

ISSN 1516-8840

Novembro, 2010

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária*

*Embrapa Clima Temperado*

*Ministério da agricultura, Pecuária e Abastecimento*

# ***Documento*** 317

## **Protocolos de Micropropagação de Plantas. I-Batata**

*Leonardo Ferreira Dutra*

*Kerlley Cristina de Assis Mayer*

*Natália Dias Gomes da Silva*

*Antonio Fernando Pacheco Nino*

*Francisco Osmi Xavier da Silva*

*Francisco Carlos Budjarck Vieira*

Embrapa Clima Temperado

Pelotas, RS

2010

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Clima Temperado  
BR 392 Km 78  
Caixa Postal 403, CEP 96010-971- Pelotas, RS  
Fone: (53) 3275-8199  
Fax: (53) 3275-8219 – 3275-8221  
Home Page: [www.cpact.embrapa.br](http://www.cpact.embrapa.br)  
e-mail: [sac@cpact.embrapa.br](mailto:sac@cpact.embrapa.br)

#### Comitê Local de Publicações

Presidente: Ariano Martins de Magalhães Júnior  
Secretária - Executiva: Joseane Mary Lopes Garcia  
Membros: Márcia Vizzotto, Ana Paula Schneid Afonso, Giovani Theisen, Luis Antônio Suíta de Castro, Flávio Luiz Carpena Carvalho, Christiane Rodrigues Congro, Regina das Graças Vasconcelos dos Santos.  
Suplentes: Isabel Helena Vernetti Azambuja e Beatriz Marti Emygdio.

Supervisão editorial: Antônio Luiz Oliveira Heberlê  
Revisão de texto: Bárbara Chevallier Cosenza  
Normalização bibliográfica: Fábio Lima Cordeiro  
Editoração eletrônica e arte da capa: Manuela Meurer Doerr (estagiária)

1ª edição  
1ª impressão (2010): 50 exemplares

#### **Todos os direitos reservados**

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei N° 9.610).

#### **Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)** Embrapa Clima Temperado

---

Protocolos de micropropagação de plantas: batata / Leonardo Ferreira Dutra... [et al.] – Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2010.  
22 p. – (Embrapa Clima Temperado. Documentos, 317).

ISSN 1516-8840

1. Batata – Mudas – Plantio. 2. Micropropagação. 3. Produção – Material de Propagação – Qualidade. I. Dutra, Leonardo Ferreira. II. Série.

CDD 635.21

© Embrapa 2010

---

# **Autores**

## **Leonardo Ferreira Dutra**

Eng. Agrôn., D.Sc.

Pesquisador da

Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS,

leonardo.dutra@cpact.embrapa.br

## **Kerley Cristina de Assis Mayer**

Eng. Agrôn., M.Sc. em Agronomia

Bolsista DTI-2/CNPq

Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS,

kerleyca@hotmail.com

## **Natália Dias Gomes da Silva**

Graduanda em Ciências Biológicas

Bolsista PIBIC/CNPq

Embrapa Clima Temperado/ Anhanguera

Educacional, Pelotas, RS,

nataliadiasgomes@hotmail.com

## **Antonio Fernando Pacheco Nino**

Assistente de pesquisa da

Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS,

nino.antonio@cpact.embrapa.br

## **Francisco Osmi Xavier da Silva**

Assistente de pesquisa da

Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS,

osmi.silva@cpact.embrapa.br

## **Francisco Carlos Budjiarck Vieira**

Assistente de pesquisa da

Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS,

carlos.vieira@cpact.embrapa.br

# Apresentação

A batata (*Solanum tuberosum*) é a hortaliça mais importante do Brasil e um dos alimentos mais consumidos no mundo. O agronegócio desta cultura envolve o cultivo de 130 mil hectares por ano em oito estados brasileiros, com produção anual de 3,4 milhões de toneladas.

A batata é propagada vegetativamente via tubérculos-semente, o que facilita a transmissão de doenças causadas por viroses, as quais levam à degenerescência e causam redução de até 90% na produtividade da cultura.

