum* L. cv Jeat Bintje, in response to factorial treatments. It were combined the factors: BAP or KIN (0; 5; 10 or 15 mg/l); IBA (0 or 1 mg/l); sucrose (0; 3; 6; 9 or 12%); and absence or light presence for 16h/day (3000 lux) for 80 days, with alternation among these conditions to the 40 days. Explants excised from *in vitro* stock plants, were pre-exposed to 15°C/10h in the darkness, enough for tuber induction, when sucrose was present. The tuberization was favored by the balance KIN and IBA (5 and 1 mg/l) and for sucrose concentration higher than 6%. The light absence *in* the first 40 days was unfavorable to the survival, mainly when followed by 16 light h/day. Adverse conditions were attenuated by IBA (1 mg/l), which in favorable conditions increased the productivity and the growth of the tubercle, turning concentrations of sucrose supraoptimal in some situations. It is believed that IBA favored the flow of assimilate compounds. The formation of sessile minitubers, observed under high sucrose concentrations (9 and 12%), can be advantageous. It was proposed the adjustment of the protocol, to the concept of “stem and tuber” (GREGORY, 1956).

Key words: *in vitro* tuberization, sessile minitubers, *in vitro* productivity.

SUMÁRIO

1 - Introdução	1
2 - Material e Métodos	7
2.1 - Material vegetal e estabelecimento da cultura axênica	7
2.2 - Delineamento experimental	7
2.3 - Coleta de dados e análise estatística	8
3 - Resultados e Discussão	9
3.1 - Estabelecimento da cultura e tuberização	9
3.2 - Produtividade e caracterização dos tubérculos	25
4 - Conclusões	36
4.1 - Considerações finais	36
5 - Anexos	38
Anexo 1 - Cálculo do Volume Aparente (VAT) do Tubérculo	38
Anexo 2 - Análise da Variância	39
Ensaio I	39
Ensaio II	40
Ensaio III	41
Ensaio I e II conjuntamente	43
6 - Bibliografia consultada	44

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 -	Sobrevivência (%EV) de explantes de batata (cv. Jeat Bintje), em diferentes concentrações de sacarose.....	13
Tabela 2 -	Sobrevivência (%EV) de explantes de batata (cv. Jeat Bintje), em ausência e presença de sacarose e AIB.....	15
Tabela 3 -	Sobrevivência (%EV) de explantes de batata (cv. Jeat Bintje). em diferentes condições de luminosidade.....	15
Tabela 4 -	Sobrevivência (%EV) de explantes de batata (cv. Jeat Bintje). em ausência e presença AM. sob diferentes condições de luminosidade.....	16
Tabela 5 -	Sobrevivência (%EV) de explantes de batata (cv. Jeat Bintje). em ausência e presença de AIB e de sacarose. sob diferentes condições de luminosidade.....	17
Tabela 6 -	Massa fresca das brotações (MFB), de explantes de batata (cv Jeat Bintje). sob diferentes condições de luminosidade e níveis de fitorreguladores.....	22
Tabela 7 -	Produtividade por explante de batata (cv. Jeat Bintje). em função da concentração de citocinina. independentemente da fonte (BAP ou KIN).....	30
Tabela 8 -	Produtividade por explante de batata (cv. Jeat Bintje), em função da concentração de citocinina (BAP ou KIN).....	31
Tabela 9 -	Produtividade por explante de batata (cv. Jeat Bintje), em função da concentração de sacarose no meio de cultura.....	31
Tabela 10 -	Massa fresca dos tubérculos de batata (cv. Jeat Bintje). em função da concentração de citocinina.....	32
Tabela 11 -	Densidade “aparente” dos tubérculos (DAT), de batata (cv. Jeat Bintje), em função da presença de diferentes concentrações de citocinina (BAP ou KIN).....	37
Tabela 12 -	Frequência relativa, dos “sítios” onde foram formados os tubérculos e dos que brotaram até os 80 dias de cultivo em diferentes concentrações de sacarose no meio.....	38

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 -	Percentual de explantes de batata (cv Jeat Bintje), com brotações (%EB), aos 80 dias de cultura, em função da concentração de sacarose.....	18
Figura 2 -	Percentual de explantes de batata (cv Jeat Bintje), com brotações (%EB), aos 80 dias de cultura, em função das condições de luminosidade.....	18
Figura 3 -	Percentual de explantes de batata (cv Jeat Bintje) com brotações (%EB). aos 80 dias de cultura, em função da concentração de sacarose e das condições de luminosidade.....	19
Figura 4 -	Massa fresca das brotações (MFB) de explantes de batata (cv Jeat Bintje) aos 80 dias de cultura, em função da concentração de citocinina (BAP ou KIN)	20
Figura 5 -	Massa fresca das brotações (MFB), de explantes de batata (cv Jeat Bintje). em função da presença de AIB e das condições de luminosidade.....	21
Figura 6 -	Massa fresca das brotações (MFB), de explantes de batata (cv Jeat Bintje), aos 80 dias de cultura em meios com diferentes concentrações de sacarose.....	22
Figura 7 -	Massa fresca das brotações (MFB), de explantes de batata (cv Jeat Bintje), aos 80 dias de cultura em função de AIB e concentração de sacarose.....	23
Figura 8 -	Massa fresca (MFB) e seca (MSB) das brotações, de explantes de batata (cv Jeat Bintje), aos 80 dias de cultura em função das condições de luminosidade neste período.....	24
Figura 9 -	Massa seca das brotações (MSB), de explantes de batata (cv Jeat Bintje), aos 80 dias de cultura em meios com diferentes concentrações de sacarose.....	24
Figura 10	Massa fresca das brotações (MSB), de explantes de batata (cv Jeat Bintje), aos 80 dias de cultura em meios com diferentes concentrações de sacarose e MB.....	25
Figura 11 -	Percentual de explantes de batata (cv Jeat Bintje), que tuberizaram até os 80 dias de cultura (%EVT), em função da concentração de citocinina (BAP ou KIN).....	26

(continua)

ÍNDICE DE FIGURAS (continuação)

Figura 12 - Percentual de explantes de batata (cv Jeat Bintje), que tuberizaram até os 80 dias de cultura (%EVT), em função da concentração de sacarose.....	27
Figura 13 - Percentual de explantes de batata (cv Jeat Bintje), que tuberizaram até os 80 dias de cultura (%EVT). em função das concentrações de sacarose e MB.....	28
Figura 14 - Percentual de explantes de batata (cv Jeat Bintje) com brotações, que tuberizaram até os 80 dias de cultura (%EBT), em função da concentração de sacarose.....	28
Figura 15 - Percentual de explantes de batata (cv Jeat Bintje) com brotações, que tuberizaram até os 80 dias de cultura (%EBT), em função das concentrações de sacarose e MB.....	29
Figura 16 - Massa fresca dos tubérculos de batata (cv. Jeat Bintje), em função da concentração de sacarose no meio de cultura.....	33
Figura 17 - Diâmetro menor dos tubérculos (Dme) de batata (cv. Jeat Bintje), em função da concentração de sacarose no meio de cultura.....	34
Figura 18 - Diâmetro menor dos tubérculos (Dme) de batata (cv. Jeat Bintje), em função das concentrações de sacarose e AIB, em diferentes condições de luminosidade.....	35
Figura 19 - Densidade aparente dos tubérculos (DAT) de batata (cv. Jeat Bintje), em função da presença de luz e de 1,0 mg/litro de AIB no meio de cultura.....	36
Figura 20 - Densidade aparente dos tubérculos (DAT) de batata (cv. Jeat Bintje), em função da concentração de sacarose no meio de cultura.....	37
Figura 21 - Densidade aparente dos tubérculos (DAT) de batata (cv. Jeat Bintje), em diferentes condições de luminosidade.....	38
Figura 22 - Frequência relativa de tubérculos produzidos a partir de gemas apicais (%TA) em diferentes concentrações de sacarose, em ausência ou presença de 1,0 mg/litro de AIB.....	40

LISTA DE ABREVIATURAS

% EB	Frequência de explantes que desenvolveram brotações até os 80 dias de cultura
% EV	Frequência de explantes vivos aos 80 dias de cultura
% EBT	Frequência de explantes que tuberizaram, dentre aqueles que desenvolveram brotações
% EVT	Frequência de explantes que tuberizaram, excluindo-se os não sobreviventes
% TA	Frequência de tubérculos formados a partir de gemas apicais
% TB	Frequência de tubérculos que cujas gemas (olhos) brotaram <i>in vitro</i>
% TO	Frequência de tubérculos formados no explante original (tubérculos sésseis)
AIA	Ácido Indolacético
AIB	Ácido 4-(3-indolil) butírico (IBA)
AMB	Designação do fator relacionado às condições de luminosidade, na análise estatística.
BAP	6-Benzilaminopurina Benziladenina)
DAT	Densidade “aparente” do tubérculo (mg/mm ³)
Dma	Diâmetro do eixo maior do tubérculo (mm)
Dme	Diâmetro do eixo menor do tubérculo (mm)
KIN	Cinetina (6-fufurilamino-purina)
MFB	Massa fresca das brotações (mg/tubérculo)
MFT	Massa fresca do tubérculo (mg/tubérculo)
MS	Meio básico de Murashige e Skoog (1962)
MSB	Massa seca das brotações
PZ	Número de tubérculos por explante, considerando todos explantes.
PY	Número de tubérculos por explante, excluindo os explantes não sobreviventes
PX	Número de tubérculos por explante, considerando somente os explantes que tuberizaram
SAC	Sacarose
VAT	Volume “aparente” do tubérculo (mm ³) ¹

¹ Vide demonstração da fórmula para o cálculo do VAT em anexo.

1 - INTRODUÇÃO

O Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do Departamento de Fitotecnia do Instituto de Agronomia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro tem se empenhado não somente no estudo dos aspectos básicos que envolvem a propagação e cultura *in vitro* de vegetais, mas também no desenvolvimento de protocolos eficientes para produção em grande escala de plantas geneticamente superiores e isentas de patógenos. Neste sentido busca-se o estabelecimento de um sistema eficiente de produção de tubérculos de *Solanum tuberosum* L, utilizando-se as técnicas de propagação *in vitro*, e ainda a geração de dados e informações que venham a contribuir para a elucidação dos fatores envolvidos no processo de tuberização.

A batata-semente utilizada nos plantios comerciais, é oriunda de campos de produção, onde os propágulos iniciais, em sua maioria, são importados de países Europeus. Esta precaução com a sanidade do material propagativo onera o sistema produtivo. Atualmente as pesquisas buscam o aperfeiçoamento do processo de produção de batata-semente pré-básica², que já se utiliza plantas desenvolvidas *in vitro*, como propágulos iniciais, conforme descrito por DANIELS (1994). Experimentalmente, tubérculos produzidos *in vitro*, estão sendo testados pela Embrapa/Canoinhas³ (comunicação pessoal). Desse modo podemos afirmar que a evolução dos resultados de pesquisas na elucidação de alguns pontos obscuros do processo de tuberização e o aperfeiçoamento das técnicas atualmente utilizadas, tornam factível o uso de tubérculos produzidos *in vitro*, como batata-semente básica e mesmo, futuramente, para plantio direto no campo de produção. Entretanto é imprescindível que os custos envolvidos permitam a inserção maior da cultura axênica neste sistema produtivo.

Com o objetivo de participar da evolução do sistema produtivo de propágulos de batata cv Jeat Bintje, inserindo maior eficiência na disponibilização de material propagativo de excelente qualidade para uso na pesquisa da produção de batata-semente pré-básica, foram conduzidos ensaios para o ajuste do protocolo atualmente utilizado. Os ensaios foram baseados nos melhores resultados obtidos por estudos anteriores realizados no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do Instituto de Agronomia da UFRRJ. A avaliação dos ensaios descritos no presente trabalho pretendeu verificar quais condições de cultura, relativas à concentração e fonte de citocinina; luminosidade e concentração de sacarose, que melhor atendem ao objetivo proposto. Objetivou-se ainda verificar se o referido processo prescinde da presença de auxina, contribuindo com informações para a elucidação do papel deste regulador no processo de tuberização, conforme propôs FREIRE (1998). Os ensaios denominados I e II, avaliaram, entre BAP e KIN, qual a citocinina mais adequada à produtividade *in vitro*, e em que concentração. Os ensaios I e II permitiram ainda, inferências acerca da influência da presença de luz e de auxina (MB) nos índices produtivos estudados. O ensaio III objetivou verificar as melhores condições para suprimento de luz e sacarose e se utilizou da concentração e fonte de citocina mais promissora ao incremento quantitativo e qualitativo da produção de tubérculos *in vitro*, com base nos resultados dos ensaios I e II. O ensaio III também permitiu inferências acerca da atuação da auxina neste processo e sua interação com os outros fatores.

² A batata-semente básica é o propágulo para a produção de batata-semente certificada usada na produção comercial.

³ EMBRAPA - Serviço de Produção de Sementes Básicas - Gerência Local de Canoinhas SC.

A batata tem como centro de origem reconhecido, os Platôs Andinos, de onde foi levada para Europa e depois ao restante do mundo. Disseminou-se inicialmente como alimento característico de populações de baixa renda, sendo seu cultivo considerado estratégico em tempos de guerra, pois “armazenada” sob o solo, escapava à destruição e saques promovidos por exércitos inimigos (BROWN, 1993).

A importância da batata na dieta alimentar da população mundial é inquestionável, não só devido ao seu alto conteúdo energético, como também por seu teor de proteínas, sais minerais e vitaminas. No Brasil, o consumo nacional *per capita* gira em torno de 12 a 13 kg/ano, sensivelmente menor que a estimativa superior a 60 kg/ano de consumo *per capita*, observada em alguns países desenvolvidos. A cultivar Jeat Bintje, originária da Suécia, é um mutante da Bintje, sendo mais vigorosa e rústica que esta. Seu alto teor de matéria seca, a recomenda para o uso culinário com frituras, sendo apreciada também em purês e saladas (LOPES & BUSO, 1997).

A principal forma de propagação da batata é assexuada ou vegetativa, através da utilização de tubérculos denominados “batatas-semente” (REIFSCHINEIDER, 1987). O Brasil importa grande quantidade de batata-semente da Europa, para garantir a sanidade do material reprodutivo ao nível de campo. Tal operação ocasiona um custo elevado de produção, do qual 30 a 70% é associado à etapa de plantio. A utilização da semente botânica apesar de diminuir o risco de disseminação de doenças, acarreta uma alta variabilidade genética (FEDALTO, 1982), indesejável para o cultivo comercial deste produto agrícola.

A propagação *in vitro*, utilizando as técnicas de cultura de tecidos vegetais, é considerada a grande inovação tecnológica neste século para a produção rápida e uniforme de plantas superiores. Além de proporcionar maior velocidade para a produção de plantas, geneticamente idêntica à planta matriz pré-selecionada, a propagação *in vitro* permite a obtenção de mudas livres de doenças e pode resultar em expressiva redução de custos em comparação com métodos convencionais (ANDERSON & MEAGHER, 1977; HAGA, 1992; TORRES & CALDAS, 1990). Também chamada de Micropropagação, a multiplicação de plantas *in vitro* tem início a partir de pequenos fragmentos de tecido vegetal, denominados explantes. Excisados da planta matriz, os explantes, após a desinfestação⁴, são introduzidos em recipientes estéreis, tubos de ensaio ou outros frascos, sobre uma solução contendo sais minerais, carboidratos, vitaminas, fitorreguladores e demais componentes necessários ao seu estabelecimento, desenvolvimento e multiplicação. Os frascos são dispostos em ambiente com iluminação e temperatura controladas, e sua vedação garante a manutenção das condições assépticas da cultura, entretanto pode provocar condições de estresse ambiental, em diferentes graus de intensidade. Durante o tempo de seu desenvolvimento *in vitro*, as culturas atravessam diferentes fases, sendo transferidas para diversos meios em outros frascos, até serem transplantados para ambiente *ex vitro*, onde é feita uma aclimatação até o plantio definitivo. A cultura de plantas *in vitro*, além de permitir a multiplicação rápida em larga escala de clones vegetais, constitui-se ainda em importante alternativa tecnológica para o melhoramento genético, preservação de germoplasma e para o estudo da fisiologia vegetal.

⁴ É comum o uso do termo “assepsia”, para designar a operação de limpeza superficial dos explantes para obtenção de culturas axênicas.

Atualmente diversos laboratórios comerciais utilizam, rotineiramente, protocolos de propagação *in vitro* de espécies de importância econômica, normalmente desenvolvida em instituições de pesquisa em todo o mundo, produzindo mudas clonais, isentas de patógenos e que apresentam uma excelente performance na produção. Apesar do rápido desenvolvimento tecnológico nesta área ter permitido grandes avanços, como a automação (BHATTACHARYA, *et al.*, 1994; HAGA, 1992; VASIL, 1994) na produção de plantas *in vitro*, diversas alterações observadas nas plantas mantidas nas condições *in vitro*, carecem de serem melhor compreendidas. Mesmo com o estabelecimento de protocolos que suprem suas necessidades vitais, estas plantas são submetidas a estresses de diversas naturezas, desde o seu estabelecimento no meio de cultura, regeneração, multiplicação, enraizamento, crescimento, desenvolvimento e posterior aclimatação às condições externas ao ambiente controlado das culturas axênicas.

Os protocolos de cultivo *in vitro* de *Solanum tuberosum* L., foram desenvolvidos inicialmente para conservação de germoplasma e multiplicação (EWING, 1985; TOVAR *et al.*, 1985), sendo considerada alternativa à coleção de germoplasma a nível de campo (THIEME, 1988). Em particular, a produção de tubérculos *in vitro* mostra algumas vantagens em relação a produção de plantas propagadas *in vitro*, pois os tubérculos, apresentam fácil estocagem, transferência e distribuição, assim como podem ser usadas diretamente para plantio em campo sem passar pela fase de aclimatação, imprescindível às plantas oriundas de cultivo *in vitro* (AKITA & TAKAIAMA, 1994). Atualmente os sistemas de produção de batata semente, que se utilizam da cultura *in vitro*, fazem uso de plantas e não tubérculos. Apesar disto, observa-se a tendência de priorizar a pesquisa de produção de batata-semente *in vitro*, seja ela pré-básica ou básica, podendo-se almejar a meta da utilização da batata-semente produzida *in vitro*, diretamente no campo, o que permitiria a garantia da manutenção do clone e da sanidade, além da redução dos custos em relação a transporte, armazenagem e plantio (TOVAR *et al.*, 1985). Em virtude destas vantagens, agências de certificação de sementes, têm se tornado muito interessadas no cultivo de batata *in vitro*, como um método de preservação de germoplasma livre de doenças (EWING, 1995).

