DJALMA MIRANDA CARVALHO TEIXEIRA

INFLUÊNCIA DO N, SACAROSE, BAP E IDADE DA PLÂNTULA SOBRE A MINITUBERIZAÇÃO DE BATATA (*Solanum tuberosum* L. cv Bintje) *in vitro*

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura de Lavras, como parte das exigências do Curso de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração Fitotecnia, para obtenção do grau de MESTRE.

ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA DE LAVRAS

LAVRAS - MINAS GERAIS

1989

DJALMA MIRANDA CARVALHO TEIXEIRA

INFLUÊNCIA DO N, SACAROSE, BAP E IDADE DA PLÂNTULA SOBRE A MINITUBERIZAÇÃO DE BATATA (*Solanum tuberosum* L. cv Bintje) *in vitro*

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura de Lavras, como parte das exigências do Curso de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração Fitotecnia, para obtenção do grau de MESTRE.

ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA DE LAVRAS

LAVRAS - MINAS GERAIS

1989

INFLUÊNCIA DO N, SACAROSE, BAP E IDADE DA PLÂNTULA SOBRE A MINITUBERIZAÇÃO DE BATATA (*S. tuberosum* L. cv BINTJE) *IN VITRO*

APROVADA:

Prof. José Eduardo Brasil Pereira Pinto

Prof. Moacir Pasqual

Prof. César Augusto Brasil Pereira Pinto

Prof. Amauri Alves de Alvarenga

À memória de minha avó,

Julieta

HOMENAGEM

À meu pai Djalma,

à minha mãe Zaury,

à minhas irmãs Eliane e Heloisa,

a meu cunhado José Roberto,

a meus sobrinhos Cassiano, Breno e Eric,

pelo incentivo e carinho,

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Às seguintes instituições, pela oportunidade do curso e facilidades no desenvolvimento do trabalho de tese:

. Escola Superior de Agricultura de Lavras (ESAL)

. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária(EMBRAPA)

. Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

. Laboratório de Cultura de Tecidos da ESAL

. Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Extensão - (FAEPE)

. Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

. Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP).

À amizade, incentivo e colaboração de:

. Ph.D. José Eduardo Brasil Pereira Pinto

. Dr. Moacir Pasqual

. Ph.D. César Augusto Brasil Pereira Pinto

. Dr. Amauri Alves de Alvarenga

. Ph.D. Marcos Paiva

. Ph.D. José da Cruz Machado

. M.S. Edson Rodrigues da Rocha

. Srta. Giane Vilela Lima

. Lab. Evaldo de Souza Arantes

. Lab. Vantuil Antônio Rodrigues

. Ana Maria Brasil Pereira Santana (TECLA - Serviços Datilográficos)

. M.S. Renato Paiva

. Acad. Grad. Clóvis M. de Souza.

À todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA DO AUTOR

DJALMA MIRANDA CARVALHO TEIXEIRA, nasceu em Recife, Pernambuco, filho de Djalma C. Teixeira e Zaury Miranda Teixeira.

Graduou-se em Agronomia pela Escola Superior de Agri - cultura de Lavras-MG, em dezembro de 1983.

Em fevereiro de 1985 iniciou o curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração Fitotecnia, na Escola Superior de Agricultura de Lavras - Minas Gerais, concluindo-o em dezembro de 1988.

Em fevereiro de 1988 ingressou na Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuárias.

SUMÁRIO

Página

LISTA DE QUADROS

LISTA DE FIGURAS

Figuras Página

1. INTRODUÇÃO

O Brasil sempre dependeu da importação de batata-semente oriunda da Europa, com tubérculos apresentando uma alta sanidade. Dentre as cultivares européias importadas sobressai-se a Bintje, tanto pela área cultivada, quanto pela grande aceitação comercial do tubérculo (39).

Os tubérculos estão sujeitos a uma série de enfermidades, que vão reagravando com as sucessivas gerações de propagação vegetativa. Ao acúmulo de doenças viróticas está associada uma rápida degenerescência da batata-semente, tanto de cultivares importadas quanto de cultivares nacionais, logo após as primeiras multiplicações, em campo de produção, DIAS & COSTA (4).

Com a utilização das técnicas de cultura de tecidos em batata abriu-se a possibilidade de uma rápida multiplicação de tubérculos com alta qualidade sanitária, além da preservação e intercâmbio mais eficaz de germoplasma. Atualmente a propagação *in vitro* da batata pelo cultivo de segmentos nodais, está bem estabelecida como um método de multiplicar rapidamente cultivares novos ou já existentes em condições livres de patógenos.

A utilização de minitubérculos pode ser uma alternativa eficaz na micropropagação pois são mais convenientes para armazenamento, podendo ser guardados num menor espaço, e por maior tempo de que as plântulas em tubos de ensaio. Também não necessitam aclimatação prévia, economizando mão-de-obra e espaço de locais apropriados (casa de vegetação). Podem ser produzidos em grande quantidade, independente da estação ou demanda e podem ser transportados em maiores quantidades por caixa, que os tubérculos normais para batata-semente, barateando os custos com transporte. E por último, podem ser adaptados de alguma forma para o plantio em larga escala.

A formação de minitubérculos *in vitro* também fornece um ótimo sistema para estudos relacionados à tuberização. Por estes motivos, a ênfase para obtenção de minitubérculos sadios *in vitro* aumentou consideravelmente nos últimos anos, tanto por parte de instituições de pesquisa quanto por firmas particulares de biotecnologia em vários países, tornando-se um dos eixos centrais das pesquisas em tuberização, conservação de germoplasma e de produção de batata-semente.

Objetivou-se com o presente trabalho verificar a influência do nitrogênio, da sacarose, da 6-Benzilaminopurina (BAP) e da idade da plântula na tuberização de batata cv Bintje.

2. REVISÃO DE LITERATURA

O controle de insetos vetores é extremamente difícil em países tropicais e subtropicais, o que faz com que os métodos comerciais de produção de batata semente certificada apresentem falhas para a produção de material com boa sanidade, WANG & HU (54).

VAN UYEN (51) cita o reerguimento da bataticultura, no Vietnam, a partir do uso da técnica de cultura de meristema para a limpeza de patógenos em cultivares européias bastante degeneradas. A técnica foi simplificada, e através de produtores satélites são produzidas e distribuídas mudas com alta sanidade.

Conforme HU & WANG (17), Morel foi o pioneiro na aplicação da cultura de meristemas na propagação clonal, e Murashige foi quem introduziu o conceito de estágios de desenvolvimento. O estágio I corresponde ao estabelecimento do explante; o II, à multiplicação do propágulo; e o III, ao enraizamento e aclimatação da planta no solo. Para a batata, o protocolo para os estágios I e II já está bem definido e pode com algumas variações ser encontrado em vários trabalhos (13, 17, 18, 19, 26, 27, 40, 54). Seguindo a técnica multimeristemática de ROCA et alii (41), que permite a pro

dução de múltiplos brotos oriundos de um simples meristema via organogênese, o estágio II funde-se com o III, não havendo necessidade de transferência do material para outros meios de cultura para enraizamento, e as plântulas estarão formadas em 2-3 semanas.

2.1. Fatores que afetam a tuberização *in vitro*

Vários fatores estão relacionados com o estímulo para a indução de tubérculos. A tuberização *in situ* em batata, pode ser induzida por dias curtos, alta intensidade luminosa, baixa temperatura noturna, baixo nível de nitrogênio, desbaste, uso de tubérculos fisiologicamente velhos, e aplicação de ácido abscísico (ABA) e de cloreto de 2-cloroetilmetilamonia (CCC), WANG & HU (54). Entretanto, as condições promotoras da tuberização *in vitro* frequentemente não coincidem com as condições *in situ*, WANG & HU (54). Devido ao perigo de superaquecimento dos frascos no caso de uma alta intensidade luminosa, adiciona-se geralmente sacarose ao meio de cultura como fonte de carboidratos, GEORGE & SHERRINGTON (10) e WANG & HU (54).

O meio de cultura básico mais utilizado em trabalhos de tuberização *in vitro* é o de MURASHIGE & SKOOG (32), sendo o material vegetal incubado entre 20 e 25°C em várias condições de luminosidade de acordo com o autor (18, 23, 25, 28, 29, 44).

Resultados contraditórios encontrados em vários trabalhos são devido a vários fatores, tais como: diferenças do tipo do

tecido do explante, das cultivares, das concentrações e qualidade de reguladores de crescimento, dos meios básicos nutritivos, e das condições ambientais de incubação, STALLKNECHT (46) e WANG & HU (54).

2.1.1. Nitrogênio

O nitrogênio (N) é, em geral, o elemento que as plantas necessitam em maior quantidade, estimulando na batata mais o crescimento da parte aérea que a do tubérculo, Moorby & Milthorpe citado por OPARKA (34). Em condições de campo, doses consideradas elevadas de N atrasaram a tuberização, SANTELITH & EWING (43). Segundo Hewitson citado por OPARKA (34), níveis altos de N reduziram a translocação do carbono da folha e aumentaram o seu fluxo para as outras folhas da copa ao invés de dirigi-lo aos tubérculos. Em plantas deficientes de N, o peso seco dos tubérculos foi superior as fertilizadas, dos 80 aos 105 dias aproximadamente após o plantio. Mas à colheita, o peso seco dos tubérculos não diferiu significativamente nos tratamentos, OPARKA (34). Krauss & Marschner citados por KRAUSS (21), demonstraram que o fornecimento de N controla a iniciação do tubérculo e seu crescimento de uma forma precisa. Se aplicada uma quantidade excessiva de N, o tubérculo cessa o crescimento, mas retorna-o assim que a planta é transferida para um meio ausente de N. Neste caso, há formação de mais um tubérculo no estolão, o qual atuará como dreno, enquanto o antigo atuará so-

mente como passagem de fotoassimilados e nutrientes.