Uma forma de se obter material propagativo de batata isento de viroses é o cultivo in vitro de meristemas, técnica que faz parte do processo de micropropagação desta espécie e que hoje é rotineiramente utilizada visando à produção de material propagativo com alta qualidade fitossanitária.

No entanto, embora o processo seja conhecido e amplamente utilizado, há dificuldade em se dispor de literatura que descreva minuciosamente as etapas que o compõem. Neste sentido, a Embrapa Clima Temperado oferece o presente documento, descrevendo com detalhes todo o processo de produção de mudas de batata com alta qualidade fitossanitária.

Waldyr Stumpf Junior  
Chefe Geral  
Embrapa Clima Temperado

# Sumário

Introdução: Protocolos de Micropropagação de Plantas. I - Batata.....	9
Protocolo .....	11
Plantas estabelecidas in vitro:.....	15
Conservação in vitro.....	17
Sistema hidropônico: .....	18
Referências .....	21



# Protocolos de Micropropagação de Plantas. I - Batata

---

*Leonardo Ferreira Dutra*

*Kerlley Cristina de Assis Mayer*

*Natália Dias Gomes da Silva*

*Antonio Fernando Pacheco Nino*

*Francisco Osmi Xavier da Silva*

*Francisco Carlos Budjiarck Vieira*

## Introdução

A batata é propagada vegetativamente via batata-semente, o que facilita a transmissão de doenças causadas por viroses. Embora este tipo de infecção normalmente não leve as plantas à morte, provoca degenerescência e causa redução de até 90% na produtividade da batata. De acordo com Daniels e Schons (2003), os danos causados pelas viroses em batata são de difícil determinação, dependendo da cultivar, do vírus ou da estirpe, das condições ambientais de cultivo, da época e da incidência da infecção.

Como não existem métodos de cura para as viroses da batata, a sanidade somente pode ser obtida com medidas preventivas. Neste sentido, a implantação de sistemas eficientes de produção de batata-semente isentos de patógenos é fundamental (DANIELS; SCHONS, 2003).

Uma forma de se obter material propagativo isento de viroses é o cultivo de sementes verdadeiras ou botânicas, visto que a maioria das viroses não é transmitida pelas sementes (FORTES; PEREIRA, 2003). Outra forma é o cultivo de ápices caulinares (meristemas) sob condições in vitro (MARANI; PISI, 1977; RESENDE; PAIVA, 1985;

BONIN, 1988).

A cultura de meristemas, técnica utilizada para a obtenção ou a recuperação de plantas livres de vírus, baseia-se no fato de que as partículas virais não estão distribuídas uniformemente na planta infectada e que a concentração destas decresce da base para o ápice da planta. Além disso, de acordo com Kartha (1986), acrescenta-se a indiferenciação e alta atividade metabólica dos meristemas, o que dificulta sua infecção.

De acordo com Bajaj e Sopory (1988), os trabalhos com cultura de tecidos em batata foram iniciados no início da década de 1950. A partir daí inúmeras pesquisas começaram a ser realizadas (CHAPMAN, 1955; MOREL; MARTIN, 1955; KASSANIS, 1957; MELLOR; STACE-SMITH, 1969, 1977). Atualmente a micropropagação de batata é amplamente e rotineiramente utilizada visando à produção de material propagativo com alta qualidade fitossanitária.

O processo atual de micropropagação de batata empregado em maior escala utiliza o meio de cultura com consistência semissólida (CALIGARI; POWEL, 1989; ÁVILA et al., 1994; ANDRADE, 1998; FRANÇA, 2000), proporcionada pela adição do ágar.

Há possibilidade do emprego de outras técnicas, como o uso de meio de cultura líquido ou técnicas sofisticadas como os biorreatores. Estas, embora proporcionem maior eficiência do que meios de consistência semissólida são empregadas em menor escala na micropropagação da batata. Pereira (2002) constatou que, na micropropagação de batata, a utilização de meios de cultura de consistência líquida sob agitação proporcionou maior taxa de multiplicação em relação ao meio de consistência semissólida. Além disso, promoveu diminuição no tempo de crescimento e desenvolvimento dos meristemas. O autor ainda atribuiu como vantagens deste sistema a praticidade, por ser mais fácil

de ser preparado e tornar mais simples a manipulação dos explantes, e a necessidade de menor quantidade de meio de cultura para um mesmo número de explantes, quando comparado ao meio de consistência semissólida.