O tubérculo é um caule modificado, cuja formação na planta da batata é acompanhada por uma extensiva mudança nos aspectos bioquímicos e morfológicos. O grau para o qual uma planta em particular é induzida a tuberizar é controlado por vários fatores (EWING, 1995). Utilizando as técnicas de cultivo *in vitro* é possível alterar a fisiologia do desenvolvimento do tubérculo através da manipulação tanto da composição química do meio de tuberização quanto das condições ambientais durante a formação do tubérculo (SUTTLE & HULSTSTRAND, 1994). Este fato faz desta técnica uma importante "ferramenta" no estudo da fisiologia da tuberização. A formação do tubérculo *in vitro*, conforme descrita por VREUGDNHIL & STRUIK (1989), se dá a partir da indução do desenvolvimento diageotrópico de ramos com poucas e pequenas folhas, denominados *estolons*, que em determinadas condições, tem seu crescimento longitudinal cessado, dado como o início visível do processo de tuberização. A produção e translocação do estímulo indutor, leva ao crescimento radial do ápice do estolon, e está associada com mudanças significativas no metabolismo do mesmo, envolvendo expressivo número de importantes processos biológicos que culminam com o acúmulo de carboidratos na forma de amido, dentre outros metabólitos, no órgão de reserva (tubérculo), conforme descreveu GREGORY (1956). O mesmo autor denominou de "tubérculos aéreos", àqueles formados diretamente a partir de uma gema axilar, em função de alguma interferência no fluxo de fotoassimilados para os "tubérculos

subterrâneos". As mudanças metabólicas junto intensidade da atividade de mitose celular, são os primeiros eventos detectáveis no processo de tuberização (DUNCAN & EWING, 1984 *apud* HANNAPEL, 1991). Cabe ressaltar que as condições ótimas de tuberização de *Solanum tuberosum* L. *in vitro*, são específicas para cada genótipo, conforme verificado por diversos autores, devendo o protocolo de cultivo *in vitro*, ser ajustado para cada cultivar.

Presumivelmente o processo de tuberização é mediado pelo fitocromo, sendo bem conhecido que noites longas favorecem a indução de tuberização. Assim sendo, a incubação de explantes de batata em total ausência de luz é comumente utilizada para produção de tubérculos *in vitro*. Pode-se observar também um pronunciado efeito favorável, ao grau de indução, por temperaturas baixas e por indisponibilidade de nitrogênio (EWING, 1995). Tais condições favorecem o aparecimento do estímulo tuberização, que pode permanecer na planta, por tempo variável, mesmo quando submetida a condições não indutoras, conforme observou GREGORY (1956). Há evidências de que estímulos hormonais estejam envolvidos na formação dos tubérculos em várias espécies do gênero *Solanum*, porém os mecanismos encontram-se desconhecidos (LOPEZ-DELGADO & SCOTT, 1997 *apud* SILVA, 1999). Entretanto o estímulo pode ser proveniente de um balanço, a nível de concentração, entre grupos de compostos, não necessariamente todos da classe dos hormônios (EWING, 1995). O mesmo autor destaca que alterações no teor endógeno de Giberelinas (GA), estão associadas ao grau de indução em batateiras, havendo indícios da participação do Ácido Abscísico (ABA) nesta inibição da atividade da GA. A giberelina exógena promove o alongamento dos estolões inibindo a formação dos tubérculos (XU *et al*, 1998 *apud* SILVA, 1999). Além do ABA estão relacionados ao favorecimento do processo de tuberização, outros inibidores da ação de GA, como os Jasmonatos (EWING, 1995). A utilização de reguladores de crescimento no favorecimento da tuberização *in vitro* tem sido objeto de intensas investigações. Acredita-se que citocininas tenham forte efeito indutivo na tuberização, e que constituam parte do estímulo "natural" para tuberização, sozinhas ou em combinação com outras substâncias (LECLERC *et al*, 1994; TEIXEIRA & PINTO, 1991).

A tuberização *in vitro* da batateira, posteriormente a GREGORY (1956), foi associada à presença de citocinina, tendo sido demonstrada por diversos pesquisadores. É sabidamente um fator importante, que segundo PALMER & SMITH (1970), atua tanto na indução quanto no desenvolvimento dos tubérculos, favorecendo sua atividade como dreno. As citocininas têm como sítios de síntese reconhecidos, sementes em desenvolvimento e ápices de raízes, de onde são transportadas acrópetamente via xilema, não havendo ainda evidências conclusivas acerca de seu modo de ação (DAVIES, 1995). Entretanto a presença da citocinina 2-iP (isopenteniladenina) no t-RNA, para aminoácidos serina, tirosina e isoleucina, levam à sugestão de que seu mecanismo de ação esteja relacionado ao metabolismo dos ácidos nucleicos, o que é discutível face ao fato da maior parte das citocininas ativas não ocorrer no t-RNA, havendo ainda algumas demonstrações de sua ação a nível de transcrição do DNA, na formação de polirribossomos (HANDRO, 1993). O mesmo autor descreve a participação das citocininas no retardamento da senescência, no desenvolvimento dos cloroplastos, abertura estomática em algumas espécies e expansão foliar. Em balanço com auxina, é responsável por processos de divisão celular e morfogênese *in vitro* e *in vivo*, no último exemplo, regulando o fenômeno da dominância apical. Entretanto as auxinas têm recebido pouca atenção, no que diz

respeito ao seu papel no processo de tuberização, o que de acordo com EWING (1995), pode ser uma série omissão.

As substâncias que apresentam atividade característica de auxinas, incluem, inclusive precursores do Ácido Indolacético (AIA), que é considerada a principal forma de auxina nas plantas, sendo o ácido indolbutírico (AIB) e o ácido 4-Cloroindol-3-acético (4-Ci-AIA), também de ocorrência natural (BANDURSKI et al, 1995). Conforme o mesmo autor, em muitos tecidos o AIA encontra-se predominantemente em formas conjugadas, por exemplo, com inositol, aminoácidos e carbohidratos de baixo e alto peso molecular, dentre outras moléculas. Em forma conjugada é inativa mas móvel no sistema vascular, e quando ativada por hidrólise enzimática, é distribuída através da planta por seu característico transporte polar basípeto (LOMAX et al, 1995). O transporte polar das auxinas, por si só desencadeia uma série de eventos que levam ao “afrouxamento” da parede celular, com potencial expansão celular, dependente do aumento de turgor da célula e da síntese de novo de componentes, onde também há indícios da participação de auxinas. Este é um mecanismo de ação ligado à um dos efeitos característicos das auxinas, que ainda incluem o estímulo à divisão celular cambial em cultura de tecidos; a diferenciação do floema e do xilema; iniciação de raízes adventícias; tropismos; dominância apical; prevenção ou estímulo (via etileno⁵), da abscisão de folhas e frutos; partição de assimilados entre outros (DAVIES, 1995). Cumpre destacar a ação das auxinas na diferenciação de tecido vascular funcional em dicotiledôneas (RAVEN, 2001), cujo contínuo desenvolvimento, favorece a adaptação da planta a mudanças ambientais (ALONI, 1995), sendo este potencial regenerativo, de extrema importância na cultura *in vitro*.

Apesar de ser uma classe de reguladores de crescimento das mais conhecidas, os mecanismos de ação das auxinas, com exceção do relacionado a seu transporte polar, não se encontra completamente elucidado. O mecanismo com que as auxinas afetam os processos de divisão, diferenciação e mesmo de alongamento celular, sugerem ainda, alterações na expressão genética, atuando no metabolismo de ácidos nucleicos (HAGEN, 1995). Entretanto para qualquer resposta característica à auxina, é de fundamental importância o aporte da quantidade necessária, em célula(s) específica(s), no momento adequado, sendo esta regulação basicamente dependente dos processos de biossíntese, transporte e degradação (BANDURSKI, 1995). Este mesmo autor ainda acrescenta que o montante (pool) de auxina num determinado tecido, é incrementado (input) pela sua síntese de novo a partir do triptofano e de outros precursores indólicos ou não; pela hidrólise de MA, amido ou éster conjugado; e por fim, por seu transporte a partir de outros tecidos. O transporte da auxina, pode também representar decréscimo (output) neste pool, que também decorre do catabolismo oxidativo; da síntese de conjugados e do uso propriamente dito, da auxina em alguns eventos cuja realização implica em sua descaracterização funcional. Além da complexidade deste sistema, seu estudo torna-se ainda mais difícil, em função das vias não enzimáticas de degradação, destacando-se sua fotosensibilidade (EPSTEIN *apud* BANDURSKI, 1995).

Faz-se importante ressaltar que os reguladores de crescimento falham na indução de tuberização *in vitro*, quando o suprimento de sacarose é inadequado (HARMEY et al. 1966 *apud* LECLERC et al, 1994. A tuberização *in vitro*, é altamente responsiva à concentrações de sacarose, não sendo um efeito meramente osmótico (GREGORY, 1956

⁵ A auxina está envolvida na biossíntese de etileno (vide Davies. 1995)

e estudos subsequentes), sabendo-se que tanto frutose quanto glicose não apresentam o mesmo efeito que a sacarose, na tuberização e sim favorecem o desenvolvimento de brotações *in vitro* (EWING, 1995). A idéia de que os níveis de carboidratos, ou razão C/N controlam a tuberização, foi substituída por aquela que enfoca o papel dos reguladores de crescimento. Entretanto é inegável o papel desempenhado pela sacarose na tuberização *in vitro*, (GREGORY, 1956; TEIXEIRA & PINTO, 1991). Condições *in vivo*, favoráveis à tuberização, afetam a partição de assimilados, que são direcionados diretamente ao novo dreno em formação, havendo diversos relatos sobre o transporte de sacarose das folhas para o ápice do estolon, onde seu acúmulo pode desempenhar um papel sinalizador importante para a iniciação do tubérculo, não havendo ainda consenso na compreensão destas evidências (EWING, 1995).

Os carboidratos na cultura *in vitro* fornecem energia metabólica e esqueletos carbônicos para biossíntese, de um modo geral, de todos os compostos orgânicos necessários ao crescimento das células, apesar das mesmas, potencialmente poderem realizar fotossíntese, a maioria das culturas *in vitro* são “sustentadas” por fontes de carboidratos adicionadas ao meio (TORRES *et al*, 1998). Não foi encontrada nenhuma referência acerca da mensuração da taxa fotossintética da cultura da batateira *in vitro*, muito menos de sua relação com o processo de tuberização, nessas condições. As condições ótimas de tuberização de *Solanum tuberosum* L. *in vitro*, necessariamente devem contar com suprimento adequado de sacarose no meio de cultivo. Diversos são os autores que apontam para um mínimo de 6% de sacarose, como fator limitante tuberização, e segundo PALMER & SMITH (1970), acima de 10%, como fator inibitório. Um dos motivos que prejudicam os estudos sobre tuberização é o fato de haver uma grande diferença de respostas aos estímulos, entre os diferentes genótipos de batata, conforme divulgado por inúmeros autores e constatado por FREIRE (1998), através da comparação dos resultados obtidos com as cultivares Chiquita e Jeat Bintje.

2 - MATERIAL E MÉTODOS

2.1 - Material Vegetal e Estabelecimento da Cultura Axênica.

Os ensaios foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais localizado no Departamento de Fitotecnia - Instituto de Agronomia da UFRRJ. Inicialmente, tubérculos de *Solanum tuberosum* L., da cultivar Jeat Bintje, cedidos e classificados pela EMBRAPA/Canoinhas, como batata-semente básica, foram mergulhadas em solução de ácido giberélico (10 mg/litro) por 10 minutos, e mantidas em ausência de luz, à temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, por 15 dias, para obtenção de brotações estioladas com cerca de 3,0 cm. Estas brotações, foram excisadas e submetidas a desinfestação para serem cultivados em meio de implantação, com intuito de obtenção de plantas matrizes isentas de contaminantes, conforme preconizado por MIRANDA *et al* (2000). Após três meses de cultura, com repicagens mensais, foram excisados segmentos com duas gemas axilares, os quais foram submetidos aos tratamentos propostos.

O meio de cultura foi preparado utilizando-se soluções estoque, tanto para os sais quanto para os fitorreguladores. Foi utilizada a formulação de MURASHIGE & SKOOG (1962). A todos os meios de cultura foi adicionado 8 g/litro de ágar, que após cozimento, teve 25 ml vertidos em recipientes de vidro de formato cilíndrico (tipo conserva), com 250 ml de capacidade. Estes recipientes com o meio, foram autoclavados a 121°C por 20 minutos, tratamento ao qual também foram submetidos o restante do material necessário à manipulação asséptica (pinças, cabos de bisturi etc...). Todas as inoculações foram realizadas em capela de fluxo laminar horizontal, previamente limpa com etanol 70% e exposta à luz ultravioleta por no mínimo 30 minutos. Depois de excisados das matrizes sob condições assépticas, os explantes inseridos nos meios de cultura estéreis, foram expostos a 15°C durante 10 horas, em ausência de luz, conforme preconizado por PRADO (1992). Após este pré-tratamento, os explantes foram levados à câmara de crescimento, à temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, em condições de luminosidade definidas de acordo com os tratamentos propostos, durante 80 dias, que foi considerado como o tempo suficiente para que a cultura expressasse todo seu potencial em termos de produtividade.

2.2-Delineamento Experimental

Em todos os três ensaios adotou-se o delineamento em blocos ao acaso em arranjo fatorial, considerando-se seis explantes em cada recipiente, como unidade experimental e o bloco implantado semanalmente, como repetição. Desse modo no ensaio I, temos 4 blocos onde foram arranjados 3 fatores: citocinina em forma de BAP (0; 5; 10 e 15 mg/litro); auxina em forma de AIB (0 e 1 mg/litro) e ausência ou presença de 16 h diárias de luz, resultando em um fatorial $4 \times 2 \times 2$. Do mesmo modo, foi delineado o ensaio II, com 4 blocos onde foram arranjados 3 fatores: níveis de citocinina em forma de KIN (0; 5; 10 e 15 mg/litro); níveis de auxina em forma de AIB (0 e 1 mg/litro) e ausência ou presença de 16 h diárias de luz), resultando em um fatorial $4 \times 2 \times 2$.

No ensaio III, foram arranjados 3 fatores, nos 3 blocos implantados: sacarose (0; 3; 6; 9 e 12% P/V); AIB (0 e 1 mg/litro) e condições de luminosidade com ausência ou presença de 16 h diárias de luz durante 80 dias ou transferência para a condição oposta após 40 dias de cultura, resultando num fatorial 5 x 2 x 4. Neste ensaio III, utilizou-se unicamente a concentração de 5 mg/litro de Cinetina para todas as unidades experimentais.

2.3 - Coleta de Dados e Análise Estatística.

Após 80 dias de cultura, foram avaliados índices relativos à sobrevivência e desenvolvimento dos explantes; frequência de tuberização; produtividade em tubérculos por explante e a caracterização físico-morfológica destes. Cabe ressaltar que alguns índices foram avaliados somente no ensaio III.

Com relação a sobrevivência e ao desenvolvimento, avaliou-se: a frequência de explantes sobreviventes (%EV); a frequência de explantes que desenvolveram brotações (%EB) e a massa fresca e seca destas brotações (MFB e MSB). Para a avaliação da eficiência dos tratamentos na indução de tuberização foi observada a frequência com que os explantes formaram tubérculos, considerando somente os explantes sobreviventes (%EVT) e os que brotaram (%EBT). A produtividade média por explante, foi calculada com base no total de explantes submetidos aos tratamentos (PZ), no total de explantes sobreviventes aos 80 dias de cultura (PY) e no total de explantes excluindo-se os que não tuberizaram (PX).

Os tubérculos foram caracterizados através de sua massa fresca (MFT); do diâmetro do eixo menor (Dme) e do eixo maior (Dma), que possibilitaram o cálculo do volume aparente do tubérculo (VAT), através da fórmula $4/3 \pi C^3$ ($Dme/2)^2 (Dma/2)$, demonstrada em anexo. O VAT como divisor da massa fresca do tubérculo, gera o quociente que denominamos de densidade “aparente” do tubérculo (DAT). A caracterização dos tubérculos produzidos, contou ainda com inferências sobre seu sítio de origem, de acordo com a frequência em que se formaram, a partir de ápices de estolons (%TA), e diretamente a partir de gemas axilares existentes no explante original (%TO), tendo sido ainda observada a frequência com que as gemas existentes nos tubérculos, desenvolveram-se em brotações ainda *in vitro*.

Os dados (X) apresentaram-se heterocedásticos, sendo transformados (X_t) a partir do cálculo da raiz quadrada da soma deste dado (X) com o maior valor aferido ($X_{\text{máx}}$) no conjunto de dados do índice avaliado ($X_t = \sqrt{X + X_{\text{máx}}}$). Apesar de não indicada em nenhuma referência consultada, esta transformação possibilitou os menores coeficientes de variação (%CV), além de tornar os dados homocedásticos. Desse modo esta transformação torna-se indicada para o tratamento de dados obtidos nas condições experimentais da cultura *in vitro*. Para análise da variância e os testes F e de comparação múltipla de médias de Duncan ($p < 0.05$), foi utilizado o programa para computadores MSTAT-C de Michigan State University, e para a análise da variância da regressão, o Sistema de Análise Estatística (SAEG V4-10/92). Parcelas perdidas foram calculadas através da fórmula $X_{IJ} = ((IT+JB-G')/(I-1)(J-1))$, conforme descrito por BANZATO & KRONKA (1992).

3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 - Estabelecimento da cultura e tuberização.

Qualquer efeito desfavorável ao estabelecimento dos explantes, pode ter reflexos significativos no custo de produção. A manipulação e o espaço útil na câmara de crescimento, destinados à explantes não sobreviventes, podem inviabilizar um protocolo comercial, caso a produtividade obtida no sistema, não compense o desperdício de área útil e mão de obra. Os índices que avaliam o estabelecimento dos explantes *in vitro*, foram pouco afetados pelos tratamentos dos ensaios I e II. O percentual de explantes vivos até 80 dias de cultivo (%EV), em média superou 90%. No ensaio III, o %EV foi influenciado por todos os tratamentos e pela interação entre eles, obtendo-se índices de até 100% de sobrevivência, com amplitude de 80%.

A quantidade de água disponível nos meios, pode ser um fator limitante à cultura (LINSMAYER & SKOOG, 1965 *apud* TORRES *et al*, 1998). Com base nos dados apurados, pode-se afirmar que a modificação do potencial osmótico do meio, promovido por concentrações crescentes de sacarose nos níveis estudados, não é desfavorável ao estabelecimento dos explantes, mas sim a ausência de sacarose (Tab. 1).

Tabela 1 - Sobrevivência (%EV) de explantes de batata (cv. Jeat Bintje), em diferentes concentrações de sacarose.

Concentração de Sacarose no meio (g/litro)	%EV ¹
0	82,0 B ²
30	99,9 A
60	95,4 A
90	98,0 A
120	98,8 A

CV = 2,79%

¹. %EV = percentual de explantes vivos aos 80 dias de cultura.

². Valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Duncan ($p<0,05$)

O efeito desfavorável da ausência de sacarose no meio, é atenuado pela presença de AIB. Nesta condições, a freqüência de explantes sobreviventes é estatisticamente similar às médias observadas em meio com sacarose (Tab. 2). Tendo em vista que a sobrevivência dos explantes em ausência de sacarose, depende do desenvolvimento autotrófico, podemos afirmar que a auxina, no caso o AIB (1,0 mg/litro), esteja envolvida na capacitação do explante para não dependência de fonte exógena de carbohidratos para se estabelecer, com uma frequência observada, equivalente às mais altas, aferidas nas condições estudadas.

Tabela 2 - Sobrevida (%EV) de explantes de batata (cv. Jeat Bintje), em ausência e presença de sacarose e AIR.