Na produção de minitubérculos in vitro induzidos pela cumarina, a melhor resposta foi obtida com um baixo nível de N, STALLKNECHT & FARNSWORTH (47) e WATTIMENA et alii (55). Entretanto na tuberização induzida pela citocinina, um alto nível de N no meio não apresentou efeito inibidor, PALMER & SMITH (36) e WANG & HU (53). Segundo SATTELMACHER & MARSCHNER (44), a interrupção do fornecimento de N leva à tuberização e a um eventual aumento nos níveis de citocininas na parte aérea.

De acordo com KRAUSS (21), o fotoperíodo e a nutrição nitrogenada seriam o gatilho da tuberização através da ação nos níveis dos fitohormônios endógenos. Em plantas cultivadas hidroponicamente, a diminuição de N do meio de cultivo aumentou o nível de ABA com um consequente decréscimo no nível de giberelinas (GA).Com o aumento da razão ABA/GA houve tuberização. Altos níveis de N podem também inibir a atividade de reguladores de crescimento, STALLKNECHT (46).

Segundo a afirmação de Krauss & Marschner citados por KRAUSS (21), o efeito do N é independente da fonte, seja na forma de nitrato ou amônia, isoladamente. O nitrogênio seria assim um fator edáfico envolvido no controle da tuberização.

2.1.2. Sacarose

A idéia aceita anteriormente de que os níveis de car -

boidratos ou a razão C/N controlam a tuberização, foi substituída por aquela que enfoca o papel dos reguladores de crescimento (2, 6, 14, 15). É inegável entretanto, o papel desempenhado pela sacarose na tuberização in vitro. EWING (6), acredita que apesar da necessidade de que ocorram mudanças hormonais para acionar a tuberização, os carboidratos também desempenhariam um papel relevante. E apesar da glicose ou frutose serem mais efetivas na promoção do crescimento vegetativo in vitro, a sacarose é mais eficiente na produção de minitubérculos, EWING (7).

O tubérculo de batata forma-se geralmente na ponta de um estolão. Mas sob condições anômalas como um alto teor de carboidratos, podem desenvolver-se de qualquer gema vegetativa, independentemente de sua localização na planta, WERNER (56).

O início da formação do tubérculo é geralmente acompanhado de um aumento na taxa assimilatória líquida, SALE (42) e DWELLE (5). Em cultivos in vitro, a demanda de carboidratos é feita pela adição de sacarose ao meio, GEORGE & SHERRINGTON (10) e WANG & HU (54). A sacarose é então absorvida pela planta e translocada para os tubérculos onde é utilizada para a síntese de amido, que é o principal carboidrato de reserva dos tubérculos, MARES et alii (24) e PETERSON et alii (38).

2.1.3. Citocininas

Segundo PALMER & SMITH (37), há várias razões porque

as citocininas podem ser importantes para a indução e desenvolvimento dos tubérculos. Entre eles está o seu papel na promoção da divisão celular; as evidências de que inibem a elongação e promovem o aumento celular, e de que possuem um papel na mobilização de fotoassimilados e nutrientes para os drenos. Entretanto, vários autores discordam de um papel indutor das citocininas, creditando-lhes uma ação mais restrita ao desenvolvimento dos tubérculos.

PALMER & SMITH (36) induziram a tuberização em estolões cultivados in vitro pela aplicação de cinetina. Apesar de FORSLINE & LANGILLE (9) terem-na considerada como um fator de tuberização, as citocininas não são atualmente consideradas como responsáveis diretas. Antes, teriam um papel chave na divisão celular criando uma atividade de dreno no tubérculo em desenvolvimento, KRAUSS (21) e TIZIO & BIAIN (49).

JAMESON et alii (20) verificaram que o aumento de citocininas endógenas não esteve associado ao início da tuberização, e que o pico só era atingido após o tubérculo ter alcançado um determinado tamanho. Porém, mesmo baixas concentrações de BAP (2,5 $mg.l^{-1}$) tem sido relatadas como "indutoras" da tuberização, MAUK & LANGILLE (25). Concentrações ótimas para a produção de minitubérculos seriam de 10 $mg.l^{-1}$, ABBOT & BELCHER (1) e WANG & HU (53).

2.1.4. Material vegetal

De acordo com HUSSEY & STACEY (18), plantas senescen-

tes cultivadas in vitro geralmente originavam tubérculos após 3-4 meses, sob condições indutoras. Entretanto, em trabalhos anteriores desenvolvidos no laboratório de Cultura de Tecidos da ESAL, notaram-se que algumas plantas de batata cv Bintje tuberizavam facilmente, mesmo antes de 30 dias de cultivo.

Uma vez que tenha havido estímulo para o início da tuberização, o tubérculo cresce continuadamente de uma forma linear, a não ser que alguma condição desfavorável o impeça, LEOPOLD & KRIEDEMANN (22). Cerca de 75-85% do peso da matéria seca total produzida pela planta acumula-se nos tubérculos, Ivins & Bremner citados por CUTTER (3). Uma vez iniciada a tuberização, o crescimento de toda a planta é retardado e estes tornam-se os meristemas dominantes e os drenos para os nutrientes orgânicos e inorgânicos, MOORBY (30). Segundo este autor, na maioria das situações, o importante é a capacidade fotossintética da planta em suportar o crescimento dos tubérculos após a sua iniciação.

2.2. Multiplicação dos tubérculos

Vários autores, observaram que o transplante de plântulas tenras, vegetativamente, das condições in vitro, na qual todas condições ótimas de sobrevivência estão asseguradas, para o ambiente externo, é trabalhoso, requer local apropriado e ainda pode apresentar uma baixa taxa de pegamento (1, 18, 31, 45, 52, 53, 55). Porisso é crescente o interesse na produção de minitubérculos in

vitro como um método alternativo para a micropropagação da batata (1, 18, 35, 50, 53, 54).

Segundo TOVAR et alii (50), o método de indução da tuberização exerce um papel regulador no controle do seu período de dormência. No Centro Internacional de la Papa (CIP), os tubérculos produzidos no escuro passam por um período médio de repouso de 210 dias. Na tentativa de quebrar esta dormência, EWING et alii (8) propuseram o seu corte pela metade.

De acordo com THORNTON & KNUTSON (48), o tamanho dos tubérculos produzidos a partir de plântulas transplantadas das condições *in vitro* para as de casa-de-vegetação, foi afetado pelo volume do recipiente utilizado, sendo que um maior volume disponível proporcionava a produção de tubérculos com diâmetros maiores. Entretanto, não aumentou o número por planta.

Comparando o crescimento e a produção de duas cultivares de batata, vindas de três diferentes fontes de propagação: tubérculos, plântulas vindas de tubo de ensaio e minitubérculos, WATTIMENA et alii (55) relataram que as plantas oriundas de cultivo *in vitro* produziram tubérculos de menor tamanho, mas em maior quantidade, demonstrando ser uma vantagem para a produção de batata-semente.

As condições de tuberização ainda não estão bem definidas, e segundo ABBOT & BELCHER (1), devido ao comportamento diferencial, existe a necessidade de encontrar-se as melhores condições de tuberização *in vitro* para cada cultivar.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido no laboratório de Cultura de Tecidos da Escola Superior de Agricultura de Lavras, em Lavras, Minas Gerais.

3.1. Caracterização geral

Plântulas de batata cv Bintje obtidas por cultura de meristemas foram utilizadas como material experimental. O meio de cultura utilizado foi o de Murashige & Skoog (M & S) na forma líquida, e preparado com água destilada. Após o ajuste do pH para 5,7 $\pm$ 0,1, foram colocados em frascos tipo geléia de 300 ml, com 10 ml de meio por frasco, vedados com tampas de poliestireno e autoclavados a 121°C e 1,5 atm durante 20 minutos. Quando necessário, a manipulação do material procedeu-se em condições assépticas, em câmara de fluxo laminar com utensílios esterilizados em álcool a 70%.

A partir de plântulas *in vitro* do estoque, foram repicados vários segmentos nodais. Destes, cinco foram colocados por frasco, em meio nutritivo de M & S suplementado com 30 g de sacarose (açúcar cristal) por litro de meio. A temperatura da sala de incubação foi mantida em cerca de 24 ± 2°C, e a luminosidade em torno de 4.000 lux.

Após a fase inicial, um novo meio nutritivo foi adicionado às plântulas. A seguir, foram incubadas em condições ambientais que permitissem a tuberização, na mesma temperatura, porém no escuro.

3.2. Influência do N, sacarose e BAP

Foram utilizadas plântulas de duas semanas de idade, a partir da repicagem. Adicionou-se nos frascos novos meios de cultura às plântulas para a tuberização. Os tratamentos constituíram numa combinação de quatro níveis de nitrogênio (5, 15, 30 e 60 meq), Quadro 2, com três concentrações de sacarose, na ausência ou presença de BAP a 10 $mg.l^{-1}$.

Foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado, num fatorial 4 x 3 x 2, com quatro repetições. Cada frasco contendo de 4-5 brotos foi considerado como parcela experimental. A exceção do meio que conteve 60 meq de N elaborado como proposto por MURASHIGE & SKOOG (32), os demais foram preparados com base na combinação de macronutrientes e balanço iônico de Margara revisto por

GEORGE & SHERRINGTON (10), Quadros 1 e 2. Os micronutrientes e os demais componentes foram adicionados segundo a formulação de MURASHIGE & SKOOG (32). Após a adição do meio de tuberização, as plântulas foram levadas para sala de crescimento, e incubadas no escuro.

