

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Centro de Desenvolvimento Tecnológico – CDTEc
Curso de Graduação em Biotecnologia



Trabalho Acadêmico de Conclusão de Curso

Concentrações de Agentes Osmóticos no
Crescimento Lento *in vitro* de Batata cv. 'Macaca'

Rafaela Silva Formoso

Pelotas, 2013

Rafaela Silva Formoso

Concentrações de Agentes Osmóticos no Crescimento Lento *in vitro* de Batata cv. 'Macaca'.

Trabalho acadêmico apresentado ao Curso de Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Biotecnólogo.

Orientador Acadêmico: Dra. Luciana Bicca Dode

Orientadora de Estágio: Dr. Leonardo Ferreira Dutra

Pelotas, 2013

Dados de catalogação na fonte:
Ubirajara Buddin Cruz – CRB-10/901
Biblioteca de Ciência & Tecnologia – UFPel

F726c

Formoso, Rafaela Silva

Concentrações de agentes osmóticos no crescimento lento *in vitro* de batata c.v. Macaca / Rafaela Silva Formoso. – 33f. : il. – Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Biotecnologia). Universidade Federal de Pelotas. Centro de Desenvolvimento Tecnológico. Pelotas, 2013. – Orientador Luciana Bicca Dode ; co-orientador Leonardo Ferreira Dutra

1.Biotecnologia. 2. *Solanum tuberosum*. 3.Batata.
4.Crescimento *in vitro*. 5.Osmorreguladores. 6.Conservação.
I.Dode, Luciana Bicca. II.Dutra, Leonardo Ferreira. III.Título.

CDD:

583.952

Banca examinadora:

M.Sc. Carla Silveira, Universidade Federal de Pelotas

Dra. Daiane Peixoto Vargas, Embrapa Clima Temperado

Dra. Luciana Bicca Dode (Orientadora), Universidade Federal de Pelotas

*“Dedico este Trabalho de Conclusão de Curso
aos meus professores e orientadores.”*

AGRADECIMENTOS:

À Universidade Federal de Pelotas pela oportunidade de realização do curso.

À todos os professores do curso de Graduação em Biotecnologia pelo apoio e ensinamentos.

À minha orientadora, Luciana Bicca Dode, pelas oportunidades, pelo carinho de sempre e pela confiança no meu trabalho.

Ao meu orientador, Leonardo Ferreira Dutra, pela oportunidade, incentivo e confiança em mim depositada.

À Daiane Peixoto Vargas, pela orientação, amizade e por compartilhar sua imensa sabedoria.

A todos os meus amigos do Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Clima Temperado, em especial Raquel, Kerley, Lorena, Nino, Falcão e Juliana, pela ajuda e apoio em qualquer momento.

Aos meus colegas, companheiros e amigos conquistados nesta trajetória em Pelotas, pelo companheirismo, apoio e por tudo que passamos juntos.

As minhas amigas de Livramento, que mesmo longe, sempre se fizeram presente, me apoiando em todos os momentos.

Aos meus pais, Janio Formoso e Margareth Fernandes, pela oportunidade, apoio e sincera orientação.

A Gabriela, minha irmã mais velha, sempre fonte de inspiração.

A toda minha família pelo amor incondicional.

Obrigada por tudo!

RESUMO

Silva Formoso, Rafaela. **Concentrações de Agentes Osmóticos no Crescimento Lento *in vitro* de Batata 'Macaca'**. 2013. Monografia – Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

A conservação de germoplasma *in vitro*, baseada em sistemas de crescimento lento de plantas, pode ser obtida e ajustada através da modulação de diferentes fatores, dentre eles, a regulação osmótica do meio de cultivo. O objetivo deste trabalho foi reduzir a velocidade de crescimento *in vitro* de plantas de batata cv. Macaca, sob efeito de diferentes concentrações de agentes osmóticos. Para avaliar o efeito dos osmorreguladores, um experimento foi conduzido com segmentos nodais inoculados em tubos de ensaio contendo 25 mL de meio MS acrescido de mio-inositol (100 mg L^{-1}), ágar ($7,5 \text{ g L}^{-1}$) e combinações entre sacarose (0 ou 30 g L^{-1}), manitol (0, 20 ou 40 g L^{-1}) e sorbitol (0, 20 ou 40 g L^{-1}), incubados durante 180 dias. Na etapa de recuperação do crescimento, os explantes conservados *in vitro* no experimento anterior foram inoculados em meio de cultura contendo os sais do MS, 30 g L^{-1} de sacarose, $7,5 \text{ g L}^{-1}$ de ágar e 100 mg L^{-1} de mio-inositol e a viabilidade das culturas foi avaliada após 30 dias. As médias da porcentagem de sobrevivência no ensaio de crescimento lento, obtidas em meio suplementado com 30 g L^{-1} de sacarose combinada com 20 g L^{-1} de manitol + 20 g L^{-1} de sorbitol (90%) e de 30 g L^{-1} de sacarose combinada com 40 g L^{-1} de manitol + 20 g L^{-1} de sorbitol (90%) não diferiram entre si, sendo significativamente superiores aos demais tratamentos. O comprimento dos brotos e o comprimento das raízes foram maiores nos tratamentos com 30 g L^{-1} de sacarose + 40 g L^{-1} de sorbitol. Na fase de recuperação o maior número de mudas obtido foi originado dos explantes cujo tratamento para conservação *in vitro* continha 30 g L^{-1} de sacarose + 20 g L^{-1} de manitol + 20 g L^{-1} de sorbitol acrescentados, o que indica que é viável a manutenção de *Solanum tuberosum* L. cv 'Macaca' em condições de crescimento lento pelo período de 180 dias.