Sacarose (g/litro)	%EV ¹		
	AIB (mg/litro)	0	1
0	68,7 B ²		95,7 A
30	99,9 A		99,9 A
60	94,0 A		97,1 A
90	97,1 A		98,5 A
120	99,9 A		97,4 A

CV=2.79%

¹. %EV = percentual de explantes vivos aos 80 dias de cultura.

². Valores seguidos pela mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Duncan ($p<0,05$)

A condição autotrófica de uma cultura, é influenciada principalmente pela quantidade e qualidade de luz presente, concentração de CO₂, além de teores de clorofila suficientes para realizar a fotossíntese, em níveis tais que sustentem o crescimento (TORRES et al, 1998). A ausência de luz influenciou significativamente o índice de sobrevida. Os explantes mostraram-se mais vulneráveis sob ausência de luz. Esta vulnerabilidade foi maior quando os explantes foram transferidos, após o período de 40 dias iniciais de cultura, de um ambiente sem luz para fotoperíodo de 16 horas. A transferência inversa, ou seja, de um ambiente com fotoperíodo de 16 horas, para ausência de luz, após os 40 dias iniciais, não influenciou negativamente a sobrevida dos explantes (Tab. 3).

Tabela 3 - Sobrevida (%EV) de explantes de batata (cv. Jeat Bintje), em diferentes condições de luminosidade.

Condições ambientais de luminosidade	%EV ¹
Ausência de luz/80 dias	95,4 AB
Fotoperíodo 16h/dia, durante 80 dias	97,1 A ²
Ausência de luz/40 dias + fotoperíodo 16h/dia, durante 40 dias	89,9 B
Fotoperíodo 16h/dia, durante 40 dias + ausência de luz/40 dias	96,6 A

CV = 2.79%

¹. %EV = percentual de explantes vivos aos 80 dias de cultura.

². Valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Duncan ($p<0,05$)

Podemos afirmar que o estabelecimento de um padrão metabólico nos explantes, ocorreu nos primeiros 40 dias de cultura. Necessariamente, o padrão heterotrófico é estabelecido em uma cultura mantida em ausência de luz neste período. O explante transferido para presença de luz, não teria capacidade autotrófica de imediato, sendo a presença de luz adversa, até que o explante adquirisse a capacidade estrutural e fisiológica de aproveitá-la do ponto de vista energético. Quando a mudança de ambiente, se deu de maneira inversa, percebe-se que a presença de luz nos primeiros 40 dias, permitiu ao explante expressar melhor a capacidade de adaptação à ausência de fonte de energia luminosa, onde só é possível o desenvolvimento heterotrófico.

Na Tabela 4 verifica-se que em presença de AIB (1,0 mg/litro), houve melhor adaptação do explante a condições onde somente o desenvolvimento heterotrófico é factível. Não é possível fazer inferências mais precisas sobre o modo de ação do AIB, no entanto podemos afirmar que a auxina tornou o explante menos vulnerável à adversidade representada pela exposição de um explante estabelecido no escuro, para um ambiente com 16 h de luz diárias.

Tabela 4 - Sobrevivência (%EV) de explantes de batata (cv. Jeat Bintje), em ausência e presença de AIB, sob diferentes condições de luminosidade.

Condições de luminosidade	%EV ¹	
	AIB (mg/litro)	
	0	1
Ausência de luz/80 dias	94,04 A ²	96,84 A
Fotoperíodo 16h/dia, durante 80 dias	96,28 A	97,96 A
Ausência de luz/40 dias + fotoperíodo 16h/dia, durante 40 dias	81,44 B	98,25 A
Fotoperíodo 16h/dia, durante 40 dias + ausência de luz/40 dias	95,44 A	97,96 A

CV = 2,79%

¹. %EV = percentual de explantes vivos aos 80 dias de cultura.

². Valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Duncan ($p<0,05$)

O efeito desfavorável ao %EV pela mudança de ambiente, se fez notar somente quando o meio se encontrava desprovido de sacarose. Estas condições de adversidade para o estabelecimento do explante, também foram atenuadas pela presença de AIB no meio de cultura (Tab. 5). Mesmo que não detectado estatisticamente, face à amplitude dos dados, é interessante notar que na falta de fonte de carboidratos e de luz, a manutenção de explantes vivos, foi favorecida pela presença de AIB (1,0 mg/litro). É possível que a ação do AIB se dê na otimização do transporte de assimilados, desempenhando um papel comum às auxinas em plantas superiores (Aloni *in* Davies, 1995), o que favoreceria a manutenção do explante em baixo nível de atividade metabólica.

Tabela 5 - Sobrevida (%EV) de explantes de batata (cv. Jeat Bintje), em ausência e presença de AIB e de sacarose, sob diferentes condições de luminosidade.

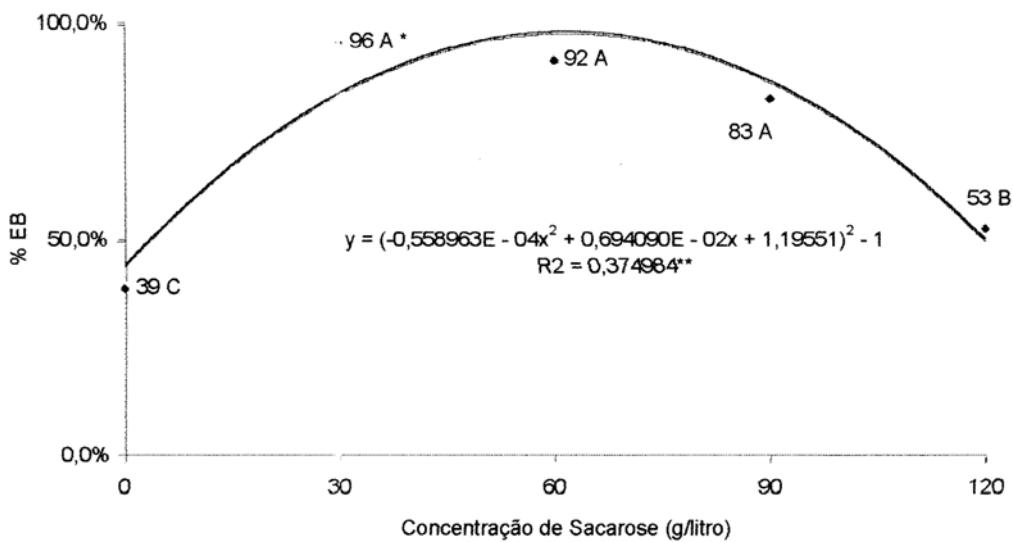
Presença e ausência de AIB sob diferentes condições de luminosidade	% EV ¹					
	0	3	6	9	12	
0 AIB	em ausência de luz/80 dias	77.2 A ²	99.9 A	94.3 A	99.9 A	99.9 A
	em fotoperíodo diário de 16h/80 dias	94.3 A	99.9 A	87.4 A	99.9 A	99.9 A
	em ausência de luz/40 dias + fotoperíodo diário de 16h/40 dias	20.3 B	99.9 A	99.9 A	94.3 A	99.9 A
	em fotoperíodo diário de 16h/40 dias + ausência de luz/40 dias	88.5 A	99.9 A	94.3 A	94.3 A	99.9 A
1 mg/litro AIB	em ausência de luz/80 dias	95.7 A	99.9 A	99.9 A	94.3 A	99.9 A
	em fotoperíodo de 16h/80 dias	95.7 A	99.9 A	94.3 A	99.9 A	94.3 A
	em ausência de luz/40 dias + fotoperíodo diário de 16h/40 dias	95.7 A	99.9 A	94.3 A	99.9 A	99.9 A
	em fotoperíodo diário de 16h/40 dias + ausência de luz/40 dias	95.7 A	99.9 A	99.9 A	99.9 A	95.7 A

CV = 2,79%

¹. %EV = percentual de explantes vivos aos 80 dias de cultura.

². Valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Duncan ($p<0,05$)

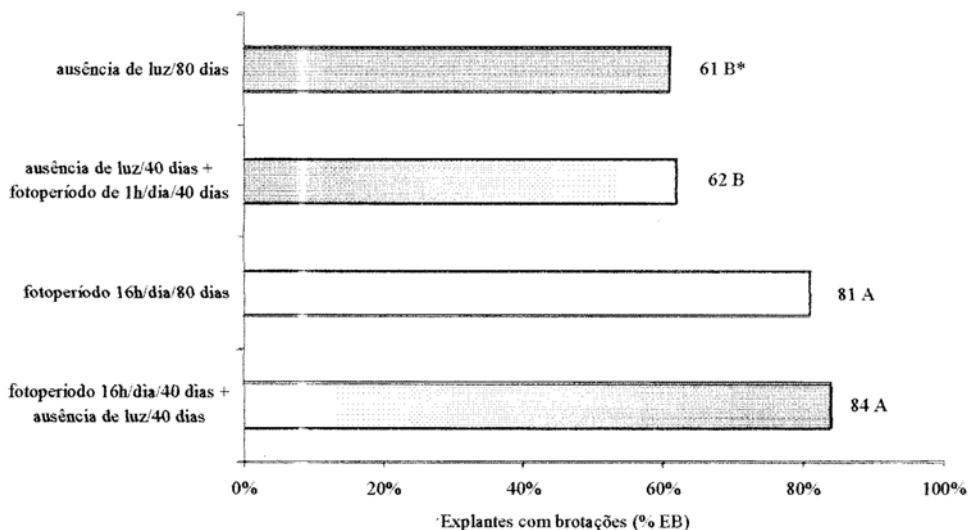
Em ausência de sacarose, verificou-se o menor percentual de explantes com brotações. Dentre os tratamentos com sacarose no meio de cultura, os explantes apresentaram médias mais altas de % EB, quando cultivados em 3; 6 e 9% de sacarose. Considerando-se que a ausência de sacarose também é um fator desfavorável à sobrevida de explantes, podemos concluir que em termos absolutos, a concentração de 12% de sacarose, é a que consegue manter maior quantidade de explantes vivos, com baixa frequência de brotações. Desse modo a concentração de sacarose que menos privilegiou as brotações como drenos, é a de 12%. É importante atentar para o fato que a alta disponibilidade de carboidratos no meio de cultura, pode favorecer contaminações que inviabilizam a cultura e geram aumento de custos. No entanto, o protocolo utilizado no presente trabalho, é menos suscetível a contaminações, em virtude de utilizar-se explantes excisados de matrizes mantidas em cultura axênica.



* Valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Duncan ($p<0,05\%$)
CV = 5,72%

Figura 1 - Percentual de explantes de batata (cv Jeat Bintje), com brotações (%EB), aos 80 dias de cultura, em função da concentração de sacarose.

A presença de luz, nos 40 dias iniciais da cultura, induziu maior frequência de explantes com brotações, mesmo quando após este período, o explante é submetido à ausência de luz. Consequentemente, conclui-se que estão menos aptos a desenvolver brotações, os explantes cultivados em condições de ausência de luminosidade, seja durante todo o período de 80 dias, ou somente após os 40 dias iniciais em condições de luminosidade (Fig. 2). Podemos afirmar que o desenvolvimento das brotações, ou pelo menos o estímulo à sua ocorrência, se dá nos primeiros 40 dias da cultura, sendo influenciado positivamente pela presença de luz neste período.



* Valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Duncan ($p<0,05\%$)
CV = 5,72%

Figura 2 - Percentual de explantes de batata (cv Jeat Bintje), com brotações (%EB), aos 80 dias de cultura, em função das condições de luminosidade.

Os explantes cultivados em ausência de sacarose, quando também em ausência de luz, seja durante todo o ciclo, ou somente no período de 40 dias iniciais, não apresentaram brotações (Fig. 3), ou seja, os explantes sobreviventes nestas condições, mantiveram-se com baixo nível metabólico, como que quiescentes. Esta condição foi revertida quando o explante foi mantido sob 16h de luz diárias, após os 40 dias finais da cultura, o que permitiu a elevação do % EB. Percebe-se ainda que a presença de sacarose foi fator fundamental para que ocorressem brotações em explantes mantidos em ausência de luz durante os 40 dias iniciais da cultura. Novamente ressalta-se os mais baixos níveis de %EB, em altas concentrações de sacarose, independentemente das condições de luminosidade, o que se traduz no maior índice de explantes vivos sem brotações, visto que este índice é complementar ao % EB.

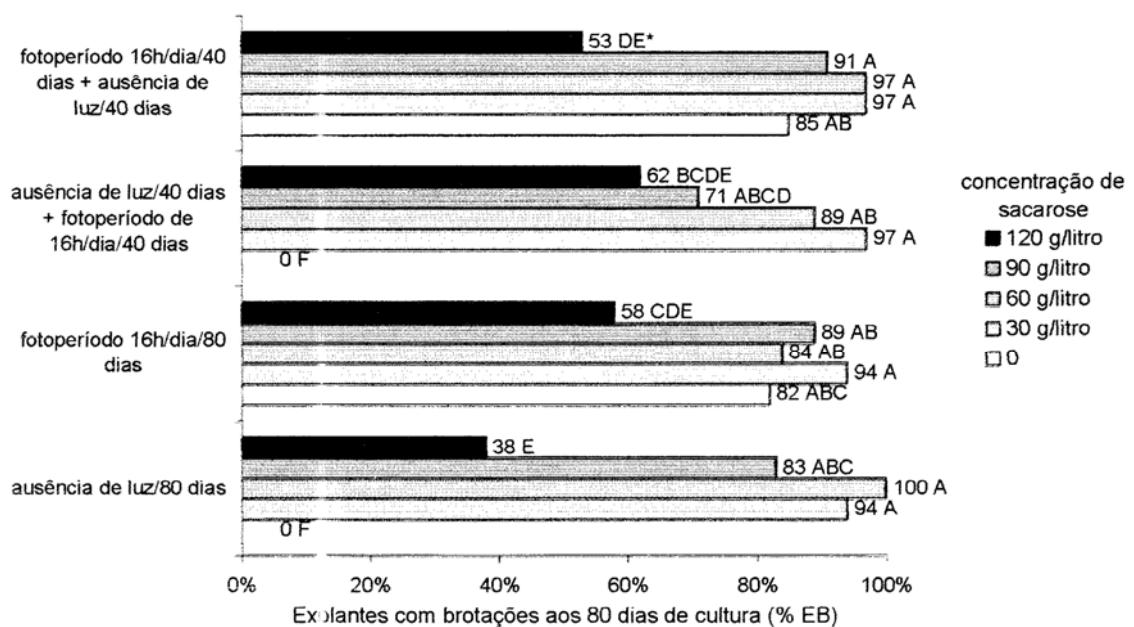


Figura 3 - Percentual de explantes de batata (cv Jeat Bintje) com brotações (%EB), aos 80 dias de cultura, em função da concentração de sacarose e das condições de luminosidade.

Conforme exposto na Figura 4, a simples presença de citocinina (BAP o KIN) no meio de cultura, que não foi significativa sobrevida dos explantes, nem à ocorrência de brotações, inibiu significativamente o acúmulo de massa fresca pelas brotações, independentemente da concentração. Esta inibição é mais pronunciada pelo uso de BAP do que de KIN, que apresentaram, respectivamente, 56,46 e 82,51 mg/explante. Podemos concluir que o explante dispõe do estímulo hormonal necessário ao incremento de massa pelas suas brotações, no maior nível observado no presente ensaio. Este balanço hormonal existente no explante é influenciado pela presença de citocinina, que possivelmente redireciona o dreno preferencial, reduzindo sensivelmente o ganho de massa pelas brotações sem, no entanto, influenciar a ocorrência destas.

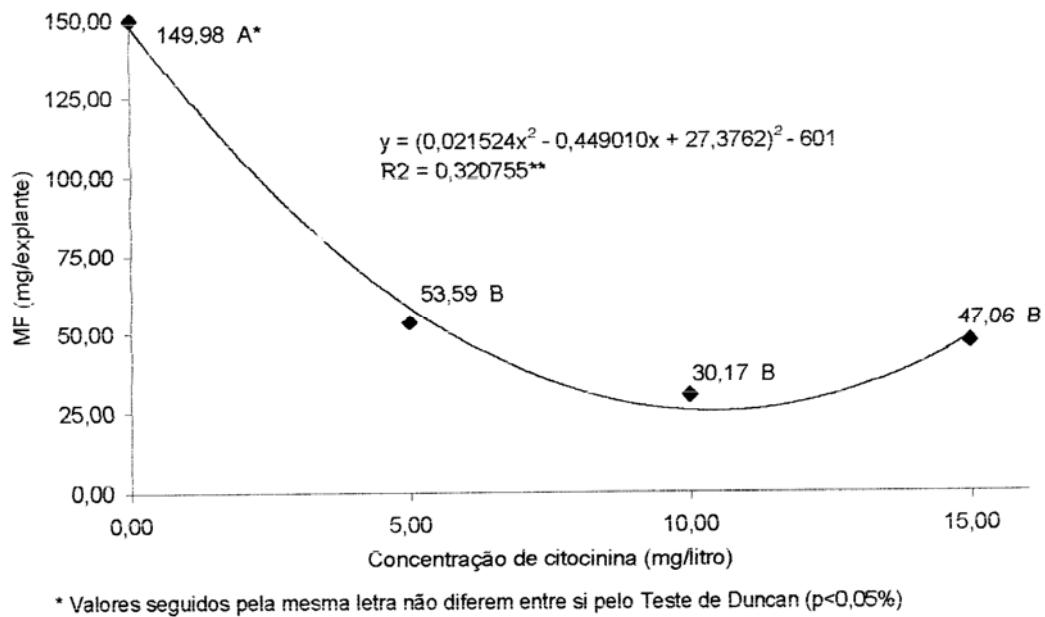
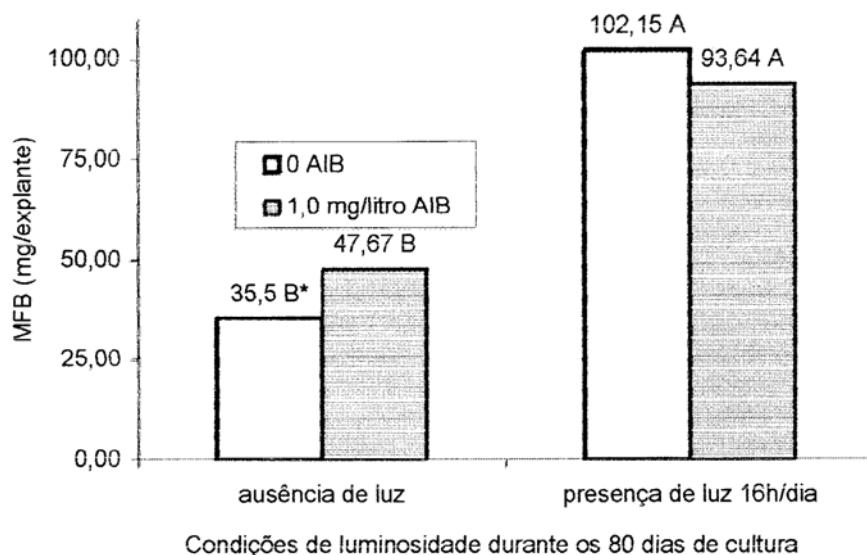


Figura 4 - Massa fresca das brotações (MFB) de explantes de batata (cv Jeat Bintje) aos 80 dias de cultura, em função da concentração de citocinina (BAP ou KIN).