O laboratório de cultura de tecidos da Embrapa Clima Temperado tem utilizado o meio de cultura com consistência semissólida, obtendo taxas satisfatórias de multiplicação de clones selecionados. O protocolo a seguir descreverá a micropropagação neste meio de cultura.

## **Protocolo**

### **- Origem do material vegetal:**

Para produção de mudas de batata isentas de viroses as fontes de explantes podem ser plantas em casa de vegetação ou já mantidas in vitro.

### **- Plantas em casa de vegetação:**

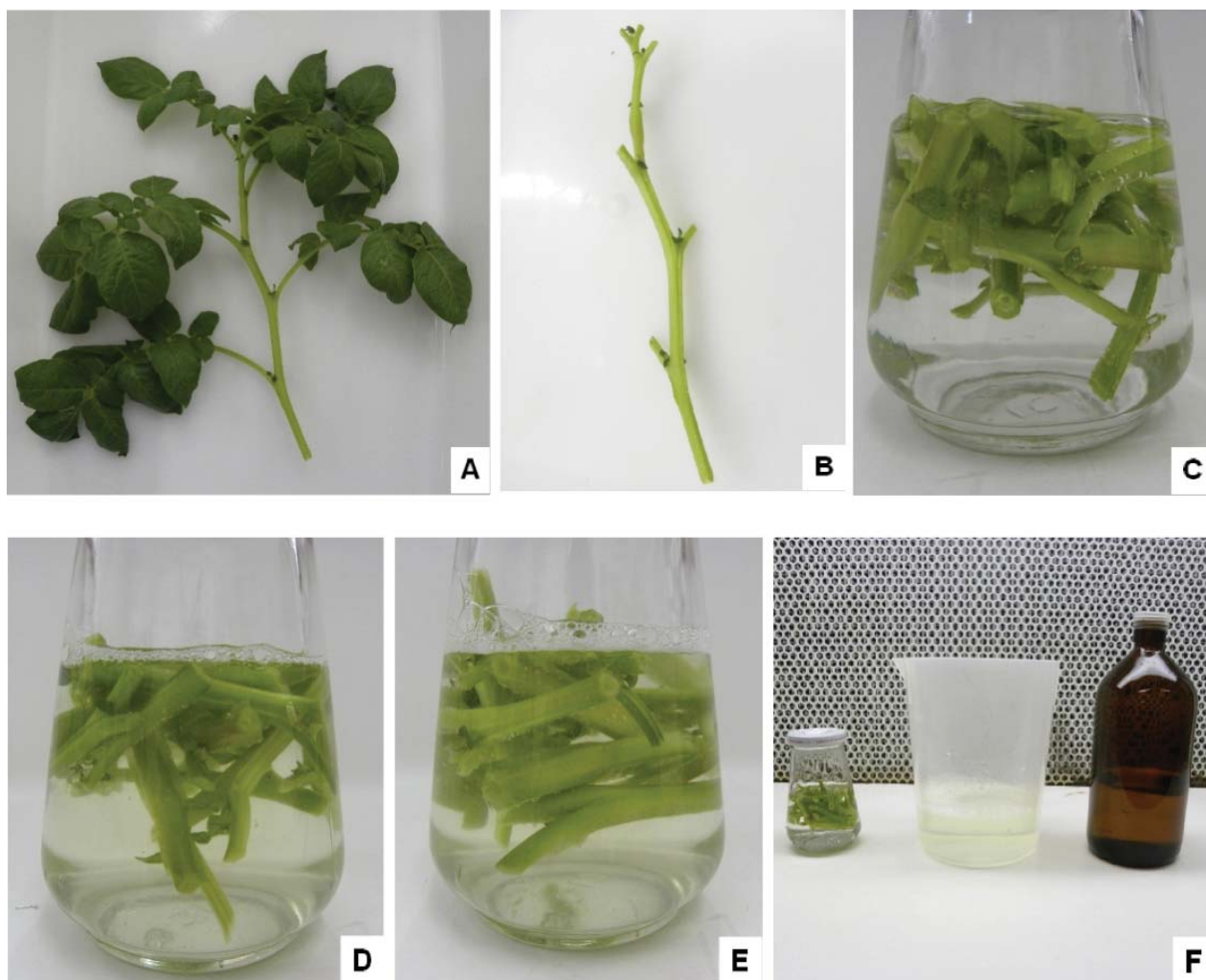
Para obter brotações novas como fonte de explantes, é realizado o plantio de batata-semente em vasos contendo substrato e mantidos em casa de vegetação (Figura 1A). O tempo médio compreendido entre o plantio e o desenvolvimento das brotações para coleta de explantes é de aproximadamente 45 dias para batata-semente sem prévio armazenamento em câmara fria, e para as que foram conservadas sob baixas temperaturas, o tempo médio de desenvolvimento das brotações é de 30 dias (Figura 1B). A irrigação nas plantas matrizes é reduzida ou suspensa de um a dois dias antes da coleta dos explantes.