3.3. Influência da idade da plântula

Foram utilizadas plântulas oriundas da fase inicial, com duas, três, quatro e cinco semanas de idade, a partir da repicagem. Escolheu-se para o ensaio, plântulas que apresentavam bom desenvolvimento, tanto da parte aérea, quanto de raízes.

Adicionou-se, em condições assépticas, um novo meio de cultura às plântulas nos frascos, com o esgotamento prévio de algum volume do meio de cultura anterior. O meio de cultura utilizado foi o de MURASHIGE & SKOOG (32), que nos Quadros 1 e 2 aparece como meio 4. Foram adicionados 60 gramas de sacarose e 10 miligramas de BAP por litro de meio de cultura. Após a adição do meio de tuberização, as plântulas foram levadas para sala de crescimento e incubadas no escuro.

Foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado, com oito repetições. Cada frasco contendo de 4-5 brotos foi considerado como parcela experimental.

Para a multiplicação dos tubérculos obtidos, foram utilizadas bandejas quadriculadas de isopor denominadas comercialmen-

QUADRO 1 - Combinações de sais de macronutrientes segundo Margara modificado por GEORGE & SHERRINGTON (10). Valores em miligramas da substância por litro de meio de cultura.

Meios	KNO_3	NH_4NO_3	$Ca(NO_3)$ $.4H_2O$	$CaCl_2$ $.2H_2O$	KCl	$NaNO_3$	$MgSO_4$ $.7H_2O$	KH_2PO_4
1	-	101	354	292	149	-	246	136
2	606	240	354	-	149	-	246	136
3	808	480	1180	-	74,5	-	246	136
4	1900	1650	-	440	-	-	370	170

QUADRO 2 - Composição iônica das soluções de macronutrientes dos meios de Margara, em miliequivalentes, segundo GEORGE & SHERRINGTON (10).

Meios	NO_3	H_2PO_4	SO_4	Cl	K	Ca	Mg	NH_4	N total	NH_4: N total
1	4,0	1,0	2,0	6,0	3,0	7,0	2,0	1,0	5,0	0,20
2	12,0	1,0	2,0	2,0	9,0	3,0	2,0	3,0	15,0	0,20
3	24,0	1,0	2,0	1,0	10,0	10,0	2,0	6,0	30,0	0,20
4	39,4	1,3	3,0	6,0	20,0	6,0	3,0	20,6	60,0	0,34

te de Plantágil, com um substrato composto denominado comercialmente de Plantimax. Tubérculos de vários diâmetros foram plantados em casa-de-vegetação. Alguns foram cortados ao meio, conforme preconizados por EWING et alii (8). Após cerca de 15 dias, alguns foram transplantados para vasos de plástico de três litros, com substrato de vermiculita e solo (1:2). As plantas foram adubadas periodicamente com solução de Hoagland a 10%. A colheita efetuou-se 60 dias após o plantio.

3.4. Características avaliadas

Após decorridos 30 dias da adição de um novo meio de cultura, para a tuberização, foram avaliadas as seguintes características dos tubérculos:

a) Diâmetro

Medido no sentido transversal com um paquímetro, e expresso em milímetros. Para a análise, obteve-se a média dos tubérculos produzidos por frasco. Os tubérculos com diâmetro inferior a 2,0 mm não foram considerados na avaliação.

b) Número

Contou-se o número de tubérculos produzidos em cada frasco. Tubérculos com diâmetro inferior a 2,0 mm também não foram contabilizados. Para a análise estatística, os números (x) sofreram transformação para $(x + 0,5)^{1/2}$.

c) Peso da matéria fresca

Através de uma balança eletrônica de precisão, obteve-se o peso da matéria fresca (mg) de cada tubérculo produzido. Para análise estatística foi considerada a soma dos pesos dos tubérculos produzidos por frasco.

d) Peso da matéria seca

No ensaio 3.3, obteve-se o peso da matéria seca (mg) da parte aérea e das raízes das plântulas, após a secagem em estufa, à temperatura constante de 70°C por 24 horas.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O primeiro sinal visível de tuberização foi o intumescimento da parte aérea ou estolão, tanto nas posições axilares quanto terminais, em cerca de 3-4 dias após a incubação. Os minitubérculos foram produzidos tanto na parte aérea acima do meio líquido quanto na parte submersa. Geralmente, os que estavam submersos apresentavam uma espécie de calosidade envolvendo-os. Mas após serem retirados e lavados, não diferiam muito no aspecto em relação aos outros.

Ao final do período de incubação, as plântulas apresentavam um aspecto aclorofilado, devido à ausência de luz, e senescente principalmente no meio com menor teor de N.

Verificou-se também que nem sempre um diâmetro correspondeu a um determinado intervalo de peso de tubérculo. Mas este comportamento foi mais característico nos diâmetros menores, até 3,0 mm.

Também no Centro Internacional de la Papa (CIP) dados de 10 clones revelaram que o peso médio de minitubérculos não se

relacionou diretamente com o diâmetro, TOVAR et alii (50).

4.1. Influência do N, sacarose e BAP

4.1.1. Efeito do N

Segundo a análise de variância (Quadro 3), o N influenciou o número de minitubérculos produzidos. O diâmetro e o peso não foram afetados pela redução de N no meio de cultura. Estes resultados concordam com aqueles obtidos por OPARKA et alii (34), que em plantas deficientes de N e sob condições de campo, o peso da matéria seca dos minitubérculos não diferiu significativamente daqueles produzidos por plantas fertilizadas.

Como pode ser visto na Figura 1 e no Quadro 4, o melhor nível de N situou-se em 5,0 meq. Os níveis de 6 e 12 vezes maiores foram os menos produtivos, discordando dos dados de Gumasena & Harris citados por HARRIS (16). Estes autores verificaram que em condições de campo, o aumento da taxa de N aumentou o número de minitubérculos, devendo-se este fato ao efeito primário do N no incremento da área foliar, segundo as observações de HARRIS (16).

A interação entre o N e a sacarose não foi significativa (Quadro 3), discordando da afirmação de OKAZAWA (33) de que o efeito inibidor de altas doses de N pode ser superado através do aumento da concentração de sacarose no meio, como por exemplo para 8%.

QUADRO 3 - Quadrados médios de número, diâmetro e peso total de tubérculos produzidos pelo efeito do nitrogênio e da concentração de sacarose e BAP na tuberização de batata cv Bintje. ESAL, Lavras-MG, 1988.

Fonte de variação	G.L.	Quadrados médios		
		Número[1]	Diâmetro (mm)	Peso (mg)
N	3	0,5132*	0,3131ns	4467,0833ns
Sac	2	3,1844**	16,6669**	611872,6979**
BAP	1	0,5200ns	6,3551*	32340,0416ns
N x Sac	6	0,0984ns	0,2184ns	13126,5315ns
N x BAP	3	0,0044ns	8,5282ns	8473,2361ns
Sac x BAP	2	0,9803**	0,5057**	147473,1354**
NxSacxBAP	6	0,0498ns	1,1844ns	37482,5798ns
Sac:BAP(1)	2	3,9293**	24,5158**	638129,4375**
Sac:BAP(2)	2	0,5115*	0,6794ns	120650,8958**
Resíduo	72	0,1694	85,2775	17082,7014
Total	95			
C.V. (%)		19,28	24,26	36,71

1 Dados transformados para $(x + 0,5)^{1/2}$

** Significativo, a 1% de probabilidade, pelo teste de F.

* Significativo, a 5% de probabilidade, pelo teste de F.

ns Não significativo, a 5% de probabilidade, pelo teste de F.