Destaca-se o efeito da presença de luz e de AIB interagindo com relação ao ganho de massa pelas brotações (Fig. 5). Os resultados demonstram que a luz incrementou o ganho de massa fresca das brotações (MSB), independentemente da presença de AIB exógeno. No entanto, apesar de imperceptível estatisticamente, nota-se que a presença de AIB favoreceu sensivelmente o balanço endógeno dos fatores que regulam os processos necessários ao acúmulo de massa fresca pelas brotações. Esta afirmativa se respalda na diferença observada entre o ganho de MSB promovido pela luz, na ausência e na presença de AIB. Quando em presença de AIB, este ganho é pouco inferior à 100% do valor observado em ausência de luz, respectivamente 93,64 e 47,67 mg/explante. Quando em meio desprovido de auxina exógena, este incremento supera em pouco mais de 200%, o valor observado em ausência de luz, respectivamente 102,15 e 35,5 mg/explante. Conclui-se que a luz é um fator fundamental à formação ou ativação de um balanço endógeno favorável à atuação das brotações como um dreno forte. Este balanço é influenciado pela auxina exógena (1.0 mg/litro de AIB), que agindo, direta ou indiretamente, de modo desfavorável às brotações corno drenos preferenciais, tornam o incremento observado em função da luz, menor quando em presença de AIB.



* Valores indicados por barras seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Duncan ($p<0,05\%$)
 CV = 4,71%

Figura 5 - Massa fresca das brotações (MFB), de explantes de batata (cv Jeat Bintje), em função da presença de AIB e das condições de luminosidade.

A Tabela 6 demonstra novamente que o meio desprovido de fitorreguladores foi a condição mais favorável ao acúmulo de massa fresca. Possivelmente o pré-tratamento dos explantes, conforme preconizado por PRADO (1992), induziu a um balanço endógeno de reguladores, favorável a um maior acúmulo de massa fresca. Esse hipotético balanço endógeno de fitorreguladores, pode permanecer no explante mesmo após transferência para condições ambientais distintas, do mesmo modo que ocorre com os fatores indutores de tuberização, conforme descreve GREGORY (1956), sendo obviamente influenciado pelos reguladores exógenos utilizados. A citocinina exógena, tanto BAP quanto KIN, foi desfavorável ao acúmulo de massa fresca. Quando em ausência de citocinina exógena, a auxina exógena (MB), foi estatisticamente favorável ao ganho de massa fresca pelas brotações, principalmente em presença de luz. Entretanto, usando-se o mesmo raciocínio exposto na avaliação dos resultados da Figura 5, percebe-se que a luz foi o fator mais importante na formação, manutenção ou ativação de um hipotético balanço endógeno de reguladores de crescimento, que induz a um maior acúmulo de massa fresca nas brotações. O MB reduziu sensivelmente o potencial incremento de MFB, promovido pela luz.

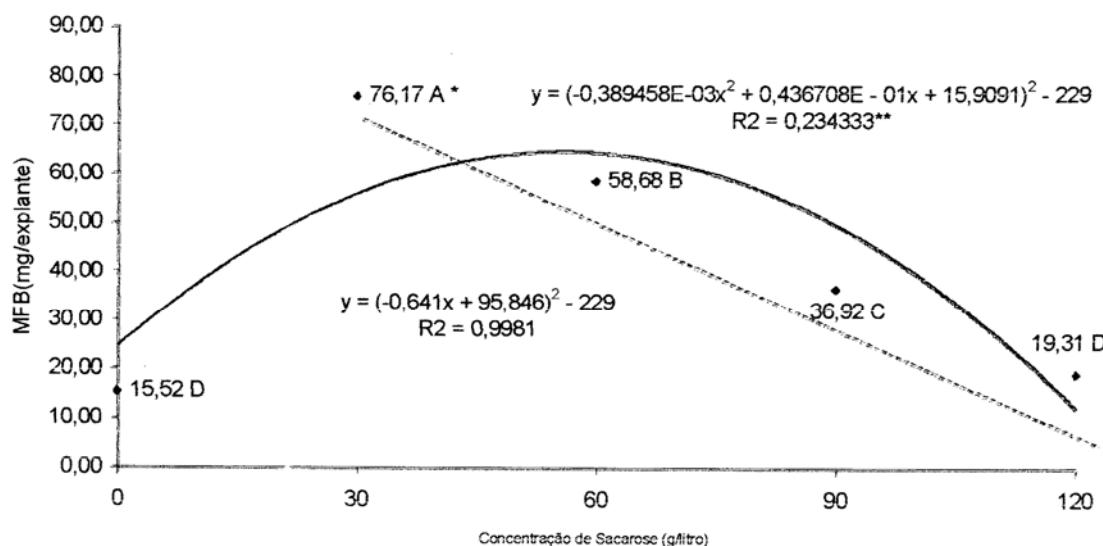
Tabela 6 - Massa fresca das brotações (MFB) de explantes de batata (cv Jeat Bintje), sob diferentes condições de luminosidade e níveis de fitorreguladores

Balanço de fitorreguladores (mg/litro)			MFB (mg/explante)		
Citocinina BAP ou KIN)	Auxina (AIB)		Condições ambientais de luminosidade durante o período de 80 dias de cultivo		
			Ausência de luz	16h luz/dia	
0	X	0	77,76 BCD ¹	138,46 B	
5	X	0	22,90 D	137,21 B	
10	X	0	21,30 D	35,45 CD	
15	X	0	20,46 D	99,98 BC	
0	X	1	133,95 B	255,15 A	
5	X	1	24,00 D	33,74 CD	
10	X	1	21,45 D	42,59 CD	
15	X	1	14,98 D	54,51 CD	

CV = 2,79%

¹. Valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Duncan ($p<0,05$)

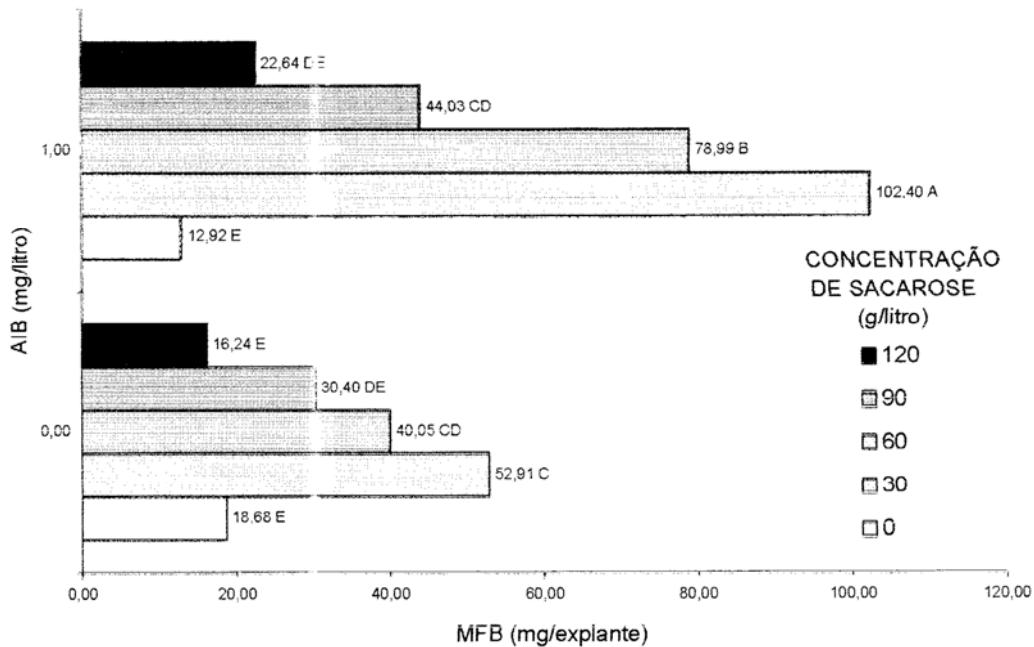
A Figura 6 apresenta a equação quadrática que melhor explica a correlação entre a massa fresca das brotações e a concentração de sacarose. É interessante destacar que quando desconsiderado o cultivo em ausência de sacarose, a relação é melhor representada por uma equação linear. Entretanto, a equação de melhor ajuste correlação existente, só pode ser obtida através da avaliação de ensaio similar que contemple o uso de sacarose no intervalo entre 0 a 3%.



* Valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Duncan ($p<0,05\%$)
CV = 5,72%

Figura 6 - Massa fresca das brotações (MFB), de explantes de batata (cv Jeat Bintje), aos 80 dias de cultura em meios com diferentes concentrações de sacarose.

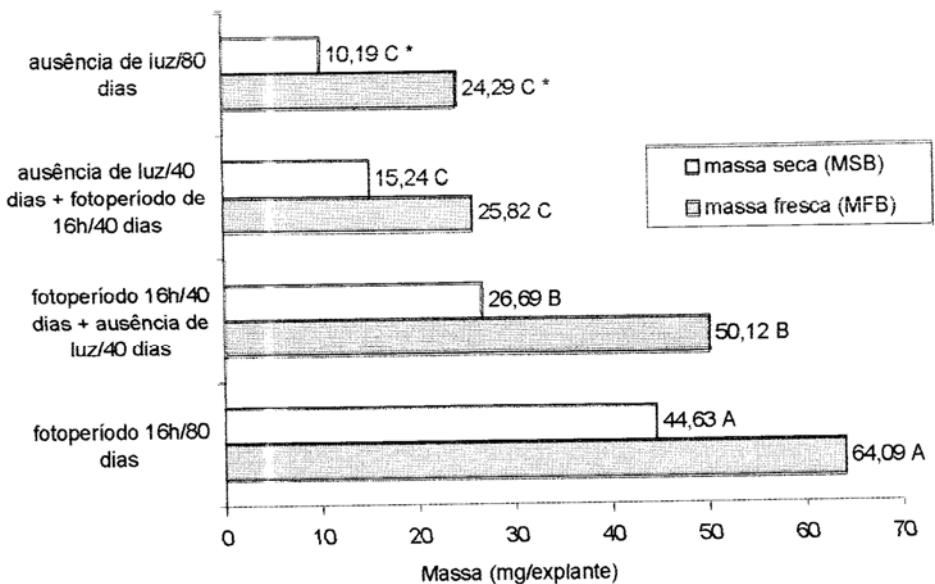
A presença de Al 3 potencializou o acúmulo de massa fresca pelas brotações em presença de sacarose (Fig. 7). Este efeito pode estar relacionado à otimização do fluxo de sacarose, visto que o transporte de assimilados pode ser favorecido pela auxina, mesmo que de forma indireta, pois é conhecida sua ação na diferenciação de tecido vascular funcional em dicotiledôneas (RAVEN, 2001).



* Valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Duncan ($p < 0,05\%$)
CV = 4,59%

Figura 7 - Massa fresca das brotações (MFB), de explantes de batata (cv Jeat Bintje), aos 80 dias de cultura em função de AIB e concentração de sacarose.

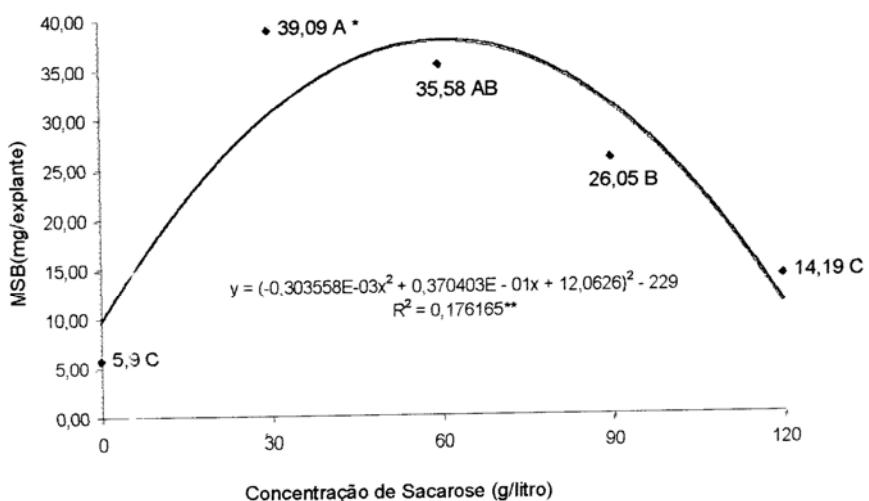
Quando cultivado em ausência de luz no período inicial de 40 dias, mesmo do transferido posteriormente para condições de 16h de luz diárias, as brotações escutaram ganho de massa, similar ao cultivo por todo período em ausência de luz (Fig. 8). A presença de luz, mostrou-se favorável ao acúmulo de massa fresca pelas brotações, mesmo quando utilizada somente nos 40 dias iniciais de cultivo. Todavia, a massa, tanto fresca quanto seca, nestas condições, ainda foi inferior àquela obtida no cultivo durante todo o período de 80 dias em presença de luz. Diante de tais observações, percebe-se que o desenvolvimento de brotações e mesmo o incremento de sua massa, e/ou a capacitação do explante para tanto, se deu nos primeiros 40 dias de cultivo, sendo tais processos inibidos significativamente em ausência de luz.



* Valores seguidos pela mesma letra, na mesma legenda, não diferem entre si pelo Teste de Duncan ($p<0,05\%$)
 CV = 4,59%

Figura 8 - Massa fresca (MFB) e seca (MSB) das brotações, de explantes de batata (cv Jeat Bintje), aos 80 dias de cultura em função das condições de luminosidade neste período.

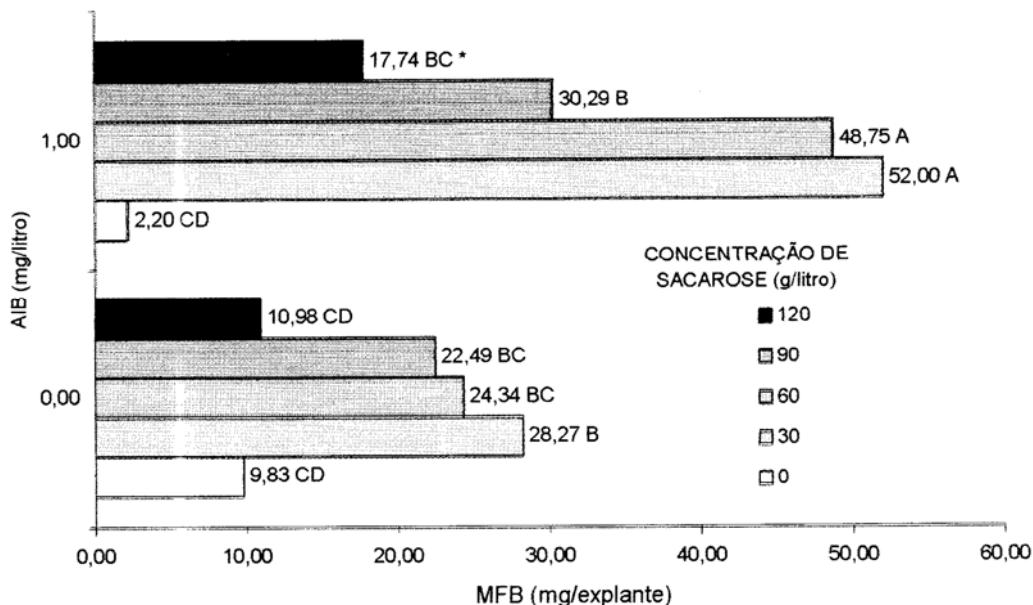
O AIB (1,0 mg/litro) propiciou às brotações, um ganho de 29,05 mg/explante de massa seca, superior estatisticamente aos 18,88 mg/explante obtidos em sua ausência. A ausência de sacarose induziu à menor média de massa seca (Fig. 9). Entretanto, quando cultivado em 12% de sacarose, a média de massa seca das brotações foi similar estatisticamente à obtida em sua ausência. Nota-se novamente que a equação que melhor expressaria a correlação entre a concentração de sacarose e a massa seca das brotações, só pode ser obtida se considerado o intervalo entre 0 e 3% de sacarose, essencial para a determinação, de modo mais preciso, do ponto de inflexão da curva.



* Valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Duncan ($p<0,05\%$)
 CV = 5,25%

Figura 9 - Massa seca das brotações (MSB), de explantes de batata (cv Jeat Bintje), aos 80 dias de cultura em meios com diferentes concentrações de sacarose.

Em presença de AIB (1,0 mg/litro), os valores de massa seca foram superiores àqueles obtidos em sua ausência, sobre as mesmas concentrações de sacarose (Fig. 10). Podemos afirmar que as condições desfavoráveis ao acúmulo de matéria seca pelas brotações, em função de altas concentrações de sacarose, foram atenuadas pela presença de 1,0 mg/litro de AIB no meio. Considerando-se que o MB favorece o transporte de assimilados no explante, podemos sugerir que altas concentrações de sacarose, dificultaram este fluxo, possivelmente atuando na modificação do potencial osmótico da solução nutritiva.



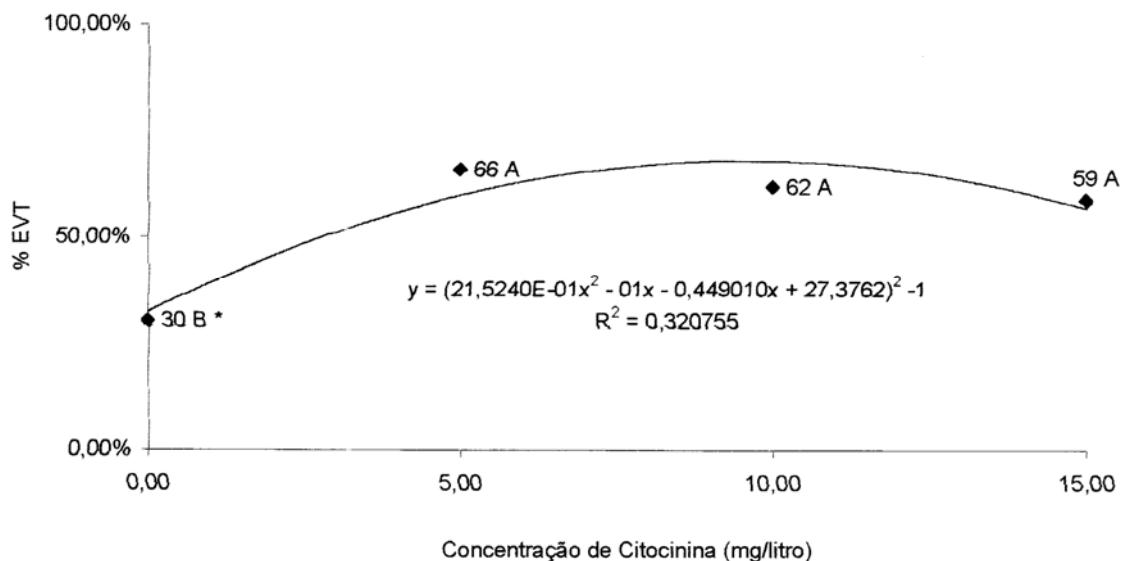
* Valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Duncan ($p<0,05\%$) CV = 5,25°

Figura 10 - Massa fresca das brotações (MSB), de explantes de batata (cv Jeat Bintje), aos 80 dias de cultura em meios com diferentes concentrações de sacarose e AIB.