Fotos: Paulo Luiz Lanzetta Aguiar e Kerlley Cristina de Assis Mayer.

Figura 1. Batata-semente para plantio em casa de vegetação (A); Planta de batata em casa de vegetação para coleta de explantes (B).

As porções terminais de brotações são coletadas com 5 cm a 10 cm de comprimento (Figura 2A); são retiradas as folhas (Figura 2B), acondicionadas em recipiente com água destilada devidamente identificado (Figura 2C); posteriormente, são levadas ao laboratório onde passam pelo processo de assepsia. Inicialmente permanecem imersas em recipiente contendo álcool 70% por dez segundos (Figura 2D), posteriormente dez minutos em solução de hipoclorito de sódio 1% adicionando-se três gotas de detergente comercial (Figura 2E), sendo que nas duas soluções os explantes devem estar em constante agitação. Finalmente, os explantes são lavados em câmara de fluxo laminar, por três vezes em água destilada e autoclavada (Figura 2F).



Fotos: Fotos: Kerlley Cristina de Assis Mayer.

Figura 2. Coleta dos explantes e assepsia. Brotações com folhas (A); Brotações sem folhas (B); Explantes em água destilada (C); Explantes em álcool 70% (D); Explantes em hipoclorito de sódio 1% (E); Tríplice lavagem em câmara de fluxo laminar (F).

O explante utilizado na micropropagação de batata visando à recuperação de plantas livres de vírus é constituído pelo ápice caulinar (meristema), o qual é inoculado em meio de cultura, composto pelos sais e vitaminas do meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com  $1 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP (6-Benzilaminopurina),  $0,01 \text{ mg L}^{-1}$  de ANA (Ácido Naftaleno Acético),  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$   $\text{GA}_3$  (Ácido Giberélico),  $0,8 \text{ g L}^{-1}$  de carvão ativado,  $30 \text{ g L}^{-1}$  de sacarose e  $7,5 \text{ g L}^{-1}$  de ágar, o pH do meio de cultura é ajustado em 5,9 antes da autoclavagem. A composição do meio MS é descrita na Tabela 1.

Tabela 1. Composição do meio de cultura MS.

NOME COMPOSTO	FÓRMULA	CONCENTRAÇÃO FINAL (g/L <sup>-1</sup> )
Nitrato de amônio	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1,65
Nitrato de potássio	KNO <sub>3</sub>	1,90
Sulfato de magnésio	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,37
Sulfato de manganês	MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	0,0169
Sulfato de zinco	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,0086
Sulfato de cobre	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,00025
Cloreto de cálcio	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,441
Ácido bórico	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,0062
Fosfato de potássio	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,17
Iodeto de potássio	KI	0,00083
Molibdato de sódio	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,025
Cloreto de cobalto	CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,000025
Sódio EDTA	Na <sub>2</sub> .EDTA	0,03725
Sulfato de ferro	FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,02785
Cloridrato de tiamina	C <sub>12</sub> H <sub>18</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>4</sub> OS	0,0005
Cloridrato de piridoxina	C <sub>8</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub> HCl	0,0005
Ácido nicotínico	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>2</sub>	0,0005
Glicina	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> O <sub>2</sub> N	0,002
Mio-inositol	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> (OH) <sub>6</sub>	0,1
Sacarose	C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>	30
Ágar		7,5

Fonte: Murashige e Skoog (1962).