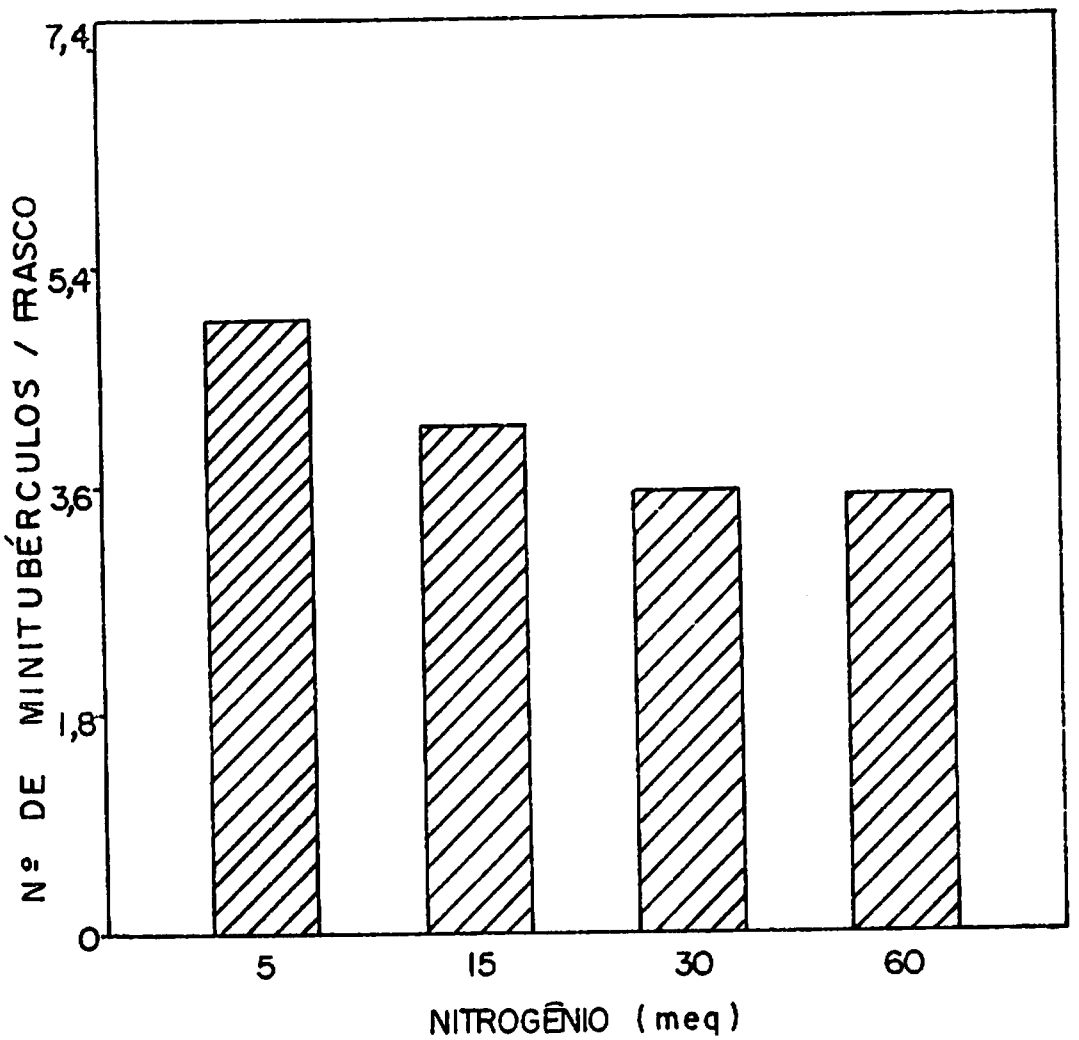

FIGURA 1 - Efeito do N sobre o número de minitubérculos *in vitro* de batata cv Bintje após 30 dias de incubação no escuro. ESAL. Lavras-MG, 1988.

Apesar da citação de PALMER & SMITH (36) e WANG & HU (53) de que a utilização de altas doses de N não afetou a tuberização induzida por citocininas, verificou-se neste trabalho que mesmo na presença de BAP, um teor menor de N foi mais satisfatório para a tuberização. Isto pode ser explicado porque o número de tubérculos está mais associado aos fatores indutores, enquanto o diâmetro e o peso parecem estar associados à capacidade fotossintética da planta, visando manter o fluxo de fotoassimilados para o seu crescimento.

4.1.2. Efeito da sacarose e do BAP

Como pode ser visto no Quadro 3, houve uma interação entre a sacarose e BAP, influenciando o número, o diâmetro e o peso fresco dos minitubérculos *in vitro*.

O Quadro 5 mostra que as concentrações de 6 e 12% de sacarose foram superiores a 3%, mas não diferiram entre si. Isto contraria PALMER & SMITH (37), que afirmaram que concentrações de sacarose superiores a 10% são inibitórias.

A ausência ou presença de BAP, não afetou o número de minitubérculos nas concentrações de 6 e 12% de sacarose. No entanto, a sua presença dobrou o número de minitubérculos na concentração de 3% (Figura 2, Quadro 5). ABBOT & BELCHER (1) acreditam que pelo menos 3% de sacarose é requerida na tuberização induzida por BAP. Apesar dos mesmos autores terem encontrado um maior número de

QUADRO 4 - Médias do efeito de nitrogênio sobre o número, diâmetro e peso da matéria fresca de tubérculos produzidos *in vitro*, após 30 dias no escuro. ESAL. Lavras-MG, 1988*.

Fator	Níveis	Número	Diâmetro (mm)	Peso (mg)[1]
	5	5,17 a	4,33 a	376 a
Nitrogênio	15	4,33 ab	4,49 a	346 a
(meq)	30	3,83 b	4,52 a	353 a
	60	3,79 b	4,60 a	347 a

1 Dados de peso de matéria fresca.

* Médias seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

QUADRO 5 - Valores médios obtidos da interação sacarose x BAP no número, diâmetro e peso fresco total de tubérculos produzidos *in vitro*, após 30 dias no escuro. ESAL, Lavras-MG. 1988*.

Sacarose %	Número		Diâmetro (mm)		Peso (mg)	
	BAP (mg/P)		BAP (mg/P)		BAP (mg/P)	
	0	10	0	10	0	10
3	1,71 bAB	3,58 bA	2,80 b B	4,50a A	115 b B	279 bA
6	4,50a A	5,15a A	4,93a A	4,87a A	398a A	450a A
12	5,40a A	4,46abA	4,96a A	4,85a A	500a A	393a A

* Médias seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas e maiúsculas nas linhas, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

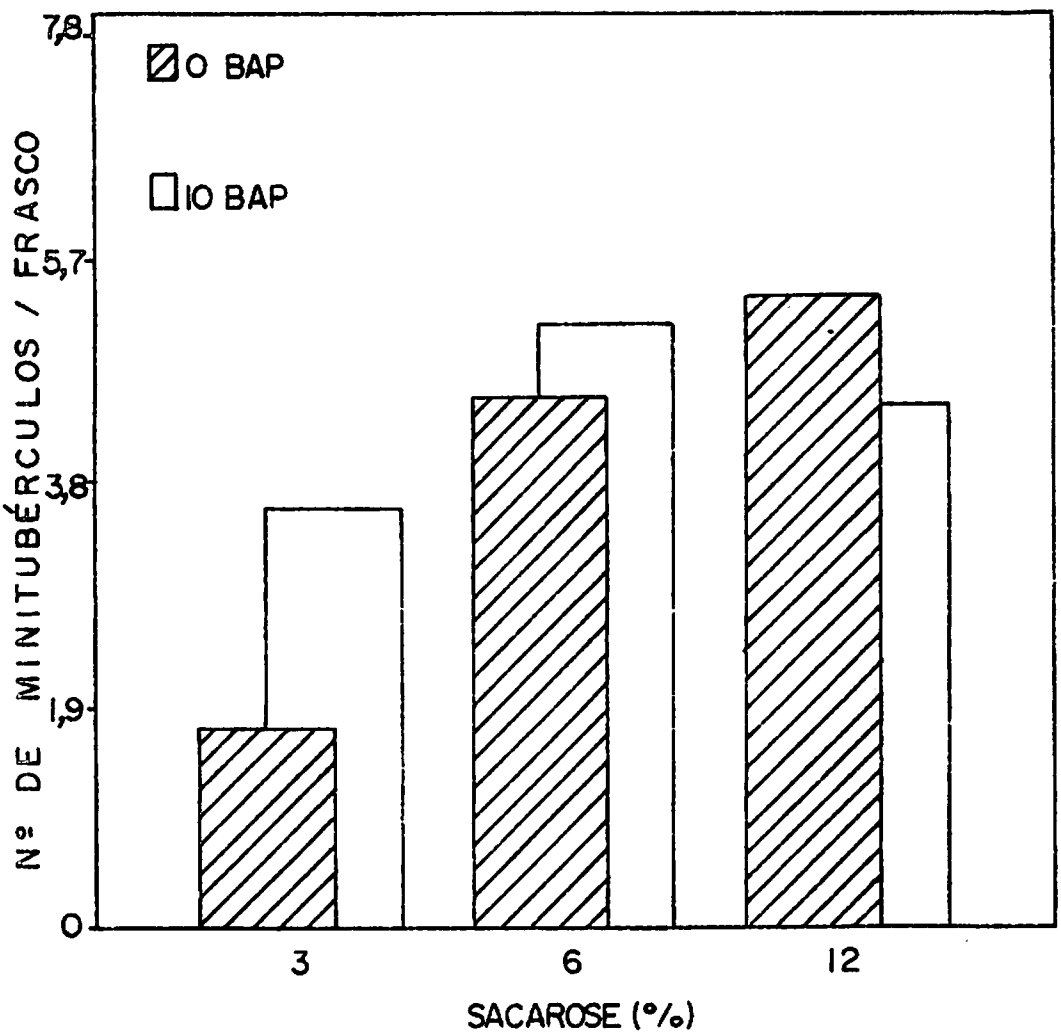

FIGURA 2 - Influência da sacarose e BAP ($mg.l^{-1}$) sobre número de minitubérculos *in vitro* de batata cv Bintje após 30 dias de incubação no escuro. ESAL. Lavras-MG, 1988.

tubérculos na concentração de 6% de sacarose com a utilização de BAP a 10 $mg.l^{-1}$, neste trabalho o BAP não promoveu diferença no número quando associado à sacarose 6%.

Como não se verificou efeito do BAP em condições de maior disponibilidade de sacarose, seu papel deve estar associado a um aumento na translocação de açúcar para os minitubérculos. Isto é melhor compreendido pela Figura 2 e Quadro 5, onde o número de tubérculos produzidos com o uso de BAP praticamente dobrou em condições de baixa concentração de sacarose. Mullins citado por GIFFORD & EVANS (11), reportou-se a este papel de dreno das citocininas quando demonstrou que após a sua aplicação em uma superfície de parte aérea cortada, havia o acúmulo de assimilados nesta região. Esta ação das citocininas na atividade de dreno em minitubérculos também foi relatada por KRAUSS (21) e TIZIO & BIAIN (49).