Em condições de ausência de luz, as brotações tenderam a um ganho de massa seca, significativamente menor que o observado em presença de luz (Fig. 8), do mesmo modo que ocorreu com a massa fresca. Nota-se que quanto maior o tempo, em termos absolutos, sob 16h de luz diárias, maior foi o valor aferido, desde que haja o fornecimento luz, durante o período inicial de 40 dias de cultivo, essencial para o eficiente estabelecimento do explante.

Resumidamente, considerando os fatores sacarose e luz, as mesmas condições desfavoráveis à sobrevivência, foram também a ocorrência de brotações e seu incremento em massa fresca e seca, exceto quando em condições com altas concentrações de sacarose, que apesar de não afetarem a sobrevivência, reduziram sensivelmente a frequência de explantes que desenvolveram brotações.

A presença de citocinina no meio de cultura, independente da forma (BAP ou KIN) e da concentração (5; 10 ou 15 mg/litro), influenciou de forma altamente significativa a frequência com que os explantes tuberizaram. A concentração de 5,0 mg/litro foi suficiente para obtenção das mais altas frequências de tuberização observadas nestes ensaios (Fig. 11). A frequência de tuberização observada em função das concentrações de citocinina, foram compatíveis com os resultados obtidos por com diversas outras cultivares de batata por WANG & HU, 1982; TEIXEIRA & PINTO, 1991; GOPAL *et al*, 1998; e SILVA, 1999.

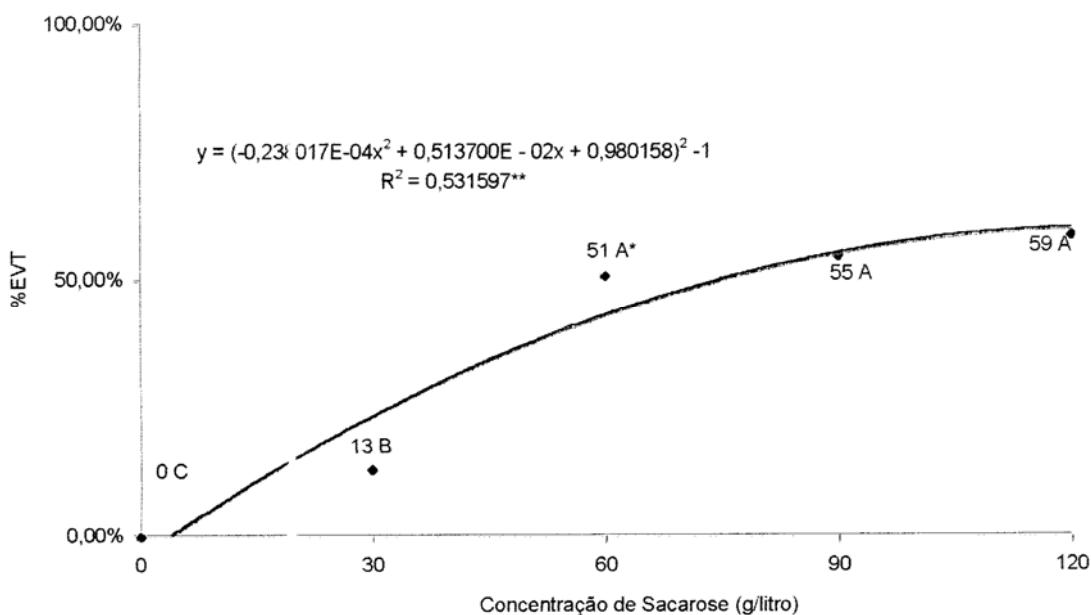


* Valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Duncan ($p<0,05\%$)
 $CV = 9,43\%$

Figura 11 - Percentual de explantes de batata (cv Jeat Bintje), que tuberizaram até os 80 dias de cultura (%EVT), em função da concentração de citocinina (BAP ou KIN).

A influência tanto de BAP quanto de KIN no %EVT, não se repetiu quando se avaliou o índice de explantes com brotações que tuberizaram (%EBT), pois não foi detectada diferença estatística entre o tratamento isento de citocinina e os tratamentos com este regulador, independente da concentração. Estes resultados condizem com os obtidos por FREIRE (1998), em ensaio similar. Considerando-se que a frequência de explantes que tuberizaram e não desenvolveram brotações, é complementar ao %EBT, podemos concluir que este índice também não foi influenciado pela presença de citocinina no meio.

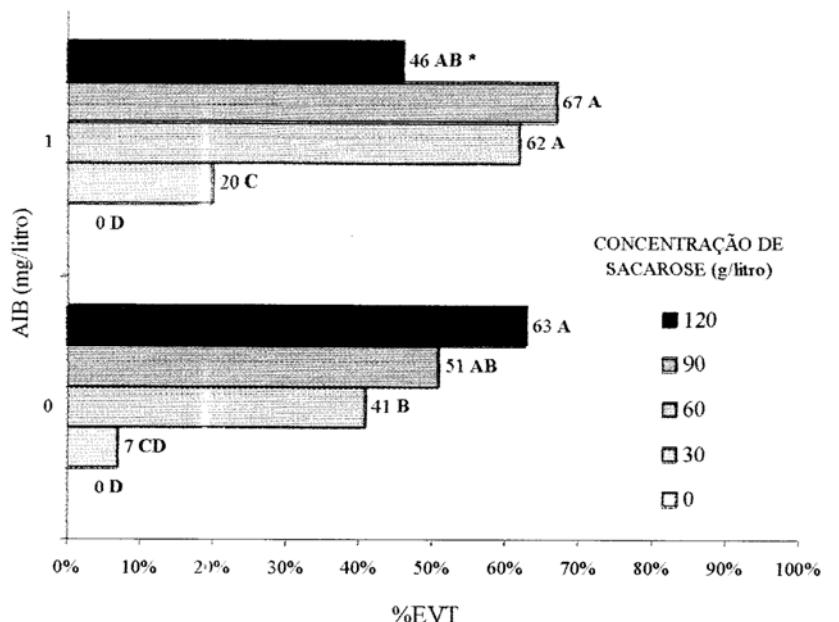
Não foi detectada diferença significativa entre as médias de %EVT, observadas em meio contendo concentrações de 6; 9 e 12% de sacarose, estatisticamente superiores à média observada em 3% de sacarose (Fig. 12). A frequência de explantes que tuberizaram no cultivo (in presença de 3% de sacarose, foi o menor índice observado, visto que em ausência de sacarose, não houve tuberização, ratificando a importância do suprimento de sacarose em níveis superiores à 6% para este processo, conforme ressaltado por diversos autores.



Valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Duncan ($p<0,05\%$)
 CV = 8,24%

Figura 12 - Percentual de explantes de batata (cv Jeat Bintje), que tuberizaram até os 80 dias de cultura (%EVT), em função da concentração de sacarose.

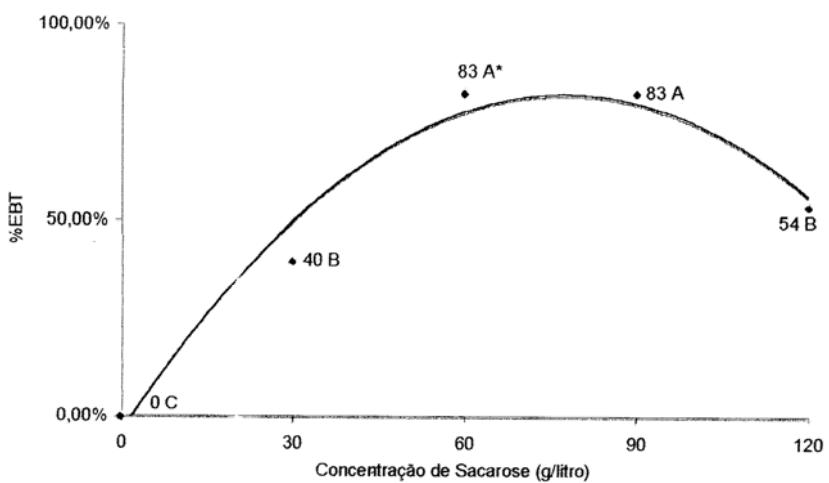
Os resultados ratificaram o afirmado por GREGORY (1956) e diversos estudos subsequentes, que a tuberização *in vitro* é altamente responsiva à concentrações de sacarose. Em ausência de auxina exógena, o mais alto índice de tuberização, foi observado em 12% de sacarose (Fig. 13). Entretanto esta concentração de 12%, tornou-se supraótima em presença de 1,0 mg/litro de AIB, que incrementou o índice obtido pelas demais concentrações de sacarose, culminando o maior %EVT em 9% de sacarose.



* Valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Duncan ($p < 0,05\%$)
 CV = 10,66%

Figura 13 - Percentual de explantes de batata (cv Jeat Bintje), que tuberizaram até os 80 dias de cultura (%EVT}, em função das concentrações de sacarose e AIB.

Os maiores índices de explantes com brotações que tuberizaram (%EBT), foram observados em meio contendo 6 e 9% de sacarose. As médias observadas em 3 e 12% de sacarose são similares estatisticamente, e em ausência de sacarose, não houve tuberização (Fig. 14). A eficiência de indução a tuberização, pelo nível de sacarose em explantes que não desenvolveram brotações, consequentemente foi maior em 3% e 12% de sacarose, visto que o índice de explantes sem brotações que tuberizaram é complementar ao %EBT. Entretanto faz-se importante ressaltar a concentração de 12% de sacarose, produziu maior %EVT que a de 3% (vide Fig. 12). Consequentemente podemos afirmar que em termos absolutos, a quantidade de explantes sem brotações foi superior em 12% de sacarose.



* Valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Duncan ($p < 0,05\%$)
 CV = 10,66%

Figura 14 - Percentual de explantes de batata (cv Jeat Bintje) com brotações, que tuberizaram até os 80 dias de cultura (%EBT), em função da concentração de sacarose.

Na avaliação de %EBT, a interação significativa entre os fatores AIB e sacarose, apresentaram valores que apontam a mesma tendência observada para %EVT (Fig. 15). Percebe-se que a mais alta e a mais baixa concentração de sacarose, induziram mais intensamente a tuberização em explantes sem brotações. A indução à tuberização, incrementada pela presença de AIB, se deu de modo mais eficaz em meio com 3, 6 e 9% de sacarose.

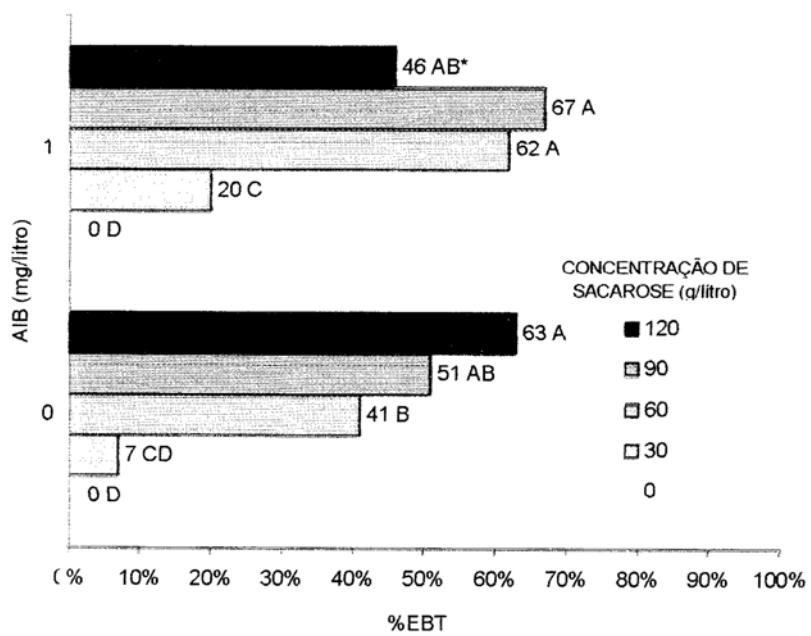


Figura 15- Percentual de explantes de batata (cv Jeat Bintje) com brotações, que tuberizaram até os 80 dias de cultura (%EBT), em função das concentrações de sacarose e AIB

Resumidamente a presença de sacarose foi fundamental para a ocorrência do processo de tuberização, nas condições estudadas. Conforme já descrito, o pré-tratamento dos explantes à 15° C por 10 horas em ausência de luz, foi suficiente indução de tuberização em explantes, desde que em presença de sacarose. A tuberização se processou com maior frequência a partir de 6% P/V de sacarose, similarmente aos resultados obtidos por TEIXEIRA & PINTO (1991) com a cultivar Bintje. A presença de 1,0 mg/litro de AIB no meio, tornou supraótima a frequência de tuberização promovida por 12% de sacarose. Apesar do papel preponderante do balanço de reguladores na indução à tuberização, sabe-se que a sacarose *in vitro* é também um fator indutor deste processo (GREGORY, 1956; TEIXEIRA & PINTO, 1991). Em altas concentrações de sacarose houve maior frequência de indução e formação de tubérculos sésseis, diretamente nas gemas axilares dos explantes, não havendo o prévio desenvolvimento de brotações/estolões. Teoricamente a produção de tubérculos sésseis, otimizou o processo, pois o fato do explante não desenvolver brotações e tuberizar, supõe um privilégio ao dreno que deve ser preferencial em um sistema produtivo, o tubérculo.

3.2 - Produtividade e caracterização dos tubérculos.

Nos ensaios I e II a produtividade foi avaliada a partir do número médio de tubérculos produzidos por explante. Para o cálculo, tomou-se como referência os totais de explantes submetidos aos tratamentos (PZ); de explantes sobreviventes (PY) e de explantes que tuberizaram (PX). Houve influência altamente significativa da presença de citocinina na produtividade *in vitro*, independentemente da fonte (BAP ou KIN) e da concentração, conforme exposto na Tabela 7.

Tabela 7 - Produtividade por explante de batata (cv. Jeat Bintje), em função da concentração de citocinina, independentemente da fonte (BAP ou KIN).

Concentração de citocinina (mg/litro)	Nº de tubérculos por explante (unidades/explante)		
	PZ ¹	PY ²	PX ³
0	0.24 B*	0.34 B	0.85 B
5	0.73 A	0.83 A	1.22 A
10	0.62 A	0.73 A	1.09 A
15	0.55 A	0.67 A	1.06 A

* Valores seguidos pela mesma letra, na mesma coluna, não diferem entre si pelo teste de Duncan ($p<0,05$)

¹. PZ = nº de tubérculos/explante, considerando-se todos os explantes – CV = 7,57%

². PY = nº de tubérculos/explante, considerando-se somente os explantes vivos – CV = 7,82%

³. PX = nº de tubérculos/explante, considerando-se somente os explantes que tuberizaram – CV = 5,99%

A produtividade só alcançou um índice pouco maior que 1 (um) tubérculo por explante, quando considerou-se somente os explantes que efetivamente tuberizaram (PX). Isto denota a necessidade de intensificar o tratamento indutor, de modo a aumentar a frequência de explantes que efetivamente tuberizam, otimizando os recursos aplicados no sistema produtivo *in vitro*, que não devem ser “desperdiçados” com explantes que não produzem tubérculos.

Na avaliação em separado dos ensaios I (BAP) e II (KIN), verificou-se que a mais alta concentração de citocinina, seja de BAP ou KIN, não se distinguiu estatisticamente dos mais baixos valores de produtividade, aferidos em ausência de reguladores exógenos (Tab. 8). Estes resultados demonstram que os níveis mais baixos de citocinina foram mais adequados à obtenção das mais altas produtividades *in vitro*. Considerando o objetivo de otimizar o sistema produtivo, a concentração de 5,0 mg/litro de citocinina, seria a mais indicada, pois incorre, no máximo, em metade do custo referente ao uso das outras duas concentrações avaliadas (10 e 15 mg/litro).

Tabela 8 - Produtividade por explante de batata (cv. Jeat Bintje), em função da concentração de citocinina (BAP ou KIN).

Concentração de citocinina (mg/litro)	PX ¹ (unidades/explante)	
	BAP ²	KIN ³
0	0,86 B*	0,86 B
5,0	1,25 A	1,21 A
10,0	1,09 A	1,20 A
15,5	0,98 AB	1,03 AB

* Valores seguidos pela mesma letra, na mesma coluna, não diferem entre si pelo teste de Duncan ($p<0,05$)

¹. PX = n° de tubérculos/explante, considerando-se somente os explantes que tuberizaram - CV= 5,99%

². Resultados do ensaio I, CV= 5,62%

³. Resultados do ensaio II, CV= 6,82%

A produtividade por explante foi favorecida, de modo altamente significativo, pela simples presença de sacarose, tendo em vista que em sua ausência não foi verificada tuberização (Tab. 9). O número de tubérculos por explante obtidos em meio com 3% de sacarose foi inferior estatisticamente à produtividade aferida com concentrações superiores de sacarose (6, 9 e 12%).

Tabela 9 - Produtividade em n° de tubérculos por explante de batata (cv. Jeat Bintje), em função da concentração de sacarose no meio de cultura.

Concentração de sacarose (g/litro)	n° de tubérculos por explante (unidade/explante)		
	PZ ¹	PY ²	PX ³
0	0,00 C*	0,00 C	0,00 C
30	0,14 B	0,14 B	0,44 B
60	0,57 A	0,58 A	1,01 A
90	0,64 A	0,66 A	1,03 A
120	0,57 A	0,59 A	1,01 A

* Valores seguidos pela mesma letra, na mesma coluna, não diferem entre si pelo teste de Duncan ($p<0,05$)

¹. PZ = n° de tubérculos/explante, considerando-se todos os explantes – CV = 7,57%

². PY = n° de tubérculos/explante, considerando-se somente os explantes vivos – CV = 7,82%

³. PX = n° de tubérculos/explante, considerando-se somente os explantes que tuberizaram – CV = 5,99%

De um modo geral, a produtividade obtida com o uso de citocinina, mostrou a mesma tendência observada por WANG & HU (1982) e demais autores posteriormente, ou seja, os estímulos necessários ao processo de tuberização, são alcançados através da disponibilidade de citocina exógena em concentrações em torno de 5 mg/litro. No caso da cv, Jeat Bintje e nas condições experimentais aqui descritas, independe da forma da citocinina (BAP ou KIN). A mais alta produtividade em tubérculos por explante, pode ser alcançada em resposta às menores concentrações de citocinina (5 e 10 mg/litro), independente da fonte (BAP ou KIN). Desse modo recomenda-se para a otimização do

sistema, além do uso da menor concentração, a escolha da fonte de citocinina de menor custo, entre BAP e KIN. A concentração de 6% de sacarose é suficiente à obtenção da mais alta produtividade, que pouco superou o índice de 1 (um) tubérculo por explante. Destaca-se que concentrações acima de 10% não foram inibitórias à produtividade, diferentemente do afirmado por PALMER & SMITH (1970), com relação à tuberização.

A massa fresca dos tubérculos (MFT), variou de 31,74 a 48,59 mg/tubérculo, respectivamente em função do uso de BAP e KIN, independente da concentração, diferença significativa pelo teste F da análise da variância realizada com os resultados dos ensaios I e II conjuntamente.