Palavras-chave: Biotecnologia, *Solanum tuberosum*, batata, crescimento *in vitro*, osmorreguladores, conservação.

ABSTRACT

Silva Formoso, Rafaela. **Concentrations of Osmotic Agents in Slow Growth in vitro of Potato 'Macaca'**. 2013. Monografia – Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

The germplasm conservation in vitro based on slow plant growth systems can be obtained and adjusted through modulation of different factors, among them, the osmotic regulation of the growth medium. The objective of this work was to reduce the in vitro growth of potato plants cv. Macaca, in response to different concentrations of osmotic agents. To evaluate the effect of osmoregulators, nodal segments were inoculated in test tubes containing 25 ml of MS medium supplemented with myo-inositol (100 mg L⁻¹), Agar (7.5 g L⁻¹) and combinations of sucrose (0 or 30 g L⁻¹), mannitol (0, 20 or 40 g L⁻¹) and sorbitol (0, 20 or 40 g L⁻¹), where they remained for 180 days. In the recovery phase of growth, the explants cultured in vitro in the previous experiment were inoculated in pre-defined for the species MS, and the viability of cultures evaluated at 30 days. The mean percentage of survival in the trial of slow growth, obtained in medium supplemented with 30 gL⁻¹ sucrose combined with 20 g L⁻¹ mannitol + 20 g L⁻¹ sorbitol (90%) and 30 gL⁻¹ sucrose combined with 40 g L⁻¹ mannitol + 20 g L⁻¹ sorbitol (90%) did not differ and were significantly superior to other treatments. The shoot length and root length were higher in treatments with 30 gL⁻¹ sucrose + 40 g L⁻¹ sorbitol. In the recovery phase the higher number of seedlings obtained which originated the explants in vitro conservation treatment contained 30 g L⁻¹ sucrose + 20 gL⁻¹ 20 gL⁻¹mannitol + sorbitol added first, indicating that it is feasible to maintaining *Solanum tuberosum* L. cv 'Macaca' under conditions of slow growth for a period of 180 days.

Keywords: Biotecnology, *Solanum tuberosum*, potato, in vitro growth, osmoregulators, conservation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Banco de Germoplasma de *Solanum Tuberosum L.* da Embrapa
Clima Temperado 4

Figura 2 - Plântulas de batata cv Macaca cultivadas *in vitro* em meio nutritivo.
..... 14

Figura 3 - Comprimento das raízes de explantes de Batata cv. Macaca
submetidos a condições de crescimento lento, com adição de
osmorreguladores ao meio de cultura no período de seis meses *in vitro*. 15

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Combinações osmorreguladores acrescentadas ao meio MS para controle do crescimento de seguimentos nodais de batata cultivados *in vitro*. 11

Tabela 2 – Comprimento do brotos (mmCB) de explantes de Batata cv. Macaca submetidos a condições de crescimento lento, com adição de osmorreguladores ao meio de cultura, após o período de seis meses *in vitro*.. 14

Tabela 3 – Porcentagem de sobrevivência (%S) dos explantes de Batata 'Macaca' submetidos a condição de crescimento lento *in vitro* durante o período de 6 meses 17

Tabela 4 – Número de mudas obtidas dos explantes de Batata 'Macaca' submetidos a condição de crescimento lento *in vitro* durante o período de 6 meses 19

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	2
3. OBJETIVOS	9
4. MATERIAIS E MÉTODOS	10
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	13
6. CONCLUSÃO	20
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	21

1. INTRODUÇÃO

A Batata (*Solanum tuberosum* L.) é uma das hortaliças mais consumidas mundialmente, originária da região andina, a espécie teve seu cultivo difundido pelo mundo por colonizadores portugueses. Problemas de produção e o aumento do consumo tornaram relevante e necessária a busca de métodos mais eficientes para a propagação vegetativa da espécie, tendo como importante ferramenta as técnicas de cultura de tecidos. Dentre as aplicações do cultivo *in vitro* para essa espécie, destacam-se a seleção *in vitro* buscando o genético, a produção de mudas sadias e a clonagem.

Corroborando as ações acima descritas, a criação de bancos de germoplasmas *in vitro* oferece necessário suporte aos programas de melhoramento genético vegetal, permitindo a conservação e o intercâmbio de germoplasma sadio, de forma rápida e segura.

O presente trabalho de conclusão do Curso de Bacharelado em Biotecnologia apresenta uma técnica para conservação de germoplasma *in vitro* de Batata cv. 'Macaca', com a adição de agentes osmorreguladores (manitol, sorbitol e sacarose) no meio de cultura, técnica com baixo custo, podendo ser uma alternativa ao uso de baixas temperaturas.