A presença de BAP, aumentou o diâmetro e o peso da matéria fresca dos minitubérculos na concentração de 3%, mas não nas de 6 e 12% (Figuras 3 e 4, Quadro 5). Tal comportamento pode ser devido à ação de dreno do BAP, como já foi discutido anteriormente. Resultados similares foram obtidos por ORTIZ-MONTIEL & LOZOYA-SALDANA (35), onde uma concentração de 10 mg.l de BAP favoreceu a obtenção de minitubérculos de maior peso fresco em uma das cultivares por eles testadas, mas o número e o tamanho dos tubérculos não foi afetado quando utilizado tanto BAP quanto cinetina.

Os maiores teores de sacarose favoreceram a disponibilidade deste elemento para os minitubérculos dispensando o efeito do BAP em aumentar a atividade de dreno. Observações de EWING (7)

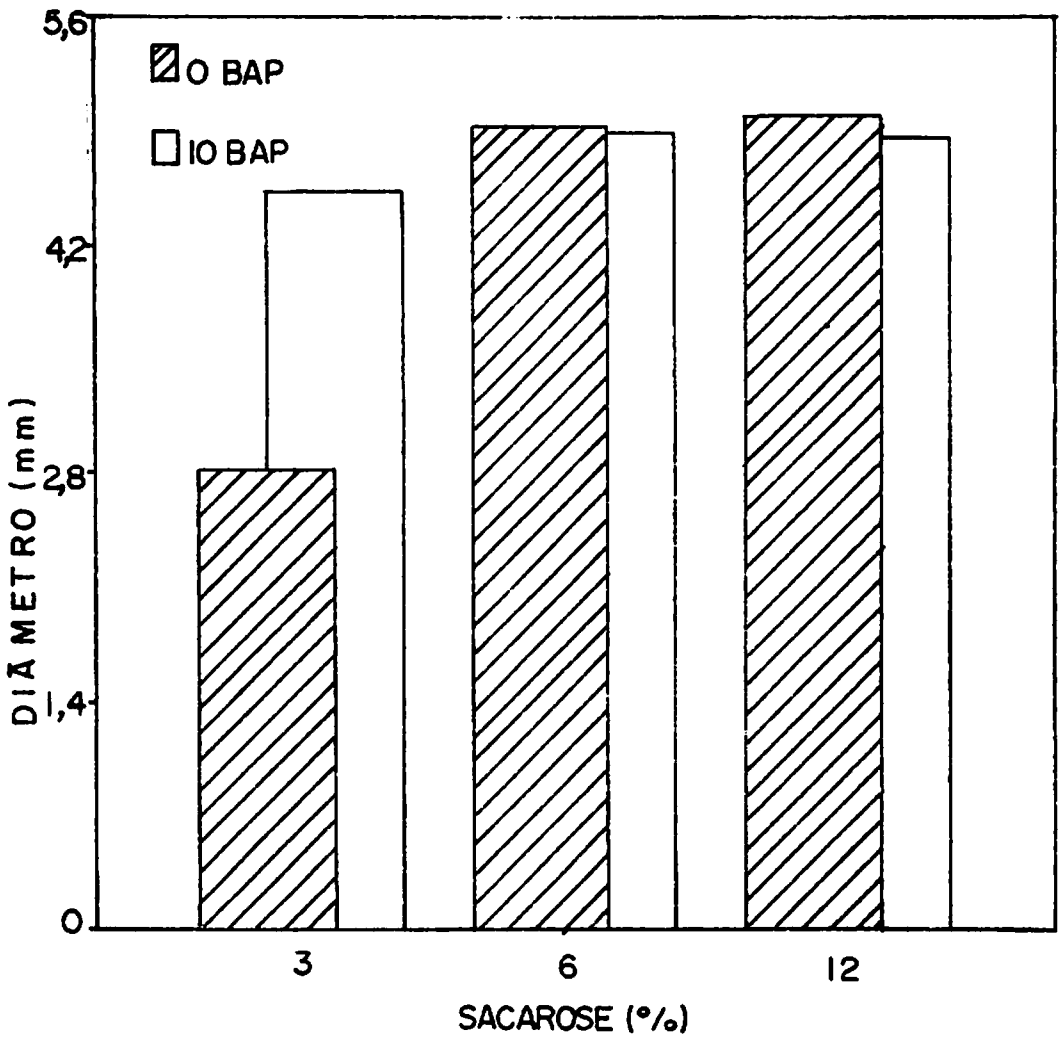

FIGURA 3 - Influência da sacarose e BAP ($mg.l^{-1}$) sobre o diâmetro dos minitubérculos de batata cv Bintje produzidos *in vitro*, após 30 dias de incubação no escuro. ESAL. Lavras-MG, 1988.

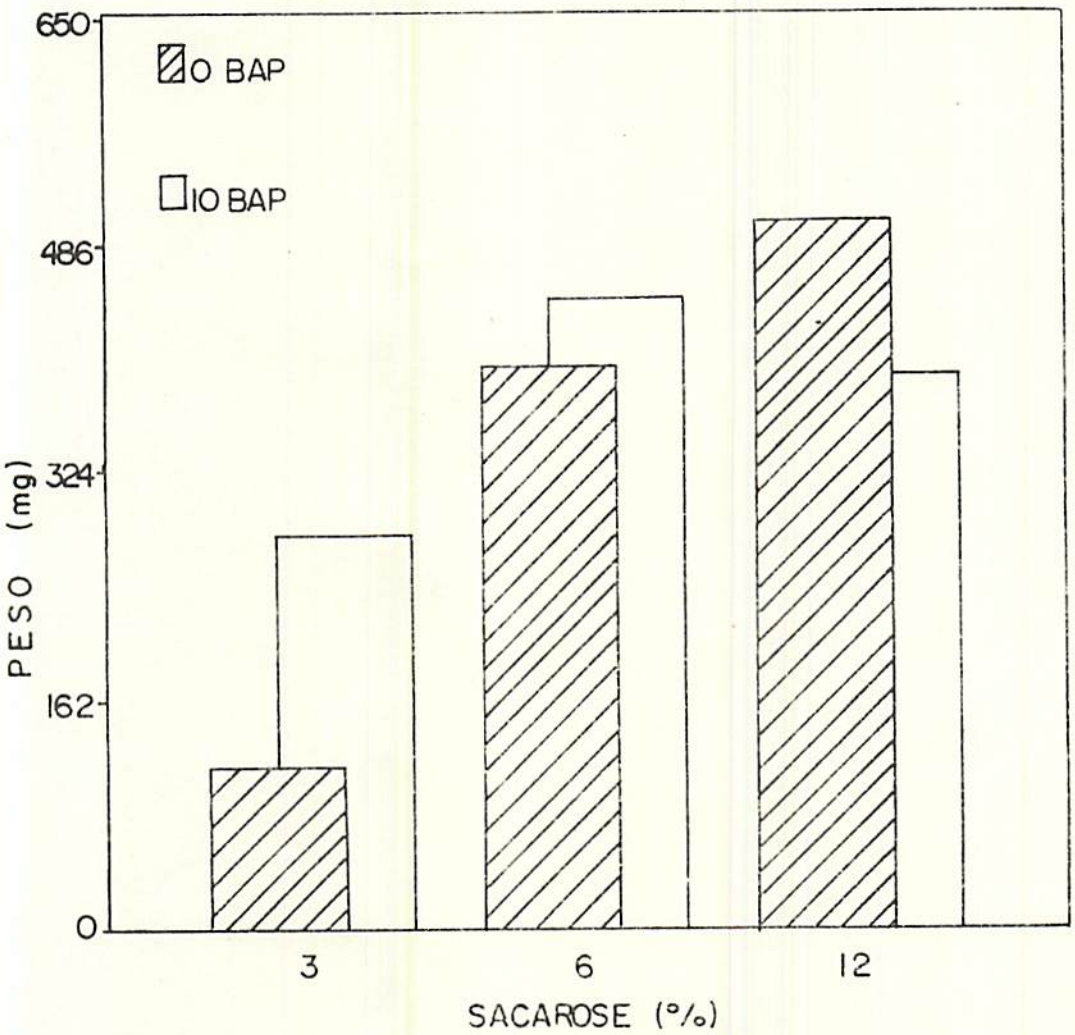

FIGURA 4 - Efeito da sacarose e BAP ($mg.l^{-1}$) sobre o peso da matéria fresca dos minitubérculos de batata cv Bintje produzidos *in vitro*, após 30 dias de incubação no escuro. ESAL. Lavras-MG, 1988.

também evidenciam pouca tuberização na ausência de açúcar. Este fato contraria aparentemente diversos autores (1, 18, 53) para o qual o BAP estimulou a tuberização mesmo nas concentrações de sacarose utilizadas neste trabalho. Pode-se considerar que estas diferenças são devidas à cultivar utilizada e à algumas diferenças experimentais, o que de acordo com STALLKNECHT (46) e WANG & HU (54) é onde reside a dificuldade de interpretação dos vários trabalhos na área.

4.2. Influência da idade da plântula

4.2.1. Efeito da idade

Conforme pode ser visto na análise de variância do Quadro 6, a idade com que a plântula foi induzida a tuberizar, influenciou no número, no diâmetro e no peso dos tubérculos produzidos.

A idade de 4 semanas foi a mais produtiva (Figura 5, Quadro 7). Entretanto, observa-se pela Figura 6, que esta produção esteve provavelmente associada à maior quantidade de matéria seca da plântula. Desde que o estímulo à tuberização foi idêntico para todas as idades, pode-se afirmar que a idade 4 foi a que esteve mais capacitada para suportar o crescimento dos tubérculos, o que é, segundo MOORBY (30), a condição mais importante após a iniciação para a produção. Estes resultados parecem concordar com GOODWIN & BROWN (12), no qual plantas com 8 semanas produziram mais tu

QUADRO 6 - Quadrados médios do número, diâmetro e peso da matéria fresca total de minitubérculos; peso de matéria seca do efeito da idade do material vegetal na tuberização de batata cv Bintje. ESAL. Lavras-MG, 1988.