Na Tabela 10, estão dispostas as médias de MFT, obtidas em função das concentrações de citocina utilizadas, considerando-se a avaliação conjunta dos ensaios I e II e somente a do ensaio I, visto que não foi detectada diferença significativa para este fator no ensaio II.

Tabela 10 - Massa fresca dos tubérculos de batata (cv. Jeat Bintje), em função da concentração de citocinina .

Concentração de citocinina (mg/litro)	MFT ¹ (mg/tubérculo)	
	(BAP ou KIN) ²	BAP ³
0	50.83 A *	50.68 A
5	47.49 A	30.08 AB
10	34,67 AB	23.40 B
15	27.74 B	23.10 B

* Valores seguidos pela mesma letra, na mesma coluna, não diferem entre si pelo teste de Duncan ($p<0,05$)

1. MFT = massa fresca dos tubérculos

2. Resultados da avaliação conjunta dos ensaios I e II - CV= 6,67%

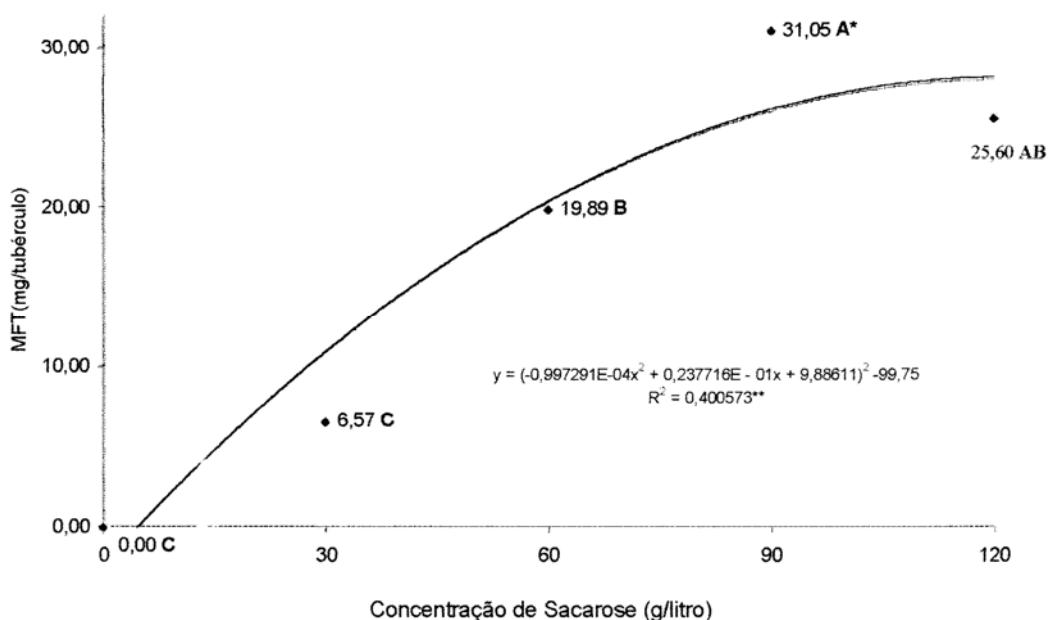
3. Resultados do ensaio I, CV= 6,54%

OBS. Não foi detectada variância significativa para este fator no ensaio II (KIN).

A menor concentração de citocinina utilizada, independente da fonte, propiciou ganho de massa equivalente ao observado em meio isento do fitorregulador exógeno. Tal fato ratifica as observações acerca da pré-existência de fatores endógenos, que neste caso, propiciaram aos explantes, a capacidade de acumular massa fresca nos níveis observados. Quando avaliado somente o ensaio I, nota-se que a interferência de BAP no hipotético balanço endógeno de reguladores, foi desfavorável ao acúmulo de massa fresca, quando em concentrações de 10 e 15 mg/litro. É importante destacar que a produtividade em ausência de BAP, foi significativamente inferior (vide Tab. 8). Entretanto não foi significativa a correlação entre a MFT e a produtividade, não sendo possível afirmar que a redução do número de tubérculos por explante, foi responsável pela maior massa fresca destes, em virtude da redução do número de drenos, mantendo-se a mesma fonte. A citocinina exógena (BAP ou KIN) interferiu com o hipotético balanço endógeno de reguladores, de modo semelhante ao verificado em 22 genótipos de *Solanum tuberosum* L., por COPAL *et al* (1998), utilizando-se de BAP. Desse modo, e considerando-se as conclusões acerca dos resultados de produtividade, mostra-se

recomendável o uso de 5,0 mg/litro de citocinina, independente da fonte (BAP ou KIN), sugerindo-se o uso da de menor custo.

Os tubérculos, quando formados em meio contendo a partir de 6% de sacarose, apresentam a maior média de massa fresca (MFT), destacando-se na concentração de 9%. Apesar de perceptível, foi baixa a correlação existente entre a MFT e as concentrações de sacarose (Fig. 16).

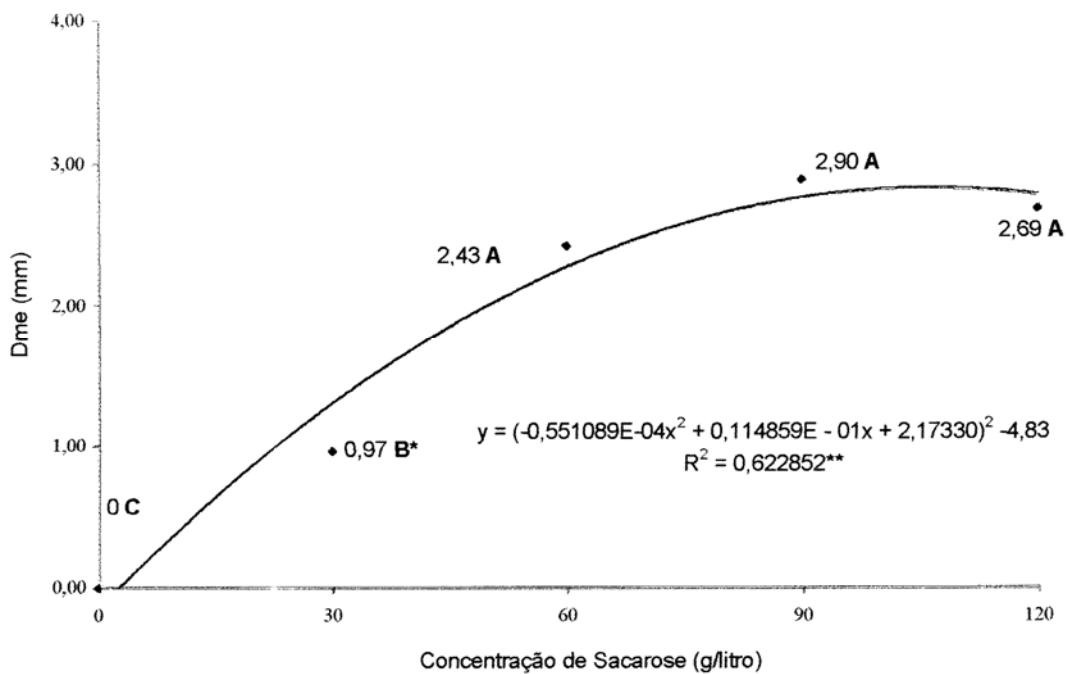


* Valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste *de Duncan* ($p<0,05\%$)
CV = 5,46%

Figura 16 - Massa fresca dos tubérculos de batata (cv. Jeat Bintje), em função da concentração de sacarose no meio de cultura.

Estes resultados condizem com o afirmado por diversos autores de que concentrações de sacarose a partir de 6%, são mais adequadas ao processo de tuberização *in vitro*, ressaltando que com relação ao acúmulo de massa fresca, a concentração de 12% não foi inibitória para este índice.

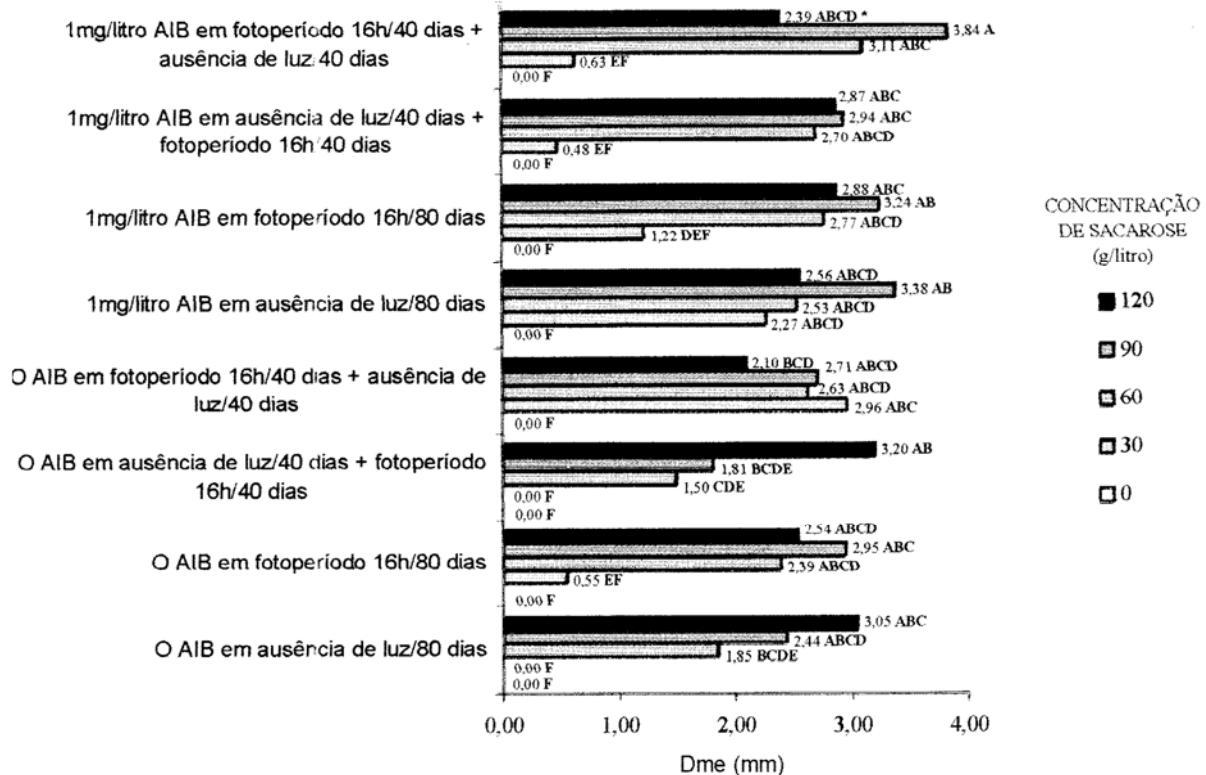
Na avaliação em separado do ensaio 1, não foi detectada diferença estatística entre os valores médios do diâmetro menor dos tubérculos, tampouco foi possível distinguir as classes de diâmetro, visto que todos enquadram-se como “microtubérculos”, de acordo com a classificação adotada pela EMBRAPA/Canoinhas (comunicação pessoal). O diâmetro do eixo menor dos tubérculos (Dme), apresentou variância significativa, em função da concentração de sacarose no meio de cultura. A Figura 17, apresenta as médias do Dme em cada condição de cultivo, e a equação que melhor expõe a correlação entre estas variáveis. Exetuando-se o cultivo em ausência de sacarose, que não produziu tubérculos, o meio com 3% deste carbohidrato foi o único que se mostrou insuficiente ao incremento de Dme, nos níveis observados nas demais concentrações de sacarose avaliadas. Do mesmo modo que para a produtividade, e diferentemente do observado para a massa fresca, verifica-se que não houve diferença estatística entre as médias de Dme aferidas em meio com 6% e 9% de sacarose.



Valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Duncan ($p<0,05\%$)
 $CV = 5,85\%$

Figura 17 - Diâmetro menor dos tubérculos (Dme) de batata (cv. Jeat Bintje), em função da concentração de sacarose no meio de cultura.

O Dme foi influenciado de forma significativa pela interação de todos os fatores avaliados no presente ensaio. A Figura 18, mostra a distribuição das médias obtidas para cada combinação dos fatores avaliados, e demonstra a influência positiva da presença de AIB, quando em condições de luminosidade desfavoráveis ao incremento de Dme, ou seja, em ausência de luminosidade pelo menos durante os primeiros 40 dias de cultura. A auxina exógena, conforme já suposto com relação a outros índices estudados, pode estar envolvida com a otimização do fluxo de assimilados para o tubérculo.



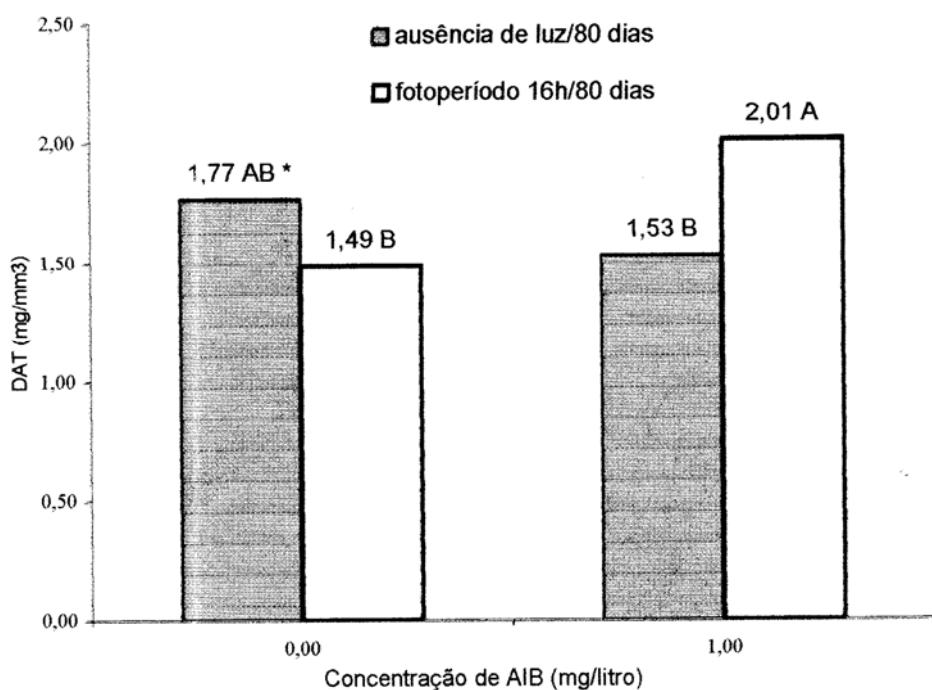
Valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Duncan ($p<0,05\%$)
CV - 6,10%

Figura 18 - Diâmetro menor dos tubérculos (Dme) de batata (cv. Jeat Bintje), em função das concentrações de sacarose e AIB, em diferentes condições de luminosidade.

Os resultados também denotam que a presença de AIB induziu sensível incremento de Dme, quando as demais condições de cultivo foram idênticas. A presença de AIB, propiciou ainda a obtenção de Dme em dimensões similares às obtidas em sua ausência, em meio com suprimento superior de sacarose. Faz-se interessante observar, que desse modo, suprimentos de sacarose que em ausência de AIB, apresentaram elevados valores de Dme, em sua presença tornaram-se concentrações supraótimas. Outra observação interessante, é de que as condições adversas ao aumento de Dme, foram atenuadas pela presença de AIB, considerando ainda que em alguns casos, somente em sua presença foi que ocorreu a tuberização. A troca de ambiente mostrou-se desfavorável ao incremento de Dme, propiciando os menores valores aferidos, principalmente em condições de suprimento de sacarose menor que 6%. Novamente, este fenômeno, se fez menos marcante quando em presença de AIB.

Conforme já exposto, o período inicial de 40 dias, foi fundamental para o estabelecimento estável do explante *in vitro*, sendo a luz um fator importante neste período. Este estabelecimento diz respeito à obtenção de condições fisiológicas suficientes para a tuberização e posterior desenvolvimento dos tubérculos. A ação do MB, favorável ao estabelecimento do explante, possivelmente promoveu a obtenção mais rápida e ou eficiente das condições necessárias a este processo. Tais observações reforçam a idéia de Que os efeitos da presença de luz, estejam diretamente ligados à manutenção dos níveis da auxina ativa, principalmente a de origem endógena.

A relação entre a massa fresca dos tubérculos e seu volume, calculado com base nos diâmetros do maior e menor eixo (dedução da fórmula em anexo), deram origem ao que se denominou densidade aparente do tubérculo (DAT). A presença de AIB, sob 16h de luz/dia, durante todo o período de 80 dias, revelou-se estimulante ao incremento da DAT, apresentando a maior média aferida. (Fig. 19). Novamente verifica-se a interação entre luz e a auxina exógena foi significativa e influenciou o hipotético balanço endógeno de reguladores. As altas médias de DAT obtidas em ausência de luz e de auxina exógena, levam a crer que este hipotético balanço endógeno, foi o mais adequado a este índice. A auxina exógena incrementa o pool endógeno de auxina. A ação da luz possivelmente interfere neste *pool*, considerando-se que é uma das responsáveis pela degradação não enzimática de auxinas (BANDURSKI et al, 1995). Desse modo podemos afirmar que a auxina exógena, “restaurou” e de certo modo otimizou o *pool* endógeno de auxina, em favor das maiores médias de DAT, na presença de luz. Este incremento do *pool* endógeno, foi desfavorável à DAT quando na ausência “regulatória” da luz, tornando a adição de 1,0 mg/litro de auxina exógena, supraótima ao índice observado.



* Valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Duncan
($p<0,05\%$) CV = 4,86%

Figura 19 - Densidade aparente dos tubérculos (DAT) de batata (cv. Jeat Bintje), em função da presença de luz e de 1,0 mg/litro de AIB no meio de cultura.

Os níveis de citocinina também apresentaram influência significativa na variância das médias de DAT (Tab. 11), onde o incremento deste valor, independeu da forma utilizada (BAP ou KIN). Desse modo permanece a recomendação acerca do uso da concentração 5 mg/litro, da fonte (BAP ou KIN) menos onerosa economicamente.

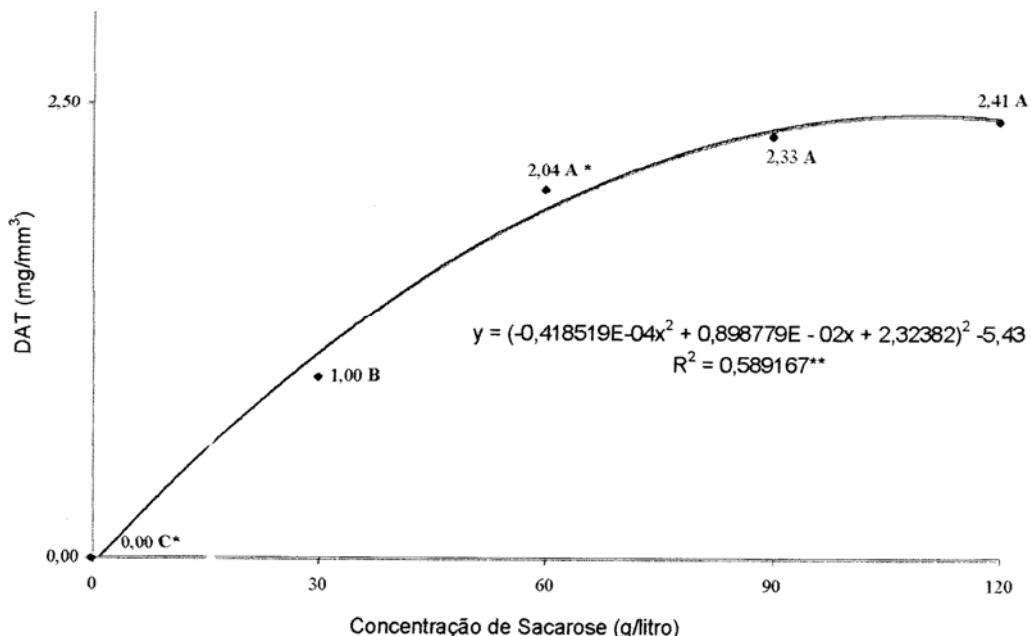
Tabela 11 - Densidade "aparente" dos tubérculos (DAT), de batata (cv. Jeat Bintje), e função da presença de diferentes concentrações de citocinina (BAP ou KIN).