Inicialmente, é apresentada uma revisão de literatura abordando características da espécie e da técnica de crescimento lento. Após apresentação desta revisão, é apresentado o experimento realizado, bem como sua metodologia e resultados obtidos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A cultura da batata

A batata pertence à família Solanácea, gênero *Solanum*. Nativa da América do Sul é uma das principais culturas produzidas mundialmente. Os seus tubérculos são uma fonte alimentar global importante de amido, proteína, vitaminas e antioxidantes (BURLINGAME, 2009).

Mundialmente são produzidos aproximadamente 332.332.511 toneladas de batata anualmente. Segundo a Food and Agriculture Organization (FAO), a China é o país com maior produção, onde foram produzidas 57.059.652 toneladas no ano de 2008.

No Brasil, espécie é a mais plantada (NAKANO et al., 2006), em torno de 127.266 hectares, produzindo aproximadamente 3.496.166 toneladas, com rendimento de 27.585 Kg/Há, sendo os maiores produtores as regiões Sudeste e Sul (IBGE, 2013). A variedade mais produzida é a Ágata, caracterizada por sua alta produtividade (SCHEIDT et al., 2009).

Comercialmente, a propagação da batata é feita a partir de tubérculos-semente. No entanto, a utilização do material propagativo por repetidos ciclos pode causar acúmulo de doenças, especialmente as viróticas, provocando uma degenerescência na cultura com prejuízos diretos sobre a produtividade (Fortes & Pereira, 2003).

Atualmente é tecnicamente possível e economicamente viável para propagar a espécie através de técnicas de cultura de tecidos de plantas produzindo mudas com sanidade superior.

2.2 Conservações de Germoplasma

A conservação *in vitro*, sendo uma das aplicações da cultura de tecidos, funciona como alternativa complementar aos métodos convencionais para manutenção de bancos de germoplasma.

As formas de conservação existentes podem ser: denominadas *in situ*, onde o recurso genético é mantido em sua condição natural como reservas e parques florestais (SCARIOT & SEVILLA, 2007), ou, *ex situ*, sob forma de coleções e bancos de germoplasma que podem ser realizadas a partir de diferentes estratégias e metodologias (WALTER et al., 2007). As implicações da conservação *in situ* e a dificuldade em algumas espécies, faz com que haja a busca por uma maneira eficiente e acessível de conservar o material *ex situ*.

Existem diferentes modelos para conservação de germoplasma vegetal e a opção depende de uma série de fatores inerentes a espécie, recursos humanos e de estrutura disponíveis e também dos objetivos. Bancos de sementes ortodoxas, conservação *on farm*, coleções a campo, *in vitro* ou criobancos possuem especificidades que devem ser consideradas quando se deseja decidir como será conservado o germoplasma de uma determinada espécie (MACIA, 2011).

A conservação *ex situ* de germoplasma através de técnicas *in vitro* é uma alternativa complementar aos métodos convencionais para manutenção de bancos de germoplasma e apresenta diversas vantagens sobre o processo de conservação de germoplasma a campo, dentre elas estão: a manutenção dos genótipos em condições assépticas, a redução nos custos e mão-de-obra, a otimização do espaço físico, além da facilidade de intercâmbio do material vegetal (ENGELMANN, 2011).

Em geral, há duas maneiras de conservar plantas *in vitro*, através da criopreservação e do crescimento lento. Na criopreservação, há uma pausa completa do crescimento, pois as plantas são conservadas em temperaturas ultra-baixas. Já no método crescimento lento, as plantas são submetidas a condições que reduzem o metabolismo, e conseqüentemente o crescimento, aumentando assim o intervalo entre os subcultivos, o que leva a uma redução da mão de obra, do espaço e custos para a manutenção das plantas (SCHERWINSKI & PEREIRA, 2010).

Existem em todo mundo diversos bancos de germoplasma de batata com a finalidade de preservar a diversidade existente. Segundo Bai et al.

(2011) atualmente o Centro Internacional de Batata (CIP) com sede em Lima no Peru têm cerca de 2000 genótipos selvagens e 4000 acessos de batata cultivadas. No Brasil, a Embrapa Clima Temperado, em conjunto com a Embrapa Hortaliças e a Embrapa Transferência de Tecnologia, possuem um Banco ativo de germoplasma (Figura 1) em que constantemente são acrescentados novos acessos.



Figura 1 - Banco de Germoplasma de *Solanum Tuberosum L.* da Embrapa Clima Temperado. Foto: Daiane Peixoto Vargas, 2012.

O germoplasma de *S. tuberosum* conservado no Banco é constituído por cultivares nacionais e estrangeiras e por clones avançados, selecionados em função da adaptação às regiões subtropical e tropical do Brasil. Os acessos de batata silvestre do Banco de germoplasma, mantidos na Embrapa Clima Temperado, são em geral oriundos de coletas no Sul do Brasil.

Este germoplasma, habitando e evoluindo na região de exploração comercial da espécie cultivada, é fonte de genes de resistência a estresses bióticos e abióticos, os quais não são encontradas no pool gênico da batata cultivada. Contudo, a conservação *in vitro* tem sido aplicada como alternativa recente para auxiliar a manutenção e controle fitossanitário dos genótipos em conservação.