Fonte de variação	G.L.	Quadrados médios			
		Número[1]	Diâmetro	Peso Matéria fresca	Matéria seca[2]
Idade	3	0,4655**	1,7624**	544692,9479**	61712,6146**
Resíduo	28	0,0731	0,3954	66735,3526	1817,9062
Total	31				
C.V. (%)					

1 Dados transformados para $(x + 0,5)^{1/2}$

2 Parte aérea + raízes.

** Significativo, a 1% de probabilidade, pelo teste de F.

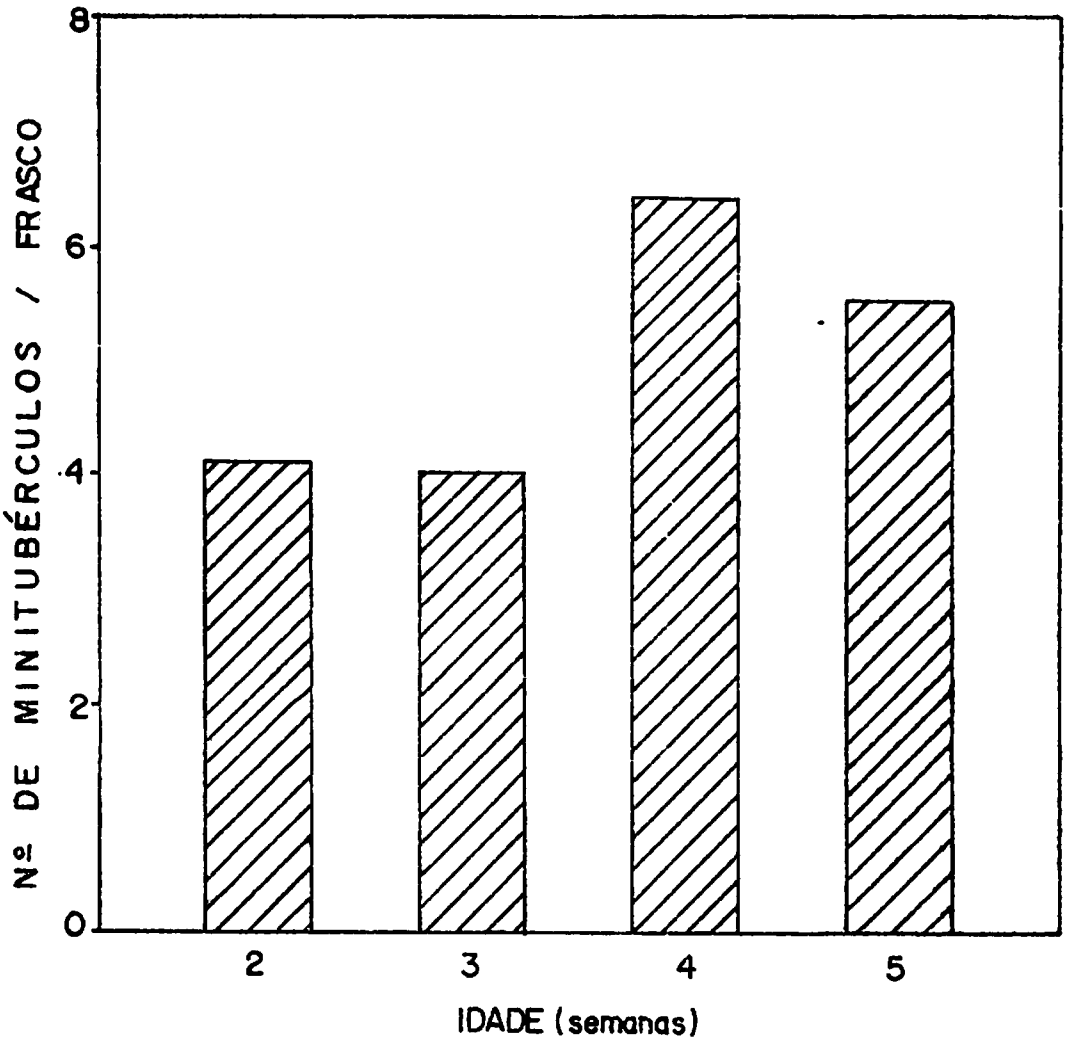

FIGURA 5 - Influência da idade da plântula sobre o número de minitubérculos de batata cv Bintje, após 30 dias de incubação no escuro. ESAL. Lavras-MG, 1988.

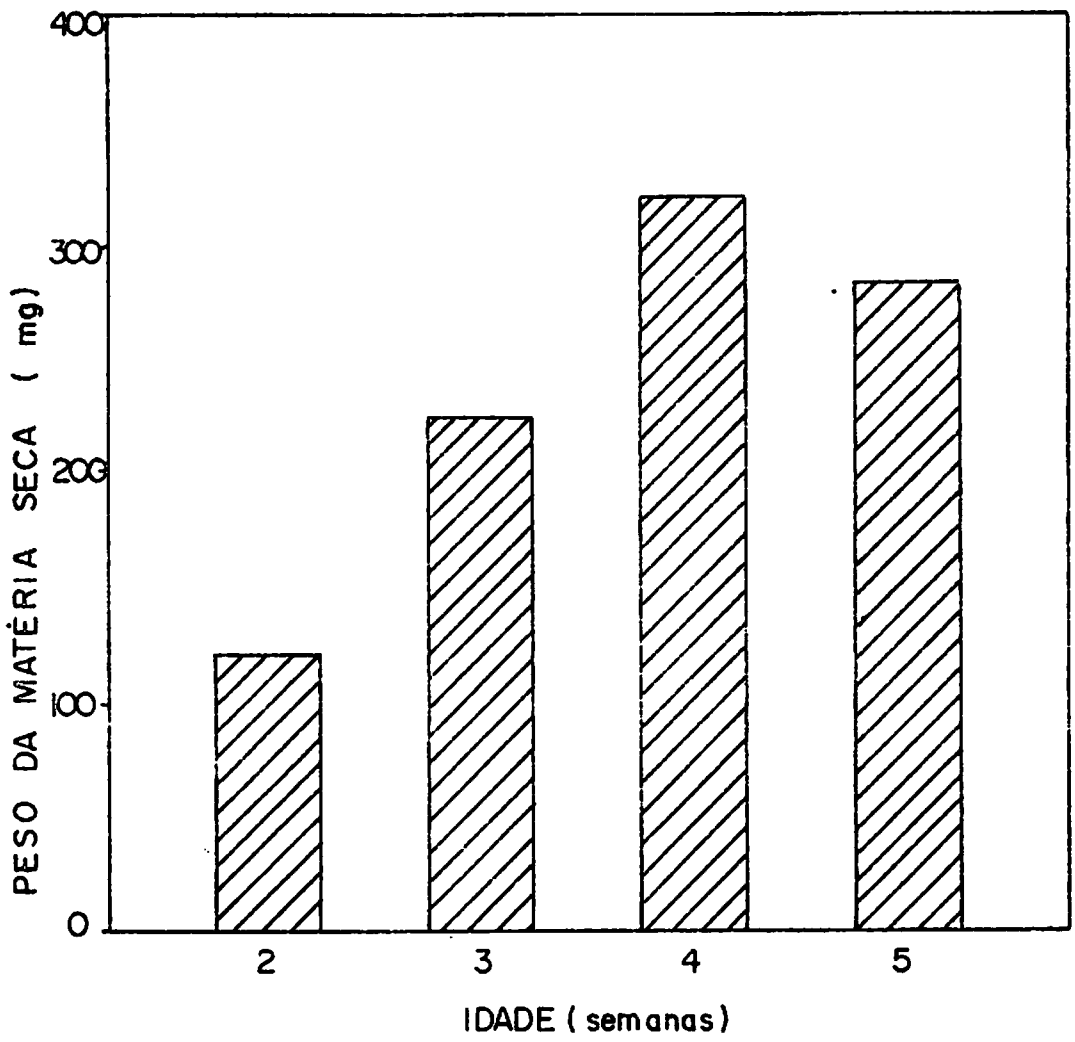

FIGURA 6 - Peso da matéria seca das plântulas após 30 dias de incubação no escuro. ESAL. Lavras-MG, 1988.

QUADRO 7 - Médias do efeito da idade do material vegetal sobre o número, diâmetro e peso da matéria fresca de tubérculos obtidos *in vitro*, e do peso da matéria seca de plântulas. ESAL. Lavras-MG, 1988*.

Idade[1]	Número	Diâmetro (mm)	Peso Matéria fresca	Matéria seca[2] (mg)
2	4,20 b	5,50 b	580 b	120 c
3	4,20 b	6,21 ab	803 b	223 b
4	6,50 a	6,48 a	1205 a	322 a
5	5,50 ab	5,61 b	790 b	282 a

1 Semanas após a repicagem

2 Parte aérea + raízes

* Médias seguidas da mesma letra minúscula nas colunas, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

bérculos quando transplantadas para o campo, que aquelas com 6 semanas.

Realmente, foi observado que durante a primeira semana depois da repicagem, a plântula começou a desenvolver-se formando a parte aérea e as raízes. Mas entre a primeira e a segunda semana é que houve um rápido desenvolvimento. O pico deste desenvolvimento foi atingido, dentro das condições impostas, na quarta semana , como mostra a Figura 6. Portanto, foi provavelmente nesta fase que houve maior capacidade de absorção e translocação de nutrientes para os pontos de crescimento, resultando daí uma maior produção.