Concentração de citocinina (mg/litro)	DAT (mg/mm ³)
0	1.40 B ¹
5	1.95 A
15	1,73 AB
10	1.71 AB

CV=4,86%

¹. Valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Duncan ($p<0,05$)

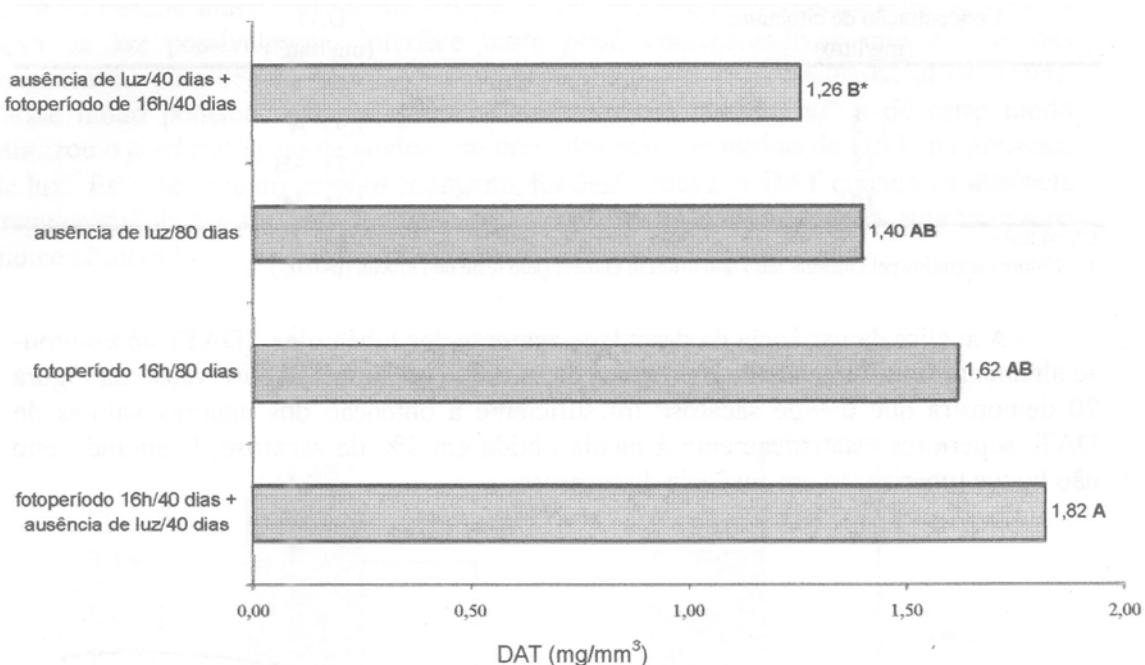
A análise da variância da densidade aparente dos tubérculos (DAT), apresentou-se altamente significativa para a presença de sacarose no meio. A observação da Figura 20 demonstra que 6% de sacarose foi suficiente à obtenção dos maiores valores de DAT, superiores estatisticamente à média obtida em 3% de sacarose, lembrando que não houve tuberização em ausência de sacarose.



* Valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Duncan ($p<0,05\%$) CV = 5,76%

Figura 20 - Densidade aparente dos tubérculos (DAT) de batata (cv. Jeat Bintje), e função da concentração de sacarose no meio de cultura.

A DAT também foi influenciada de modo altamente significativo, pela troca de ambiente, aos 40 dias de cultura, que foi responsável pela maior e menor médias de DAT aferidas, respectivamente quando os explantes foram transferidos de uma condição de 16h de luz diárias, para ausência desta, e vice-versa. Condições de exposição à luz, no período de 40 dias iniciais de cultura, foram favoráveis ao aumento de DAT. No entanto, a observação da Figura 21, mostra não haver diferença estatística entre explantes mantidos durante todo o período em ausência ou presença de 16h de luz diárias.



* Valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Duncan ($p<0,05\%$)
CV = 5,76%

Figura 21 - Densidade aparente dos tubérculos (DAT) de batata (cv. Jeat Bintje), em diferentes condições de luminosidade.

O sítio de formação dos tubérculos variou de forma significativa em função das diferentes concentrações de sacarose no meio de cultura (Tabela 12).

Tabela 12 - Frequência relativa dos “sítios” onde foram formados os tubérculos e dos que brotaram até os 80 dias de cultivo em diferentes concentrações de sacarose no meio.

Concentração de sacarose no meio de cultivo (g/litro)	%TA ¹	%TO ²	%TB ³
0	0,0 C ⁴	0,0 C	0,00 B
30	27,2 A	5,68 C	7,74 AB
60	35,0 A	28,14 B	15,35 A
90	25,7 A	56,00 A	20,78 A
120	19,5 B	70,82 A	12,57 AB

¹. %TA = Frequência de tubérculos formados a partir de gemas apicais. CV=10,82%

². %TO = Frequência de tubérculos formados no explante original (tubérculos sésseis). CV=11,07%

³. %TB = Frequência de tubérculos que cujas gemas (olhos) brotaram *in vitro*. CV=10,80%

⁴. Valores seguidos pela mesma letra na mesma coluna, não diferem entre si, pelo teste de Duncan ($p<0,05$)

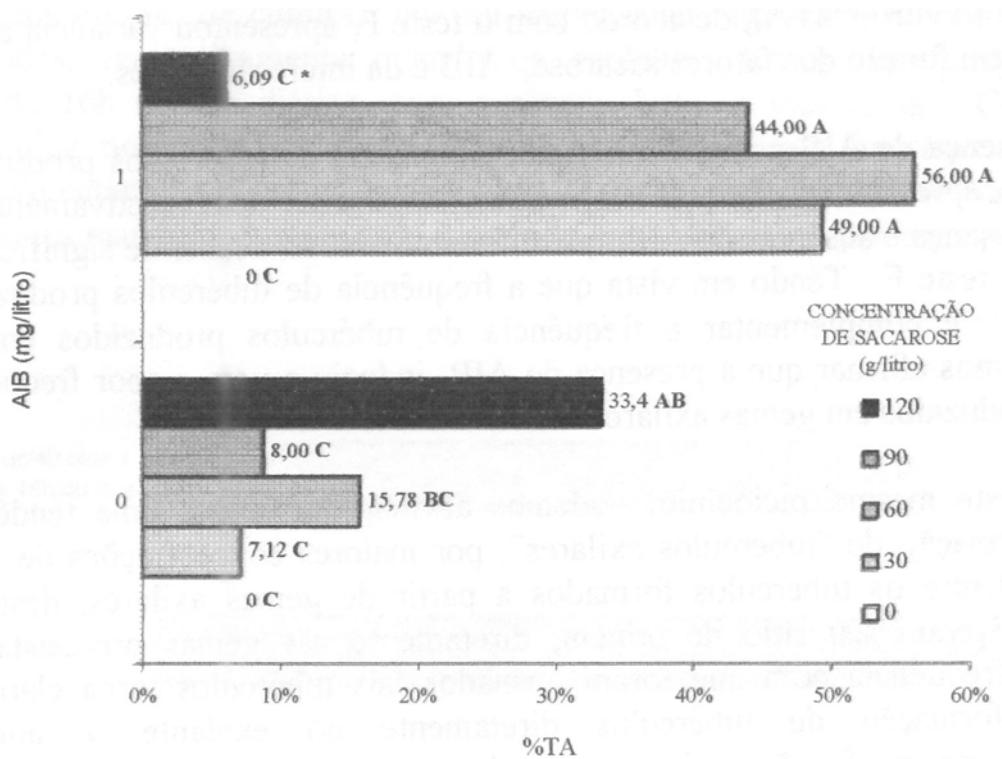
A frequência de tubérculos produzidos em gemas apicais das brotações desenvolvidas *in vitro* (%TA), de acordo com o teste F, apresentou variância altamente significativa, em função dos fatores sacarose; AIR e da interação destes.

A presença de AIB possibilitou maior frequência de tubérculos produzidos em gemas apicais, apresentando frequências médias, de 30 e 13 %, respectivamente, para o cultivo em presença e ausência de AIB que diferem de modo altamente significativo, de acordo com o teste F. Tendo em vista que a frequência de tubérculos produzidos em gemas apicais, é complementar à frequência de tubérculos produzidos em gemas axilares, podemos afirmar que a presença de AIB, induziu a uma menor frequência de tubérculos produzidos em gemas axilares.

Com este mesmo raciocínio, podemos afirmar que existe uma tendência ao estímulo à formação de “tubérculos axilares”, por maiores concentrações de sacarose (Tab. 12). Dentre os tubérculos formados a partir de gemas axilares, destacam-se aqueles que tiveram seu sítio de origem diretamente nas gemas pré-existentes no explante. A frequência com que foram formados tais tubérculos torna claro que o estímulo à formação de tubérculos diretamente no explante é aumentado consideravelmente, em função do incremento de sacarose no meio. Estas observações sugerem maior eficácia de concentrações maiores de sacarose, no grau de estímulo ao processo de tuberização.

A frequência de tubérculos que desenvolveram brotações a partir de suas gemas (olhos), denota a ausência de condições inibitórias, tanto a nível das condições exógenas da cultura, quanto a uma possível “dormência” do tubérculo produzido. É interessante ressaltar que a presença de brotações possibilita ainda inferências sobre o período em que houve a formação do tubérculo, pois tubérculos formados tardivamente, no período observado do estudo, não teriam tempo hábil para o desenvolvimento de brotações a partir de suas gemas (olhos).

A interação altamente significativa, entre os fatores Sacarose e AIB demonstram que as maiores frequências de tubérculos desenvolvidos a partir de gemas apicais (%TA), ocorreu em presença de AIB (Fig. 22). Do mesmo modo que com outros parâmetros, o AIB tornou supraótima a concentração de sacarose, que em sua ausência, induziu ao melhor índice (%TA) observado nas condições experimentais. É importante ressaltar que 12%, quando supraótimo para %TA, em presença de AIB, torna-se ótimo para a frequência de tubérculos ‘axilares’ (séssveis), em virtude da complementaridade, já ressaltada, entre estes índices. É possível que a atuação do AIB não se restrinja ou mesmo não esteja relacionada diretamente com a modificação do balanço de reguladores no sistema. Há fortes indícios neste estudo, acerca do favorecimento promovido pela presença de AIB, no transporte de assimilados, possivelmente estimulando a organogênese de tecido vascular. Considerando-se que sacarose é o açúcar de transporte nas plantas e também um fator estimulante ao processo de tuberização *in vitro* (GREGORY, 1956), podemos afirmar que a presença de AIB no meio, seja modificando o balanço regulador existente no sistema, ou disponibilizando mais sacarose ao sítio de recepção do estímulo indutor de tuberização, desloca significativamente o alvo para as gemas axilares.



* Valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Duncan ($p<0,05\%$)
 CV=10,82%

Figura 22 - Frequência relativa de tubérculos produzidos a partir de gemas apicais (%TA) em diferentes concentrações de sacarose, em ausência ou presença de 1,0 mg/litro de AIB.

Resumidamente concluímos que apesar da pequena frequência de tuberização e da baixa produtividade, os tubérculos produzidos nas condições de ausência de citocinina, foram os que apresentam as maiores médias de massa fresca. O pré-tratamento dos explantes à 15° C por 10 horas, em ausência de luz, previamente à transferência para câmara de crescimento, simula as condições naturais sabidamente indutoras do processo de tuberização. No presente estudo, verificou-se que estes fatores possivelmente formados ou ativados pelo pré-tratamento, são suficientes ao maior ganho de massa fresca pelo tubérculo. Apesar de não detectado em análises de correlação, é importante ressaltar que este maior ganho de massa nestes tubérculos, pode ainda ser resultado das menores taxas de tuberização e de produtividade auferidas nas condições descritas, que influenciam o que de certo modo, o que podemos chamar de relação fonte-dreno. A concentração de 9% de sacarose, foi a mais favorável ao ganho de massa fresca pelo tubérculo. Para o crescimento radial do tubérculo, 6% de sacarose mostrou-se suficiente para alcance dos maiores índices aferidos no ensaio. A presença de AIB (1,0 mg/litro), do mesmo modo que ocorreu com a frequência de tuberização, tornou concentrações de sacarose supraótimas com relação ao ganho em crescimento radial do tubérculo, atenuando ainda a combinação de condições desfavoráveis a tal processo.

4 - CONCLUSÕES

O pré-tratamento dos explantes à 15° C por 10 horas em ausência de luz, parece promover o balanço hormonal no explante, adequado à indução do processo de tuberização, quando em presença de sacarose, dispensando o uso de reguladores exógenos.

O fotoperíodo diário de 16 horas (3000 lux), nos primeiros 40 dias de cultivo favorece a manutenção e desenvolvimento dos explantes *in vitro*. A condição de ausência de luz neste período é desfavorável à cultura, principalmente quando aos 40 dias é transferida para as condições de fotoperíodo descritas acima.

O balanço hormonal existente nos explantes submetidos ao pré-tratamento indutor de tuberização, quando não modificado por aplicação exógena de reguladores, promove aumento de massa fresca no tubérculo, mas apresenta baixa frequência de tuberização e baixa produtividade por explante.

A presença de AIB no meio de cultura na concentração de 1,0 mg/litro, estimula o estabelecimento e desenvolvimento do explante *in vitro*, incrementando o índice de tuberização e outros que indicam crescimento do tubérculo, tanto em condições favoráveis quanto desfavoráveis.

A obtenção de quantidades apreciáveis de tubérculos produzidos a partir de gema pré-existente (tubérculo séssil), é favorecida por concentrações de sacarose entre 9 e 12% , presença de AIB (1,0 mg) e KIN (5,0 mg/litro).

4.1. - Considerações finais

A atuação do MB provavelmente pode não estar relacionada diretamente com o estímulo hormonal à tuberização. Nas condições *in vitro* estudadas, houve fortes indícios da ação da auxina na otimização dos processos de transporte de assimilados pelo explante. A presença de AIB induziu a uma melhora do desempenho dos drenos, tanto planta quanto tubérculo. Em idênticas condições de disponibilidade de carboidratos, o AIB tornou supraótimas determinadas concentrações de sacarose.

O direcionamento da cultura à produção de tubérculos sésseis, com a consequente redução do sistema de produção à caule⁶ e tubérculo (*stem and tuber*), pode ser vantajoso, conforme previsto por GREGORY (1956) em seu estudo da produção de tubérculos em propágulos vegetativos de batateira, em “estado induzido”. Este sistema não produz estolons, raízes e folhas. Esta “eliminação de órgãos”, em cultura de tecidos, significa menor consumo, otimização do uso do espaço físico, e possivelmente redução do tempo de cultura, resultando em redução de custos de produção. As condições experimentais utilizadas apresentaram limitação ao aumento significativo da produtividade deste tipo de tubérculo por explante, pois os explantes continham somente duas gemas. Desse modo a máxima produtividade potencial ficou restrita a 2 tubérculos/explante.

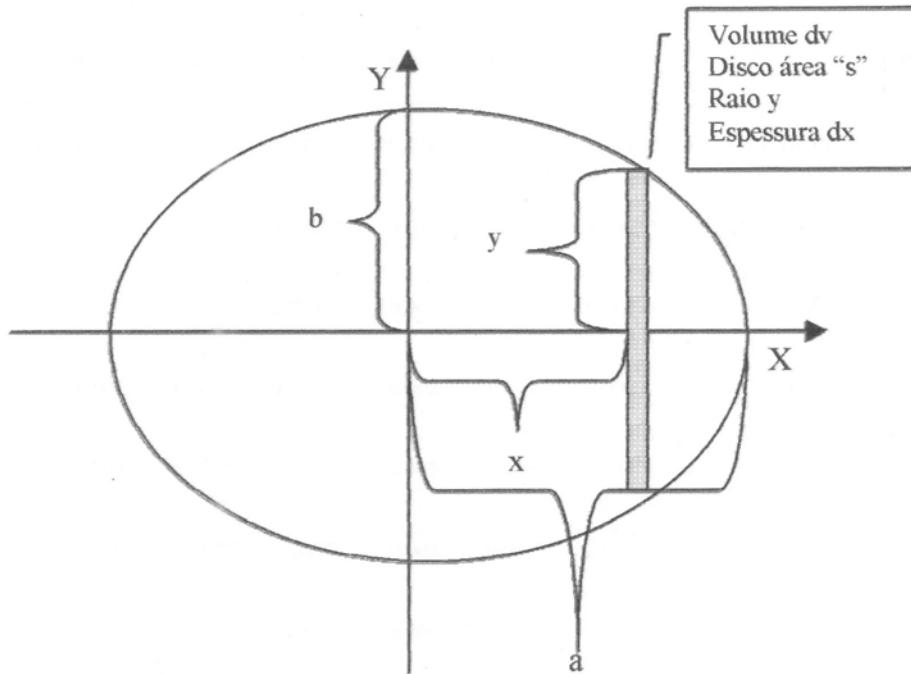
⁶ Ressalta-se que, no caso em questão, caule é o próprio explante original, sem brotações.

Propõe-se que sejam realizadas novas investigações que possibilitem o aumento da produtividade neste sistema promissor, através do ajuste das condições de indução descritas. O pré-tratamento pode ser intensificado de modo a aumentar o potencial de tuberização. A produtividade pode ser incrementada através do uso de uma maior densidade de gemas por frasco e consequentemente, maior quantidade de potenciais sítios de formação de tubérculos sésseis. Para este incremento, pode-se aumentar o número de explantes nos frascos, sejam eles com duas ou somente uma gema. No entanto o uso de explantes maiores, com mais gemas, principalmente com entrenós curtos, mostra-se mais interessante do ponto de vista econômico. Estes "macro" explantes podem permitir sensível redução no tempo requerido para manipulação dos propágulos, uso de equipamentos e mão de obra, e ainda a redução do risco de contaminação da cultura, desde que a fonte dos explantes, sejam matrizes *in vitro*. Pode-se cogitar o uso de segmentos caulinares induzidos, cultivados em meio nutritivo, em condições controladas, não necessariamente axênicas, o que reduziria sensivelmente o custo de produção.