De acordo com Gopal et al., (2002), o uso de baixas temperaturas (6-8 °C) e 16 h de fotoperíodo, com 15-30 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de intensidade luminosa,

obtida por lâmpadas fluorescentes, é quase universal nos bancos para a conservação de batata. Porém, manter as plantas nessa temperatura em regiões quentes requer uma alta demanda de energia, o que gera um elevado custo. Além disso, esse estresse osmótico pela baixa temperatura pode levar a excessivas anormalidades fenotípicas (vitricificação, senescência, etc.) em microplantas de batata armazenadas por um longo período (LOPEZ-DELGADO et al., 1998).

2.3 Cultivo *in vitro*

As técnicas de cultura de tecidos vem sendo empregadas rotineiramente em várias espécies vegetais. Estas, possibilitam a obtenção de milhares de plantas com tempo e espaço reduzido, além de garantir a uniformidade genética do material. Essas técnicas têm sido utilizadas na cultura da batata (Figura 2) para produção de materiais isentos de patógenos (fungos, bactérias e vírus), os quais são responsáveis pela degenerescência da espécie, reduzindo o seu potencial produtivo (FORTES e PEREIRA, 2003).



Figura 2. Plântulas de batata cv Macaca cultivadas *in vitro* em meio nutritivo. Foto: Paulo Luiz Lanzetta Aguiar, 2012.

Para eficiente limpeza sanitária e principalmente viral das cultivares *in vitro* é necessária a extração de meristema a partir de gemas axilares. Em geral, logo após o estabelecimento, os primeiros clones da cultivar de interesse são enviados para análise viral através do teste Elisa que garante a ausência

do vírus para a continuidade da micropropagação. Atualmente, a produção de matrizes, a partir de meristemas e embriões isolados, em conjunto com o uso de cultivares resistentes, é a forma mais efetiva de minimizar danos causados pelas viroses (DUTRA, 2010).

A micropropagação *in vitro* é reconhecida por ser uma técnica útil para produção, em larga escala, de plantas com elevada qualidade e uniformidade. Através do desenvolvimento de protocolos específicos torna-se possível o cultivo de espécies vulneráveis para comercialização ou para repovoamento (AMO *et al.* 2009).

O cultivo *in vitro* também tem sido utilizado para formação de bancos e/ou intercâmbio de germoplasma, produção de sementes sintéticas, microenxertia, estudo de biologia vegetal, além de outras inúmeras aplicações.

2.4 Crescimento Lento

A técnica de crescimento lento propõe a preservação do material biológico *in vitro* a partir de mudanças no ambiente de cultivo, desacelerando ou suprimindo totalmente o crescimento do explantes iniciais (células isoladas ou órgãos como folha, gemas, e ainda plântulas integras). Para alcançar a redução do metabolismo das plantas, utilizam-se modificações nas condições físicas (redução da luminosidade e da temperatura ideal de crescimento) ou químicas na formulação do meio de cultivo (nutrientes orgânicos e inorgânicos, reguladores osmóticos ou inibidores de crescimento) (WITHERS & WILLIAMS, 1998; DAMASCO, 2002).

Dentre as ferramentas atuais, a técnica de crescimento lento ou crescimento mínimo *in vitro* é considerada extremamente importante ao proporcionar segurança na preservação dos genótipos existentes mantidos em condições assépticas (BAI *et al.*, 2011; PRUSKI *et al.*, 2000).

Os genótipos de batata quando cultivados em condições ideais *in vitro*, ou seja, em meio MS contendo 30 g L⁻¹ de sacarose em fotoperíodo de 16 h a 22-25 °C requerem subcultivo em períodos de quatro semanas, o que acarreta

em elevado custo para a manutenção de clones de interesse. A fim de reduzir a frequência destes cultivos, e restringir o crescimento dos explantes, atualmente emprega-se os chamados retardantes de crescimento ou reguladores osmóticos, que em combinação com uma fonte de energia reduzida, baixa temperatura e intensidade de luz pode ampliar o período de permanência do material *in vitro* por até um ano variando de acordo com as características dos genótipos (Gopal et. al., 2002; Westcott, 1981).

Segundo Golmirzaie & Toledo (1998), a técnica de crescimento lento é a mais vantajosa para a espécie, pois tem menor custo do que a aplicação dos protocolos de criopreservação.

2.3 Reguladores osmóticos

Os reguladores osmóticos são substâncias que atuam sobre o crescimento, reduzindo o potencial hídrico do meio de cultura e conseqüentemente inibindo a absorção de água e nutrientes pelo explante. As substâncias frequentemente usadas como osmorreguladoras são: sacarose, manitol e o sorbitol (LEDO, 2007).

A sacarose é a fonte de carbono mais utilizada nos protocolos de cultivo *in vitro*, sendo considerada a melhor fonte para a diferenciação celular e o desenvolvimento das microplantas (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998). Sua concentração também é um fator determinante no crescimento e é dependente do tipo de explante. Estudos comprovaram que 75 a 85% do aumento da biomassa se deve à incorporação de carbono pela adição de sacarose (CALDAS et al., 1990).