O ápice caulinar é extraído com 0,2 mm a 0,3 mm, com auxílio de pinça e bisturi, utilizando-se lupa estereoscópica (Figura 3). As condições adequadas de incubação envolvem intensidade luminosa 45-55  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , temperatura (25  $\pm$  3 °C) e fotoperíodo (16 horas). O desenvolvimento dos ápices caulinares até a primeira multiplicação é de aproximadamente 50 a 60 dias.



Fotos: Natália Dias Gomes da Silva.

Figura 3. Isolamento do ápice caulinar (meristema).

### - Plantas estabelecidas in vitro:

Para verificar a sanidade das plantas in vitro antes da fase de multiplicação, uma amostra é retirada do laboratório e cultivada em casa de vegetação; destas são coletadas algumas folhas para utilização no teste de indexação.

O processo de indexação utilizado rotineiramente na Embrapa Clima Temperado é o teste sorológico DAS-ELISA (double antibody sandwich - enzyme-linked immunosorbent assay) para detecção de cinco vírus: PVY, PVS, PVX, PLRV e PVP. Nas amostras, em alguns casos, são identificados os cinco vírus, alguns em maior ou em menor frequência (Figura 4). Não é tolerada a presença de vírus nas amostras testadas, eliminando-se todos os clones que estiverem infectados.