A avaliação da cultura através de índices mostrou-se promissora, havendo necessidade de aperfeiçoamento destes, de modo a estabelecer classes de tubérculos produzidos *in vitro*, que devem ser correlacionadas com índices obtidos no plantio *ex vitro* destes tubérculos. Recomenda-se no tratamento destes índices e demais dados heterocedásticos obtidos na experimentação em cultura de tecidos, o uso da fórmula $X_t = RAIZ(X + X_{máx})$, (vide item 2.2). Esta fórmula permitiu a obtenção de homocedasticidade e de coeficientes de variação adequadamente baixos, muito inferiores aos normalmente descritos em trabalhos com cultura de tecidos vegetais.

5 - ANEXOS

Anexo 1 - Cálculo do Volume Aparente (VAT) do Tubérculo.
(Colaboração do Professor Cristiano Renato Klein - UFRRJ).



$$dv = \pi y^2 dx$$

$$\text{Volume} = 2 \int_{x=0}^{x=a} \pi y^2 dx \quad (1)$$

$$\frac{x^2}{a^2} + \frac{y^2}{b^2} = 1 \rightarrow y^2 \cdot b^2 \left(1 - \frac{x^2}{a^2}\right)$$

Levando y^2 na (1)

$$\text{Volume} = 2 \pi b^2 \int_{x=0}^{x=a} \left(1 - \frac{x^2}{a^2}\right) dx$$

$$\text{Volume} = \frac{4}{3} \pi b^2 a$$

Obs: O valor de “a” é medido no eixo de revolução “X”, e o valor de “b” é medido no eixo “Y”, perpendicular ao eixo de revolução.

Anexo 2 - Análise da Variância

Ensaio I

ENSAIO I							QUADRADO MÉDIO					
FV	GL	%EV	%EB	MFB	%EVT	%EBT	PZ	PY	PX	MFT	DAT	Dme
REP	3	0.000	0.002	4.329	0.038	0.006	0.043	0.040	0.012	3.172	0.005	0.049
Factor A (BAP)	3	0.001	0.000	35.476**	0.072**	0.013	0.067**	0.070**	0.035*	2.818*	0.038	0.016
Factor B (AMB)	1	0.000	0.001	8.354**	0.002	0.017	0.005	0.006	0.006	0.145	0.020	0.003
AB	3	0.000	0.003**	3.155*	0.008	0.017	0.008	0.007	0.005	1.566	0.006	0.072
Factor C (AIB)	1	0.004*	0.004*	2.399	0.005	0.001	0.000	0.002	0.005	0.026	0.010	0.008
AC	3	0.000	0.002*	4.267**	0.002	0.006	0.009	0.008	0.009	0.101	0.010	0.012
BC	1	0.001	0.000	0.244	0.006	0.001	0.004	0.008	0.007	1.266	0.227**	0.010
ABC	3	0.000	0.002	0.446	0.001	0.006	0.002	0.002	0.006	0.141	0.042	0.031
Error	45	0.001	0.001	0.869	0.013	0.013	0.011	0.012	0.010	0.997	0.022	0.037
CV%	63	1.87	1.88	4.73	9.23	8.18	7.23	7.61	5.62	6.51	5.48	6.17
Média máxima ^y	1	1	332.8	1	1	1.5	1.5	2	203.4	5.68	6.7	

* Teste F ($p<0,05$)

** Teste F ($p<0,01$)

y - Valor que foi somado às médias para transformação (raiz quadrada desta soma)

Factorial ANOVA for the factors:

Replication (BLOCO) with values from 1 to 4

Factor A (KIN) with values from 1 to 4 (0; 5; 10 e 15 mg/litro de BAP)

Factor B (AMB) with values from 1 to 2 (ausência ou presença de 16h (3000lux)/dia/80 dias)

Factor C (AIB) with values from 1 to 2 (ausência ou presença de 1,0 mg/litro de AIB)

Ensaio II

ENSAIO II

QUADRADO MÉDIO

FV	GL	%EV	%EB	MFB	%EVT	%EBT	PZ	PY	PX	MFT	DAT	Dme
REP	3	0.000	0.005	15.957**	0.023	0.018	0.038	0.037	0.004	9.049	0.014	0.136
Factor A (KIN)	3	0.001	0.004	13.662**	0.089**	0.015	0.110**	0.103**	0.039*	2.724	0.030	0.036
Factor B (AMB)	1	0.000	0.006	42.182**	0.000	0.000	0.009	0.010	0.009	0.460	0.000	0.015
AB	3	0.000	0.011	2.768	0.020	0.007	0.022	0.021	0.001	1.267	0.057*	0.031
Factor C (AM)	1	0.002	0.002	0.765	0.007	0.004	0.007	0.013	0.026	0.141	0.018	0.002
AC	3	0.000	0.001	8.876*	0.015	0.003	0.012	0.014	0.002	0.916	0.001	0.018
BC	1	0.001	0.003	3.842	0.000	0.020	0.000	0.000	0.010	0.023	0.009	0.000
ABC	3	0.000	0.001	4.866	0.003	0.009	0.007	0.008	0.009	1.420	0.009	0.037
Error	44	0.001	0.005	2.431	0.015	0.015	0.017	0.018	0.013	1.312	0.017	0.044
CV%	62 ^z	1.68	4.87	5.96	9.69	8.99	8.54	8.72	6.82	7.06	5.67	5.89
Média máxima ^y		1	1	601	1	1	1.67	1.67	1.75	214.5	3.66	9.4

* Teste F (p<0,05)

** Teste F (p<0,01)

z - Em virtude da perda de uma parcela, foi subtraído 1 GL do Erro.

y - Valor que foi somado às médias para transformação (raiz quadrada desta soma)

Factorial ANOVA for the factors:

Replication (BLOCO) with values from 1 to 4

Factor A (KIN) with values from 1 to 4 (0; 5; 10 e 15 mg/litro de KIN)

Factor B (AMB) with values from 1 to 2 (ausência ou presença de 16h(3000lux)/dia/80 dias)

Factor C (MB) with values from 1 to 2 (ausência ou presença de 1,0 mg/litro de AIB)

Ensaio III

ENSAIO III

QUADRADO MÉDIO

FV	GL	%EV	%EB	DNB	MFB	MSB	%ET	%EBT	PZ	PY	PX
REP	2	0.001	0.037**	0.455**	14.180	9.589**	0.003	0.036	0.005	0.004	0.000
Factor A (AIB)	1	0.014**	0.008	0.090*	10.430**	4.863**	0.025	0.013	0.016	0.014	0.030
Factor B (SAC)	4	0.017**	0.235**	0.745**	14.739**	7.479**	0.342**	0.514**	0.261**	0.237**	0.512**
AB	4	0.012**	0.006	0.025	02.549**	1.471*	0.024*	0.046*	0.011	0.008	0.008
Factor C (AMB)	3	0.005*	0.068**	0.080**	10.355**	10.720**	0.012	0.034	0.011	0.010	0.023
AC	3	0.005*	0.002	0.016	01.036	0.920	0.007	0.040	0.004	0.005	0.025
BC	12	0.006**	0.051**	0.032	00.879	0.702	0.009	0.021	0.006	0.006	0.004
ABC	12	0.006**	0.002	0.013	00.651	0.734	0.007	0.023	0.007	0.006	0.016
Error	72	0.002	0.006	0.019	-	-	0.009	0.017	0.008	0.008	0.010
	70	-	-	-	00.568	0.440	-	-	-	-	-
C V%	113	2.79	5.72	5.33	-	-	8.24	10.66	6.33	5.85	5.98
	111	-	-	-	4.59	5.25	-	-	-	-	-
Média máxima ^y	1	1	5	229	136	1	1	1	1.67	2	2

* Teste F ($p<0,05$)

** Teste F ($p<0,01$)

z - Em virtude da perda de 6 parcelas, foram subtraídos 6 GL do Erro.

w- Em virtude da perda de 8 parcelas, foram subtraídos 8 GL do Erro.

y - Valor que foi somado às médias para transformação (raiz quadrada desta soma)

Factorial ANOVA for the factors: Replication (BLOCO) with values from 1 to 3

Factor A (AIB) with values from 1 to 2 (ausência E 1,0 mg/litro de AIB)

Factor B (SAC) with values from 1 to 5 (0; 3; 6; 8 E 12% de sacarose)

Factor C (AMB) with values from 1 to 4 (1=ausência de luz/80 dias; 2=16h de luz (3000lux)/dia/80 dias; 3=ausência de luz/40 dias + 16h de luz (3000lux)/dia/40 dias; 4=16h de luz (3000lux)/dia/40 dias + ausência de luz/40 dias)

(continua...)

Ensaio III (cont.)

ENSAIO III

QUADRADO MÉDIO

FV	GL	MFT	DAT	Dme	%TA	%TO	%TB
REP	2	3.431	0.027	0.109**	0.019	0.027	0.017
Factor A (AIB)	1	1.185	0.046	0.141*	0.185**	0.000	0.004
Factor B (SAC)	4	8.857**	0.974**	1.523**	0.091**	0.432**	0.034*
AB	4	0.694	0.020	0.033	0.112**	0.017	0.009
Factor C (AMB)	3	0.316	0.065*	0.046	0.006	0.015	0.008
AC	3	0.129	0.059	0.034	0.005	0.004	0.005
BC	12	0.473	0.010	0.033	0.011	0.015	0.009
ABC	12	0.368	0.033	0.053*	0.013	0.013	0.020
	72 ^z	-	-	-	0.014	0.016	0.013
Error							
	70 ^w	0.346	0.023	0.024	-	-	-
	113	-	-	-	10.82	11.07	10.80
CV%							
	111	5.46	5.76	6.10	-	-	-
Média máxima ^y		99.75	5.43	4.83	1	1	1

* Teste F ($p<0,05$)

** Teste F ($p<0,01$)

z - Em virtude da perda de 6 parcelas, foram subtraídos 6 GL do Erro.

w- Em virtude da perda de 8 parcelas, foram subtraídos 8 GL do Erro.

y - Valor que foi somado às médias para transformação (raiz quadrada desta soma)

Factorial ANOVA for the factors: Replication (BLOCO) with values from 1 to 3

Factor A (AIB) with values from 1 to 2 (ausência E 1,0 mg/litro de AIB)

Factor B (SAC) with values from 1 to 5 (0; 3; 6; 8 E 12% de sacarose)

Factor C (AMB) with values from 1 to 4 (1=ausência de luz/80 dias; 2=16h de luz (3000lux)/dia/80 dias;

3=ausência de luz/40 dias + 16h de luz (3000lux)/dia/40 dias; 4=16h de luz (3000lux)/dia/40 dias + ausência de luz/40 dias)

Ensaio I e II conjuntamente

ENSAIO II e III

QUADRADO MÉDIO

FV	GL	%EV	%EB	MFB	%ET	%EBT	PZ	PY	PX	MFT	DAT	Dme
Tipo CIT (L)	1	0.001	0.004	8.095*	0.001	0.001	0.016	0.010	0.003	8.931**	0.001	0.155*
R(L)	6	0.000	0.003	9.175**	0.031*	0.011	0.037*	0.035*	0.008	5.955**	0.008	0.086*
Factor A (CIT)	3	(1.001	0.001	33.714**	0.150**	0.017	0.157**	0.156**	0.061**	3.694*	0.056*	0.025
I A	3	0.000	0.003	2.167	0.008	0.012	0.009	0.008	0.010	1.859	0.003	0.024
Factor B (COMB)	3	0.002*	0.003	13.093**	0.006	0.008	0.002	0.006	0.014	0.344	0.063	0.004
LB	3	0.001	0.003	4.658*	0.001	0.006	0.005	0.006	0.006	0.296	0.030	0.006
AB	9	0.000	0.004	5.110**	0.006	0.010	0.008	0.008	0.004	1.414	0.023	0.055
LAB	9	0.000	0.002	2.112	0.010	0.006	0.011	0.012	0.006	0.377	0.013	0.003
Error	89	0.001	0.003	1.486	0.014	0.014	0.013	0.014	0.011	1.133	0.017	0.036
C V%	126 ^z	1.75	3.63	4.71	9.43	8.53	7.57	7.82	5.99	6.67	4.86	5.35
Média máxima ^y		1	1	601	1	1	1.67	1.67	2	214.5	5.68	9.4

* Teste F (p<0.05)

** Teste F (p<(0,01)

z - Em virtude da perda de uma parcela, foi subtraído 1 GL do Erro.

y - Valor que foi somado às médias para transformação (raiz quadrada desta soma)

Two Factor Randomized Complete Block Design Combined over Locations (L=Ensaios)

Factorial ANOVA for the factors:

Location (TIPO_CIT) with values from 1 to 2 (BAP E KIN)

Replication (BLOCO) with values from 1 to 4

Factor A (CIT) with values from 1 to 4 (0; 5; 10; 15 mg/litro de citocinina)

Factor B (COMB) with values from 1 to 4 (ausência ou presença de 1 mg/litro de AIB combinados com ausência ou presença de luz (3000 lux)/16h/dia/80 dias)

6 - BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

- ALONI, R. 1995. The induction of vascular tissues by auxin and cytokinin *In: Plant Hormones* - P.J. Davies (ed). Kluwer academic Publishers. Printed in Netherlands. 531-546.
- AKITA, M. ; TAKAIAMA, S. 1994. Induction and development of potato tubers in a jar fermentor. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 36: 177-182.
- ANDERSON, W. C. ; MEAGHER, G. W. 1977. Cost of propagating Broccoli plants through tissue culture. *HortScience* 12: 543-544.
- BANDURSKI, R. S. ; COHEN, J. D. ; SLOVIN, J. & REINECKE, D. M. 1995. Auxin biosynthesis and metabolism *In: Plant Hormones* - P.J. Davies (ed). Kluwer academic Publishers. Printed in Netherlands. 39-65.
- BANZATO, D. A. ; KRONKA, S. N. 1992. *Experimentação agrícola*. Jaboticabal - FUNEP, 247p.
- BHATTACHARYA, P.; DEY, S. ; BHATTACHARYA, B. C. 1994. Use of low-cost gelling agents and support matrices for industrial scale plant tissue culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 37: 15-23.
- BROWN, C. R. (1993). Origin and history of the potato. *American Potato Journal*. 70, 363-373.
- DANIELS, J. 1994. Produção de batata-semente no Rio Grande do Sul. *Hort Sul*. v3. n 1.p.12-15
- DAVIES, P. J. 1995 (ed.). *Plant Hormones, Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*. Kluwer Academic Publishers, Holanda, 2^a ed., 833p.
- EWING, E. E. 1985. Cuttings as simplified models of the potato plant. *In: "Potato Physiology"* (Ed) Paul H. Li. Academic Press Inc. 154-199.
- EWING, E. E. 1995. The role of hormones in Potato (*Solanum tuberosum* L.) tuberization. *In: Plant Hormones* - P.J. Davies (ed). Kluwer academic Publishers. Printed in Netherlands. 698-724.
- 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 - MG.
- FREIRE, M. de O. 1998. *Estudos sobre a utilização de minitubérculos produzidos in vitro, como método de propagação alternativa para produção comercial de Batata (*Solanum tuberosum* L.)*. Tese de mestrado.
- GREGORY, L. E. 1956. Some factors for tuberization in the potato plants. *Am. J. of Bot.* 43 (4):281-288.

GOPAL, J.; MINOCHA, J. L. ; DHALIWAL. 1998. Microtuberization in potato (*Solanum tuberosum* L.). *Plant Cell Reports.* 17 794-798.

HAGA, O. 1992. System of measurement of CO₂ and photosynthesis in growth chambers. *Acta Horticulturae.* 304: 335-337.

HAGEN, G. 1995. The control of gene expression by auxin In: *Plant Hormones* - P.J. Davies (ed). Kluwer academic Publishers. Printed in Netherlands. 228-245.

HANDRO, W. 1993. Crescimento e desenvolvimento. *Apostila de Fisiologia vegetal* - São Paulo: IBUSP, 71 p.

HANNAPEL, D. J. 1991. Characterization of the early events of potato tuber development. *Physiologia Plantarum* 83: 568-573. Copenhagen.

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, Tissue and Organ Culture* 37: 113-120.

LOMAX, T. L. ; MUDAY, G. K. ; RUBERY, P. H. 1995. Auxin transport In: *Plant Hormones* - P.J. Davies (ed). Kluwer academic Publishers. Printed in Netherlands. 509-530.

LOPES, C. A. ; BUSO, J. A. 1997. (ed.). Cultivo da batata (*Solanum tuberosum* L.). *Instruções Técnicas da Embrapa Hortaliças*. Ministério da Agricultura e Abastecimento. 35p.

MIRANDA, R. M.; PRADO, M. A.; SILVA, F. G.; COSTA, A. C.; PARRAGA, M. S. 2000. Efeitos da desinfestação, pré-exposição ao frio e manutenção de explantes em diferentes intensidades luminosas na tuberização *in vitro* de batata (*Solanum tuberosum* L.). *Agronomia*, Seropédica, v.34, n.1/2.

MURASHIGE, T. ; SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15: 431-497.

PALMER, C. E. ; SMITH, O. E. 1970. Cytokinins and tuber initiation in the potato *Solanum tuberosum*. *Nature* 221:279-280.

PRADO, M. A. 1992. *Estudo de tuberização in vitro de batata (Solanum tuberosum)*. Tese de Mestrado. UFRRJ.

RAVEN, P. H., EVERET, R. F. ; EICHORN, S. E. 2001. *Biologia Vegetal*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, e ed., 728 p.

REIFSCHINEIDER, F. J. B. 1987. *Produção de Batata*. Linha Gráfica e Editora. 239p.

SILVA, J. A. B. da. 1999. *Minituberização, micropropagação e efeitos dos estresses salino e térmico sobre características morfofisiológicas de batateiras cultivadas in vitro*. Tese de Mestrado - Universidade Federal de Viçosa. 106 p.

SUTTLE, J. C. ; HULSTSTRAND, J. F. 1994. Role of abscisic acid in potato microtuber dormancy. *Plant Physiol.* 105: 891-896.

TEIXEIRA, D. M. C. ; PINTO, J. E. B. P. 1991. Minituberização de batata em diferentes níveis de N, Sacarose e BAP. *R. Bras. Fisiol. Veg.* 3(2): 77-81.

THIEME, R. 1998. An *in vitro* potato cultivar collection, microtuberization and storage of microtubers. *Plant Genetic Resources Newsletter*. 89:17-19. FAO IBPGR.

TORRES, A. C. ; CALDAS, L. S. 1990. *Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas*. ABCTP e EMBRAPA/CNPH Brasília. 433p.

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. ; BUSO, J. A. 1998. *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Embrapa-SPI / Embrapa-CNPH. 2v. (864p.)

TOVAR, P.; ESTRADA, R.; SCHILDE-RENTSCHLER, L.; DODDS, J. H. 1985. Inducción y utilización de tubérculos *in vitro* de papa. *Circular del CIP* (Centro Internacional de la Papa).

VASIL, I. K. 1994. Automation of plant propagation. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 39: 105-108.

VREUGDENHIL, D. ; STRUM, P. C. 1989. An integrated view of the hormonal regulation of tuber formation in potato (*Solanum tuberosum*). *Physiologia plantarum* 75: 525-531. Copenhagen.

WANG, P. J. ; HU, C. Y. 1982. *In vitro* mass tuberization and virus-free seed-potato production in Taiwan. *American Potato Journal*, Orono. ME, n.59, p. 33-37.