O manitol e o sorbitol são substâncias consideradas mais efetivas do que a sacarose na redução de crescimento, devido a sua mais difícil metabolização (GOPAL et. al., 2002).

O sorbitol usualmente não é metabolizado pelas plantas, e sua atuação freqüentemente está relacionada em modificar o potencial osmótico do meio de cultura (GEORG et. al., 1993)

O manitol é utilizado com bastante frequência na conservação *in vitro* por apresentar um efeito retardante no crescimento e desenvolvimento de um grande número de espécies. Normalmente, este carboidrato é adicionado ao meio, para reduzir-lhe o potencial hídrico (FORTES e PEREIRA, 2001).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o uso de reguladores osmóticos no meio de cultura para conservação de germoplasma de batata 'Macaca' em temperatura normal de cultivo.

3.2 Objetivos Específicos

Avaliar o efeito do meio de cultivo acrescido de manitol, sorbitol e/ou sacarose como osmorreguladores para o controle do crescimento in vitro .

Determinar um protocolo eficiente de conservação a temperatura normal de cultivo.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Efeito de sacarose, manitol e sorbitol na conservação *in vitro* de batata.

Os estudos foram desenvolvidos no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas da Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS.

Segmentos nodais de aproximadamente 1,5 cm, oriundos de plantas de Batata mantidas *in vitro*, foram inoculados em tubos de ensaio (35 x 127 mm) com tampa plástica contendo 25 mL de meio MS (Murashige & Skoog, 1962), acrescido de mio-inositol (100 mg L^{-1}), ágar ($7,5 \text{ g L}^{-1}$) e combinações entre sacarose (0 ou 30 g L^{-1}), manitol (0, 20 ou 40 g L^{-1}) e sorbitol (0, 20 ou 40 g L^{-1}) e pH ajustado em $5,8 \pm 0,1$, antes da autoclavagem.

O estudo 1 foi conduzido em delineamento experimental inteiramente casualizado, fatorial 2 (sacarose) x 3 (manitol) x 3 (sorbitol), totalizando 18 tratamentos com dez repetições, sendo cada repetição constituída por um tubo de ensaio com um explante (Tabela 1).

Tabela 1 – Combinações osmorreguladores acrescentadas ao meio MS para controle do crescimento de seguimentos nodais de batata ‘Macaca’ cultivados *in vitro*.

Tratamento	Sacarose (g.L ⁻¹)	Manitol (g.L ⁻¹)	Sorbitol (g.L ⁻¹)
1	0	0	0
2	30	0	0
3	30	20	0
4	0	20	0
5	30	0	20
6	0	0	20
7	30	40	0
8	0	40	0
9	30	0	40
10	0	0	40
11	0	20	20
12	0	40	40
13	0	20	40
14	0	40	20
15	30	20	20
16	30	40	40
17	30	20	40
18	30	40	20

Tabela baseada no estudo de GOPAL et. al., 2002.

Todos explantes dos tratamentos foram mantidos na sala de crescimento em condições padrão de cultivo: temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 16h com intensidade luminosa de $45 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

As avaliações foram realizadas 180 dias após a inoculação, tendo sido analisadas as variáveis sobrevivência (S, em número), comprimento dos brotos (CB, em cm) e comprimento das raízes (CR em cm).

Os dados foram transformados em \sqrt{x} e submetidos a análise de variância e, quando significativo, as médias foram submetidas ao teste de Tukey a 5% de probabilidade. Utilizou-se o software Statistix 8.0.

4.2 Retomada do crescimento dos explantes provenientes de meio com reguladores osmóticos.

Segmentos nodais com brotações adventícias de Batata conservados *in vitro* por 180 dias, em meio de cultura MS com diferentes combinações de sacarose (0 ou 30 g L⁻¹), manitol (0, 20 ou 40 g L⁻¹) e sorbitol (0, 20 ou 40 g L⁻¹), foram transferidos para meio de crescimento. Os explantes foram assepticamente inoculados em frascos contendo 30 mL de meio MS suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, 100 mg L⁻¹ de mioinositol e geleificado com 7 g L⁻¹ de ágar.

A avaliação foi realizada após 30 dias da inoculação, sendo analisado o número de mudas viáveis (NMV) produzidas em cada tratamento.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Efeito de sacarose, manitol e sorbitol na conservação *in vitro* de batata.

De acordo com os resultados obtidos indicam que é fundamental adequar as concentrações de substâncias com potencial osmorregulador a fim de promover o crescimento lento e possibilitar a recuperação de explantes após o período de conservação *in vitro* proposto. Houve diferença significativa nos tratamentos suplementados com combinação de sacarose com sorbitol ou manitol, quando comparado o comprimento das brotações.

O meio sem sacarose, contendo elevadas concentrações de manitol e sorbitol não promoveu o crescimento e desenvolvimento dos explantes (0 mm. T12), enquanto que, explantes mantidos em meio acrescido de 30 g.L⁻¹ de sacarose e 40 g.L⁻¹ de sorbitol apresentaram um maior comprimento (105, mm; T9) (Tabela 2), evidenciando que a produção *in vitro* de brotos de batata seja fortemente influenciada pelo estresse osmótico causado pela adição de osmorreguladores ao meio de cultura. Além disso, foi observado que todos os tratamentos com menor comprimento dos brotos, não apresentavam sacarose na composição do meio de cultura (T12, T13, T14).