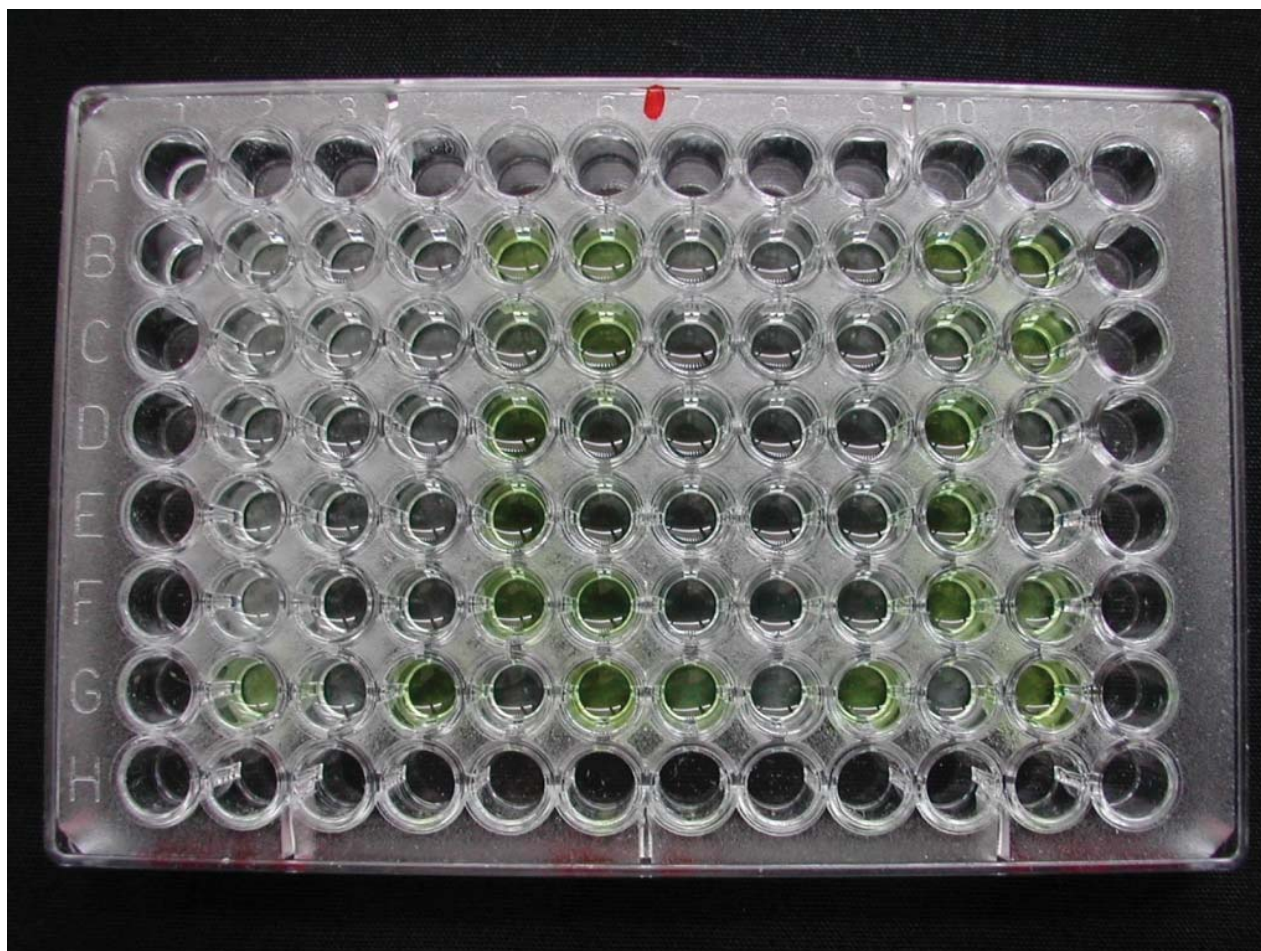


Foto: Arione da Silva Pereira.

Figura 4. Placa utilizada no teste de indexação.

Após passar pelo processo de indexação, e constatando-se ausência de infecção por vírus, os clones que estão in vitro são multiplicados em meio MS suplementado com  $30 \text{ g L}^{-1}$  de sacarose  $7,5 \text{ g L}^{-1}$  de ágar, e com pH ajustado em 5,9 antes da autoclavagem. A multiplicação é realizada até a obtenção da quantidade de plantas desejada e o tempo médio entre as repicagens de gemas apicais e axilares é de aproximadamente 15 dias (Figura 5). Para cada planta cultivada in vitro a taxa de multiplicação normalmente obtida é de três a quatro em média por subcultivo.



Fotos: Kerley Cristina de Assis Mayer.

Figura 5. Fase de multiplicação. Repicagem de plantas (A); 15 dias após a repicagem (B).

O meio de cultura para enraizamento é o mesmo utilizado nas multiplicações e o tempo médio para que esta fase inicie é de quatro a seis dias após a multiplicação, não havendo a necessidade de adição de fitorreguladores para enraizamento.

No desenvolvimento in vitro de batata é importante ressaltar que os acessos genéticos têm, normalmente, comportamento similar em todas as fases do processo de micropropagação.

Concluída a fase in vitro, as plantas podem ter duas finalidades: conservação in vitro ou sistema hidropônico.

## Conservação in vitro

Há quinze anos, o laboratório de cultura de tecidos da Embrapa Clima Temperado tem realizado a conservação in vitro de acessos genéticos de batata, hoje com aproximadamente 320, armazenados em BOD com temperatura de 4 °C a 6 °C, em tubos de ensaio contendo duas plantas com aproximadamente 3 cm de comprimento inicial. O meio utilizado para conservação é o mesmo da fase de multiplicação e as repicagens

destes materiais são realizadas em intervalos de 8 a 12 meses.



Foto: Kerley Cristina de Assis Mayer.

Figura 6. Armazenamento de acessos de batata em BOD.

## Sistema hidropônico:

As plantas produzidas in vitro podem também ser encaminhadas para sistema hidropônico em casa de vegetação visando à produção de minitubérculos. Após serem retiradas dos frascos, as mudas são lavadas e acondicionadas em esponja fenólica para melhor adaptação das plantas antes de serem levadas para o sistema hidropônico (Figura 7A).

As batatas-semente obtidas neste sistema (Figura 7B) são armazenadas em condições de ambiente durante 10 a 14 dias para suberificar a

casca. Após este período, são armazenadas por seis a oito meses, em temperatura de 3 °C a 4 °C (Figura 7C), com objetivo de superação de dormência e brotação do maior número de gemas.