O número médio de tubérculos obtidos por frasco foi de 6,5 na idade mais produtiva, e 4,2 nas menos produtivas (Quadro 7).

Os maiores diâmetros também foram obtidos na idade 4 semanas (Figura 7), com um valor médio de 6,5 mm (Quadro 7). No CIP, trabalhando com diversos clones, TOVAR et alii (50) obtiveram a partir de plântulas de 2-3 semanas, tubérculos com diâmetro médio entre 3,0-7,0 mm. Neste trabalho, plântulas destas idades forneceram tubérculos com diâmetros médios de 5,5 e 6,2 mm, respectivamente (Quadro 7).

No entanto, o diâmetro dos tubérculos obtidos não pôde ser associado ao estado nutricional da planta (Figura 6), pois na idade 3 semanas obteve-se diâmetros próximos ao da idade 4 (Quadro 7). Comparando o diâmetro entre a idade 2 e idade 3 (Figura 7), e relacionando-o com o crescimento da planta (Figura 6), pode-se supor que na idade 3 houve uma intensa atividade de fitohormônios que atuam na divisão celular. Deste modo, pode-se compreender o

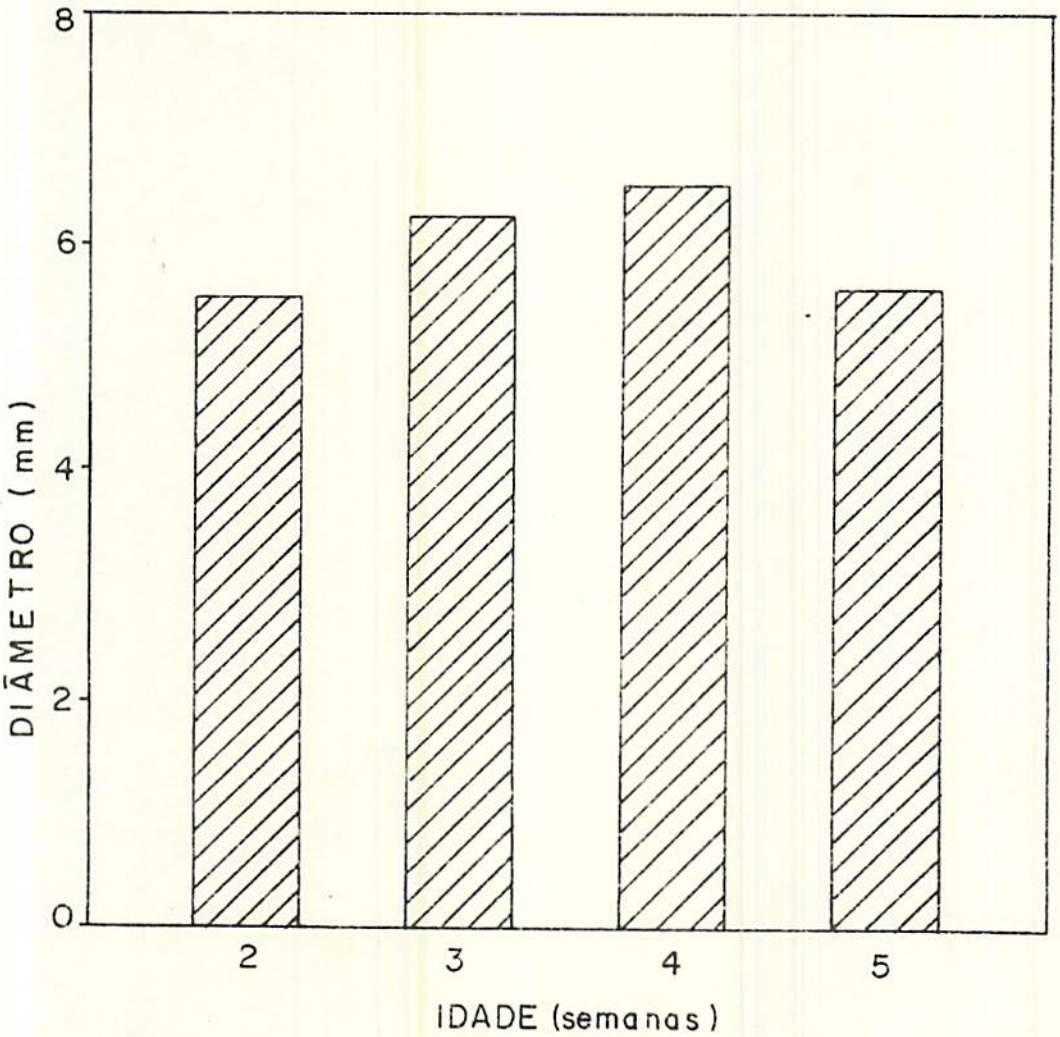

FIGURA 7 - Influência da idade da plântula sobre o diâmetro dos minitubérculos de batata cv Bintje produzidos *in vitro*, após 30 dias de incubação no escuro. ESAL. Lavras-MG, 1988.

porquê deste aumento considerável no diâmetro, enquanto que na produção (Figura 5) e no peso fresco dos tubérculos (Figura 8), esta idade foi inferior à subsequente.

As plântulas de 4 semanas também foram as que produziram tubérculos de maior peso fresco (Figura 8), com média de 1205 mg por frasco, ou 186 mg por tubérculo (Quadro 7). As idades de 2-3 semanas produziram tubérculos com peso fresco médio de 105 e 129 mg (Quadro 7). NO CIP, utilizando plântulas da mesma idade, diversos clones produziram tubérculos variando de 72,8 a 143,5 mg, TOVAR et alii (50).

Conforme foi mostrado no ítem 4.1., fatores diferentes de indução afetaram a produção. Entretanto, o tamanho e o peso fresco dos tubérculos foi devido ou à disponibilidade de açúcar ou ao efeito do BAP em estimular a ação de dreno. Como houve disponibilidade de açúcar, acredita-se que com relação ao tamanho e ao peso, as diferenças entre os tratamentos se devem à capacidade da planta em absorver a sacarose e translocá-la para as regiões de formação do tubérculo.

Apesar de ter apresentado uma produção semelhante à idade 4, a idade 5 produziu tubérculos de menor tamanho e peso. Embora esta idade tenha apresentado um grande número de repetições contaminadas, não houve reflexos no número de tubérculos produzidos, apesar de ter tido provavelmente uma competição no meio por nutrientes, o que pode ter prejudicado o desenvolvimento dos tubérculos.

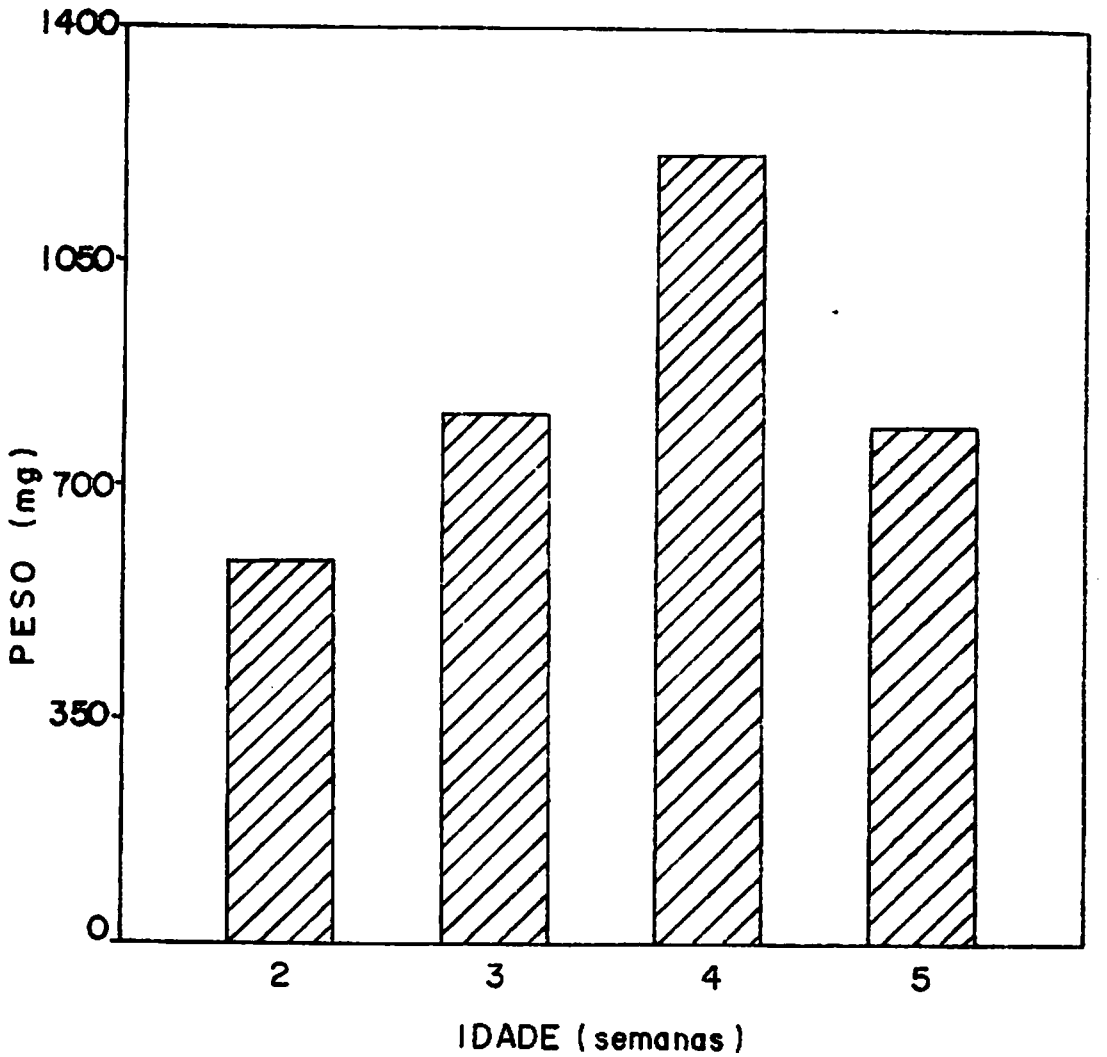

FIGURA 8 - Efeito da idade da plântula sobre o peso da matéria fresca dos minitubérculos de batata cv Bintje produzidos in vitro, após 30 dias de incubação no escuro.ESAL. Lavras-MG, 1988.