Tabela 2 – Comprimento do brotos (mmCB) de explantes de Batata cv. Macaca submetidos a condições de crescimento lento, com adição de osmorreguladores ao meio de cultura, após o período de seis meses *in vitro*. P<0.05 CV= 50,26

--- Tratamento ---	--- CB (mm) ---
1	30,94 ab
2	29,32 ab
3	83,58 ab
4	81,26 ab
5	39,76 ab
6	83,45 ab
7	64,11 ab
8	35,78 ab
9	105,77 a
10	55,64 ab
11	80,11 ab
12	0 b
13	22,34 ab
14	11,06 ab
15	64,48 ab
16	40,50 ab
17	61,21 ab
18	63,42 ab

Médias seguidas de letras iguais, não diferiram significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

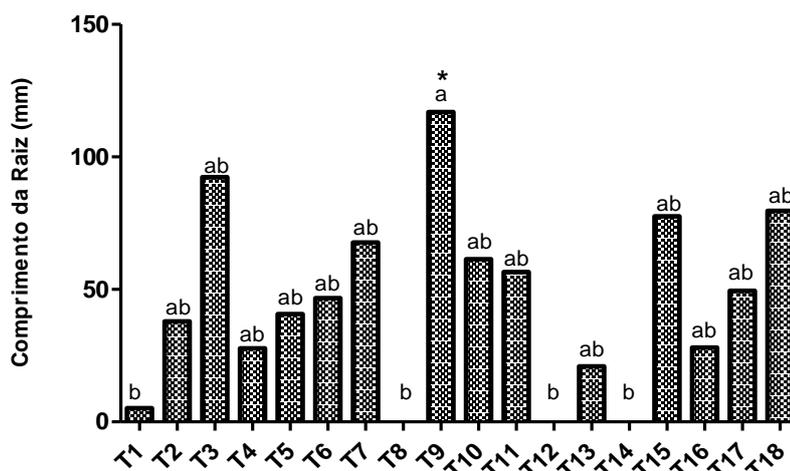
Respostas semelhantes foram obtidas com *Passiflora giberti* N. E. Brown, Faria et al. (2006) observaram maior crescimento *in vitro* na presença de sacarose e sorbitol.

Os genótipos de batata quando cultivados *in vitro* em condições ideais, em meio MS contendo 30 g L⁻¹ de sacarose e em temperatura de 22-25 °C requerem subcultivos em períodos de quatro semanas, o que acarreta em elevado custo para a manutenção de clones de interesse.

Observou-se que é viável reduzir o crescimento desses explante e logo, a frequência destes cultivos, empregando-se os chamados retardantes de crescimento ou reguladores osmóticos. Vários autores salientam ainda que a combinação do controle osmótico do meio com uma fonte de energia reduzida, baixa temperatura e intensidade de luz pode ampliar o período de permanência do material *in vitro* por até um ano variando de acordo com as características dos genótipos (GOPAL et. al., 2002; WESTCOTT, 1981).

O sorbitol e o manitol são açúcares alcoóis que geralmente não são metabolizados pelas plantas e por isso, são empregados para a redução do potencial hídrico do meio de cultura na conservação *in vitro* (GEORGE, 1993). Para batata, a combinação de manitol e sorbitol mostraram-se eficiente na redução do crescimento das plantas.

Para o comprimento da raiz, o tratamento sem osmorreguladores (T1) e os tratamentos com 40 g.L⁻¹ de manitol (T8) , 40 g.L⁻¹ de manitol + 40 g.L⁻¹ de sorbitol (T12) e 20 g.L⁻¹ de manitol +20 g.L⁻¹ de sorbitol (T14), não diferiram entre si, sendo os comprimentos significativamente inferiores aos demais tratamentos. As plantas mantidas em meio com 30 g.L⁻¹ de sacarose e 40 g.L⁻¹ de sorbitol (T9) apresentaram maior valor para esta variável, que diferiu significativamente dos demais tratamentos (Figura 3)



Médias seguidas de letras iguais, não diferiram significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

Figura 3 - Comprimento das raízes de explantes de Batata cv. Macaca submetidos a condições de crescimento lento, com adição de osmorreguladores ao meio de cultura no período de seis meses *in vitro*. CV= 63,79 * $P < 0.05$

O desenvolvimento *in vitro* de um sistema radicular funcional de com superfície de absorção compatível com a parte aérea é fundamental para a recuperação das plantas após o período proposto de conservação.

Em estudo com cana-de-açúcar, (LEMOS et al. 2002), relatam que o efeito positivo da utilização de sacarose como fonte de carbono e regulador osmótico na manutenção da viabilidade dos explantes conservados *in vitro*.