Fotos: Arione da Silva Pereira.

Figura 7. Produção de batata-semente. Plantas produzidas in vitro e acondicionadas em esponja fenólica (A); Sistema hidropônico (B); Produção de batata-semente (C).

Posteriormente ao armazenamento em baixas temperaturas, os tubérculos estão aptos para produção de batata-semente a campo, em locais isolados com menor incidência de vetores e obedecendo aos requisitos exigidos pelos órgãos certificadores do processo.

## Referências

ANDRADE, L. B. **Efeito do meio de cultura, tipos de explantes e períodos de escuro sobre a micropropagação da batata (*Solanum tuberosum* L.) cv. Cristal.** 1998. 59 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

ÁVILA, A.; PEREYRA, L. S. M.; COLLINO, D. J.; ARGÜELLO, J. A. Effects of nitrogen source on growth and morphogenesis of three micropropagated potato cultivars. **Potato Research**, Wageningen, v. 37, n. 2, p. 161-168, 1994.

BAJAJ, Y. P. S.; SOPORY, S. K. Biotechnology of potato improvement. In: BAJAJ, Y. P. S. (Ed.). **Biotechnonology in agriculture and forestry 4: crops I**. New York: Springer, 1988. p. 429-453.

BONIN, V. **Obtenção e multiplicação in vitro de batateiras (*Solanum tuberosum* L.) isentas de vírus Y (PVY).** 1988. 68 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

CALIGARI, P. D. S.; POWELL, W. Variability in response of potato cultivars to micropropagation. I. In vitro performance. **Annals of Applied biology**, London, v. 115, n. 1, p. 115-121, aug. 1989.

CHAPMAN, H. W. Potato tissue cultures. **American Potato Journal**. Orono, v. 32, n. 6, p. 207-210, 1955.

DANIELS, J; SCHONS, J. Viroses. In: PEREIRA, A. da S.; DANIELS, J. (Ed.). **O cultivo da batata na região sul do Brasil**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2003. p. 300-320.

FORTES, G. R. de L.; PEREIRA, J. E. S. Batata-semente pré-básica: cultura de tecidos. In: PEREIRA, A. da S.; DANIELS, J. (Ed.). **O cultivo da batata na região sul do Brasil**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2003. p. 421-433.

FRANÇA, R. B. **Aspectos bioquímicos de cultivares de batata (*Solanum tuberosum* L.) multiplicadas in vitro sob diferentes concentrações de sacarose e crescimento em casa de vegetação**. 2000. 50 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

KARTHA, K. K. Production and indexing of disease-free plants. In: WITHERS, L. A.; ALDERSON, P. G. **Plant tissue culture and its agricultural applications**. London: Butterworths, 1986. p. 219-238.

KASSANIS, B. The use of tissue culture to produce virus free potato varieties. **Annals of Applied Biology**, Cambridge, v. 45, p.422-427, 1957.

MARANI, F.; PISI, A. Meristem-tip culture and vegetative propagation in potato. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v. 78, p. 415-422, 1977.

MELLOR, F. C.; STACE-SMITH, R. Development of excised potato buds in nutrient culture. **Canadian Journal Botany**, v. 47, n. 10, p. 1617-1621, 1969.

MELLOR, F. C.; STACE-SMITH, R. Virus free potatoes by tissue culture. In: REINERT, J.; BAJAJ, Y. P. S. (Ed.). **Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture**. New York: Springer, 1977. p. 616-635.

MOREL, G.; MARTIN, C. Guérison des pommes de terre atteintes de maladie en de virus. **Comptes Rendus de l'Academie d'Agriculture de France**, Paris, v. 41, p. 472-475, 1955.

MURASHIGE, T. ; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

PEREIRA, J. E. S. **Otimização da produção de material pré-básico de batata sob condições de cultivo in vitro, ex vitro e hidropônico**. 2002. 126 f. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

RESENDE, R. O.; PAIVA, M. Eradication of potato virus X and S by meristem-tip culture. **HortScience**, Alexandria, v. 20, p. 525, 1985.