Ao final dos 180 dias de cultivo, as médias para porcentagem de sobrevivência obtida em meio suplementado com 30 g.L⁻¹ de sacarose combinada com 20 g.L⁻¹ de manitol + 20 g.L⁻¹ de sorbitol (90%. T15) e de 30 g.L⁻¹ de sacarose combinada com 40 g.L⁻¹ de manitol + 20 g.L⁻¹ de sorbitol (90%, T18) não diferiram entre si, sendo significativamente superiores aos demais tratamentos (Tabela 3), o que demonstra que a combinação dos três reguladores foi positiva para variável analisada. Reforçando a importância da presença de uma fonte de carbono metabolizável.

Explantes cultivados no tratamento 12 contendo elevada concentração de osmorreguladores não metabolizáveis e sem a fonte de carbono utilizável (sacarose) não sobreviveram (Tabela 3). Possivelmente, além da redução da água disponível poder ter havido toxicidade e falta de energia já que *in vitro* a fixação através da fotossíntese é insuficiente para manter o crescimento e desenvolvimento.

Tabela 3 - Porcentagem de sobrevivência (%S) dos explantes de Batata 'Macaca' submetidos a condição de crescimento lento *in vitro* durante o período de 6 meses. CV= 90,34 * $P < 0.05$

--- Tratamento ---	----- S (%) -----
1	10 c
2	10 c
3	80 ab
4	40 abc
5	20 bc
6	50 abc
7	80 ab
8	70 abc
9	50 abc
10	50 abc
11	60 abc
12	10 c
13	30 abc
14	30 abc
15	90 a*
16	30 abc
17	80 ab
18	90 a*

Médias seguidas de letras iguais, não diferiram significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

Efeitos tóxicos devido a altas concentrações de reguladores osmóticos foram relatados por Lédo et al. (2007) e Sá et al.(2011) em coqueiro e mangabeira, respectivamente. O sorbitol é um açúcar álcool que geralmente não é metabolizado pelas plantas e sua ação está relacionada com a modificação do potencial osmótico do meio, removendo o excesso de água intracelular, por gradiente osmótico e assim desacelerando o crescimento vegetal, mas dependendo da concentração ou da espécie em estudo o sorbitol pode ter efeito nocivo (SHIBLI et al., 2006).

Em estudo com *Solanum tuberosum* L. (GOPAL et al.,2002) as menores taxas de sobrevivência foram observadas em meio suplementado apenas com 20 g.L⁻¹ de sacarose o que difere completamente dos resultados obtidos para a cv Macaca. Em nossos estudos, as menores médias para porcentagem de sobrevivência foram obtidas tanto em meio contendo apenas 30 g.L⁻¹ de sacarose (10%, T2), quanto em meio contendo 20 g.L⁻¹ de manitol + 20 g.L⁻¹ de sorbitol (10%, T12) e em meio sem adição de reguladores osmóticos (10%, T1) (Tabela 3).

Além da sobrevivência e manutenção de níveis modulados de crescimento, o sucesso da conservação através do uso de osmorreguladores para promoção de crescimento lento está baseado na possibilidade de recuperação do maior número de plantas.

5.2 Retomada do crescimento dos explantes provenientes de meio com reguladores osmóticos.

Na retomada do crescimento dos explantes, foi analisado o número de mudas obtidas (NMO), e o maior número de mudas viáveis, após 180 dias de tratamento osmótico e 30 dias de recuperação foi obtido no tratamento com 30 g.L⁻¹ de sacarose combinada com 20 g.L⁻¹ de manitol + 40 g.L⁻¹ de sorbitol (93 mudas; T17) (Tabela 4), tratamento que também apresentou uma alta taxa de sobrevivência (Tabela 3).

Tabela 4 – Número de mudas viáveis obtidas dos explantes de Batata ‘Macaca’ submetidos a condição de crescimento lento *in vitro* durante o período de 6 meses.

---- Tratamento ----	----- NMO -----	----- NMV -----
1	4	3
2	48	30
3	30	12
4	78	54
5	1	0
6	70	69
7	0	0
8	63	46
9	0	0
10	25	13
11	24	20
12	0	0
13	24	21
14	4	3
15	52	52
16	60	52
17	106	93
18	49	48

Os reguladores osmóticos têm sido bastante usados na conservação *in vitro*, devido a sua capacidade controlar o potencial osmótico do meio. Esse efeito, entretanto, ainda que reduza o metabolismo das plantas conservadas devido ao déficit hídrico, pode causar um estresse elevado, podendo comprometer a integridade das plantas conservadas. Tendo em vista este problema, é necessário o ajuste de uma concentração ideal, considerando a manutenção da capacidade regenerativa das plantas (MACIA, 2011).

6 CONCLUSÃO

O maior número de mudas *in vitro* foi obtido com adição de 30 g.L⁻¹ de sacarose, 20 g.L⁻¹ de manitol e 40 g.L⁻¹ de sorbitol em meio de cultura, onde também foi observada uma alta taxa de sobrevivência dos explantes.

Sendo assim, é viável a manutenção de *Solanum tuberosum* L. cv 'Macaca' em condições de crescimento lento pelo período de 180 dias.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

AMO, S.O.; FINNIE J.F.; VAN STANDEN, J. In vitro propagation of *Huernia hystrix*: an endangered medicinal and ornamental succulent. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, n. 96 p.273-278, 2009.

BURLINGAME, B.; MOUILLÉ, B.; CHARRONDIÉRE, R. Nutrients, bioactive non-nutrients and anti-nutrients in potatoes. *J. Food Compost.* N. 22, p. 494–502, 2009.

CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: Embrapa. 1998. p.87-132.

DUTRA, L. F.; MAYER, K.C.; SILVA, N.G.; NINO, A.P.; SILVA, F.O.; VIEIRA, F.C. *Protocolos de micropropagação de plantas: batata*. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2010. 24p.

ENGELMANN, F. Use of biotechnologies for the conservation on plant biodiversity. *In vitro Cellular and Developmental Biology – Plant.* v. 47 p. 5-16, 2011.

FORTES, G. R. L.; PEREIRA, J. E. S. Preservação in vitro de batata com ácido acetilsalicílico e duas fontes de carboidrato. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.36, n.10, p.1261-1264, 2001.

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

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSOJ.A. (Ed). *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: SPI/Embrapa- CNPH, 1998. v.1, p. 138-260.

GEORGE, F.E. The components of culture media. In: GEORGE, F. E.(Ed). *Plant propagation by tissue culture*. London: Exegetics, 1993. p.273-343

GOLMIRZAI, A.; TOLEDO, J. *In vitro* conservation of potato and sweet potato germplasm. In: ARTHUR, C.; FERGUNSON, P.; SMITH, B. (Ed.). Impact on a changing world: program report 1997-1998. Lima: International Potato Center, 1999. p. 351-356.

GOPAL J, CHAMAIL A, SARKAR D. Slow-growth *in-vitro* conservation of potato germplasm at normal propagation temperature. Potato Research, v. 45 p.203–213, 2002.

GOPAL, J.; CHAMAIL, A.;SARKAR. D. Use of microtubers for slow-growth *in vitro* conservation of potato germplasm. PGR Newsletter Bioversity FAO. nº.141, p. 56-60, 2011.

LÉDO, A.S. et al. Efeito da sacarose e do manitol na conservação *in vitro* por crescimento lento de coqueiro anão. Magistra, v.19, n.4, p.346-351, 2007.

LEMOS, E.E.P. et al. Conservação *in vitro* de germoplasma de cana-de-açúcar. Pesquisa Agropecuária Brasileiro, v.37, n.10, p.1359-1364, 2002.

LILJANA, G.K.; MITREV, S.; FIDANKA, T.; MITE, I. Micropropagation of Potato *Solanum tuberosum* L. Electronic Journal of Biology, v. 8, n.3, p.45-49, 2012.

LOPEZ-DELGADO, H.,M.; JIMENEZ-CASAS; I.M.SCOTT.Storage of potato microplants *in vitro* in the presence of acetylsalicyclic acid. Plant Cell, Tissue and Organ Culture .v.54 p.145-152, 1998.

MACIA, R. J., Conservação *in vitro* de cultivares de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). 2011. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, 2011.

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

NAKANO, D. H.; DELEO, J. P. B.; BOTEON, M. Choque de competitividade. Hortifruti Brasil, n. 51, p. 1-16, out. 2006.

PEREIRA, J.E.S.; FORTES, G.R.L. Protocolo para a produção de material propagativo de bata-ta em meio líquido. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v.38, n.9, p.1035-1043, 2003

SÁ, A. J. ; LEDO, A. da S.; LEDO. C. A. da. Conservação in vitro de microestacas de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 41, n. 01, p. 57-62, 2011.

SCARIOT, A.O. SEVILLA, A.C. Conservação in situ de Recursos Genéticos Vegetais. In: NASS, L.L. (ed.). *Recursos Genéticos Vegetais*. Capítulo 14. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Brasília, p.474-509. 2007.

SCHEIDT, MFC; STOETZER, A; BALDIN I; KAWAKAMI, J. Efeito da adubação nitrogenada em parâmetros morfológicos de plantas de batata cultivar Ágata em Guarapuava. *Horticultura Brasileira* 27: S3228-S3231, 2009.

SHERWINSKI-PEREIRA J.E.; COSTA F.H.S.; CAMILLO J.; SILVA D.B.; ALVES R.B.N.; VIEIRA R.F. Tissue cultures storage of Brazilian medicinal plants germoplasm. *Acta horticulturae*. v. 860, p. 211-241, 2010.

SHIBLI, R. A. et al. In vitro conservation and cryopreservation of plant genetic resources: A review. *World Journal of Agricultural Sciences*, v. 02, n. 04, p. 372-382, 2006.

WALTER, B.M.T.; CAVALVANTI, T.B.; BIANCHETTI, L.B.; VALLS, J.F.M. Coleta de germoplasma: relevância e conceitos básicos. In: WALTER, B.M.T.; CAVALCANTI, T.B. (Ed.). *Fundamentos para a coleta de germoplasma vegetal*. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. p.27- 42, 2007.

WESTCOTT RJ. Tissue culture storage of potato germplasm. Minimal growth storage. *Potato Research*, v. 24, p.331–342. 1981.

WITHERS, L.A; WILLIAMS, J.T. Conservação in vitro de Recursos Genéticos de Plantas. In: TORRES et al. [ed.]. *Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas*. Brasília : EMBRAPA. vol 1, p.297-330, 1998.