4.2.2. Multiplicação dos tubérculos

Muitas vezes, tubérculos com diâmetro em torno de 2,0 mm ou menos, apresentavam uma brotação precoce, com aspecto vigoroso, mesmo tão cedo quanto 2 semanas após a incubação. Esta brotação precoce também foi observada por ORTIZ-MONTIEL & LOZOYA-SALDANA (35).

Alguns tubérculos, quando armazenados a 4°C, apresentaram uma brotação vigorosa, antes mesmo de 60 dias de armazenamento (Figura 9), enquanto outros não chegaram nem mesmo a apresentar dormência. Resultados contraditórios neste aspecto também foram encontrados por ABBOT & BELCHER (1) e HUSSEY & STACEY (18).

Tubérculos com diferentes estágios de brotação e diâmetro, como observado na Figura 9 foram plantados. Apesar do estabelecimento inicial mais rápido daqueles já brotados, todas as plantas apresentavam ao final de 60 dias, o aspecto mostrado na Figura 10.

Aparentemente, o seccionamento em tubérculos recém-colhidos apresentou ótimos resultados, pois brotaram e alcançaram o tamanho das demais plantas rapidamente (Figura 11). Estes resultados também foram observados por EWING et alii (8), que verificando a brotação de minitubérculos cortados ao meio, provenientes de diferentes métodos de produção, encontraram de 53-83% de brotação nos minitubérculos seccionados ao meio e de 0-23% nos tubérculos inteiros.

FIGURA 9 - Tubérculos de batata produzidos *in vitro* apresentando brotações. ESAL. Lavras-MG, 1988.

FIGURA 10 - Visão geral das plantas originadas dos minitubérculos após 60 dias de plantio. ESAL. Lavras-MG, 1988.

FIGURA 11 - Aspecto geral das plantas oriundas de minitubérculos. As duas da esquerda são provenientes de tubérculos de 7,0 mm seccionado ao meio; as duas seguintes de inteiros, e a última de um de 8,0 mm não cortado. ESAL. Lavras-MG, 1988.

A Figura 11 mostra o aspecto geral da planta e tubérculos provenientes de 2 metades de um tubérculo de 7,0 mm. Comparando-se os resultados das 2 plantas da esquerda com as 2 subsequentes, que não foram cortadas (Figura 11), não se observa diferenças entre elas. Apesar de que neste trabalho não tenha havido uma avaliação mais precisa do efeito do corte na brotação do tubérculo recém-colhido, os resultados sugerem que este é um procedimento adequado e que pode ser utilizado também quando as condições exigirem a necessidade de um plantio rápido. Como pode ser visto na Figura 11, a planta proveniente de um tubérculo de 8,0 mm não demonstrou diferença com as demais.

Este comportamento foi notado em outras comparações,no qual um tubérculo menor, com cerca de 3,0 mm, originava uma planta semelhante às provenientes de tubérculos maiores. As plantas produziram em média 4 tubérculos por vaso (Figura 11), com um peso de matéria fresca média de 2000 mg por unidade.

O volume das bandejas (speedling) e dos vasos onde foram cultivadas as plantas afetou o tamanho dos tubérculos produzidos (Figura 12), o que concorda com os resultados THORNTON & KNUTSON (48) no qual um volume maior do recipiente proporcionou a produção de tubérculos de diâmetros maiores, mas não aumentou o número produzido por planta.

Neste trabalho, o tamanho razoável dos tubérculos obtidos em bandejas, leva a crer que este procedimento possa evitar a mão-de-obra para transplantio para vasos maiores e economizar espaço em casa-de-vegetação.

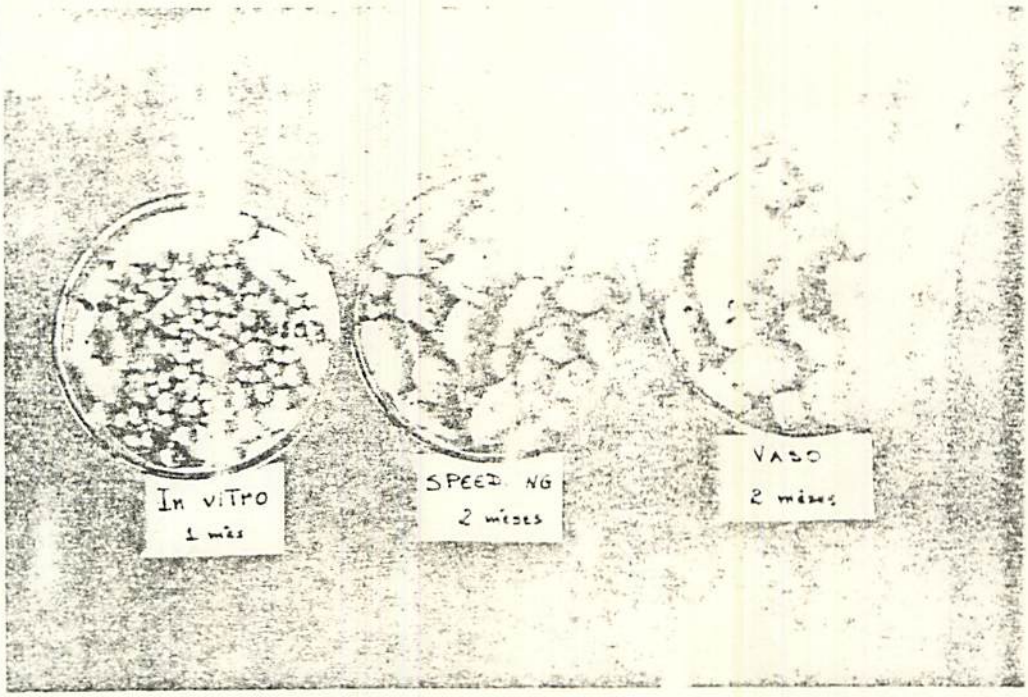

FIGURA 12 - Tubérculos de batata cv Bintje obtidos <u>in vitro</u> (esquerda); em bandejas (centro) e em vasos (direita) após 60 dias do plantio dos primeiros. ESAL. Lavras-MG, 1988.

5. CONCLUSÕES

Para as condições em que os experimentos foram desenvolvidos, pode-se concluir que:

- Um baixo teor de N (5 meq) favoreceu a tuberização *in vitro*.

- O BAP aumentou a atividade de dreno dos tubérculos promovendo maior produção, diâmetro e peso quando houve pouca disponibilidade de sacarose no meio de cultura.

- Uma concentração de 6% de sacarose supriu adequadamente a planta de carboidratos exigido pelos tubérculos para o seu desenvolvimento, dispensando a utilização de BAP no meio.

- A melhor produção de minitubérculos, tanto em número como em tamanho e peso, foi obtida com plântulas de 4 semanas.

- O tamanho do minitubérculo *in vitro* não influenciou no desenvolvimento da planta.

- O corte pela metade favoreceu a multiplicação imediata dos tubérculos produzidos.

- Os minitubérculos podem ser multiplicados eficientemente em bandejas, dispensando o transplantio para recipientes maiores.

[redacted]

6. RESUMO

Foram produzidos tubérculos *in vitro* a partir de plântulas de batata (*Solanum tuberosum* L. cv Bintje) micropropagadas no laboratório de Cultura de Tecidos da Escola Superior de Agricultura de Lavras.

Em meio líquido balanceado ionicamente, foi verificado a influência do teor de N (5, 15, 30 e 60 meq), da sacarose (3,6 e 12%) e do BAP (0 e 10 $mg.l^{-1}$) na tuberização. O efeito da idade da plântula (2, 3, 4 e 5 semanas) após a repicagem também foi estudado. A incubação se deu no escuro, à temperatura de cerca de 26°C.

Um nível baixo de N (5 meq) favoreceu a tuberização, mas não afetou o tamanho e o peso fresco dos tubérculos. Em condições de pouca disponibilidade de sacarose (3%), o BAP parece ter promovido o aumento da atividade de dreno dos tubérculos, duplicando a produção. Concentrações maiores de sacarose (6 e 12%) supriram adequadamente a planta de carboidratos, não se observando porém, efeito do BAP. As plântulas com 4 semanas de idade produziram tubérculos em maior número, tamanho e peso. Isto se deu provavelmente à maior capacidade de absorção e translocação de nutrientes.

O tamanho dos tubérculos e o seu seccionamento antes do plantio não afetou o desenvolvimento posterior da planta ou a sua produção.

Portanto, neste trabalho, o melhor sistema de produção de tubérculos foi a partir de plântulas micropropagadas com 4 semanas de idade. E o melhor meio foi aquele com 5 meq de N e 6% de sacarose.

7. SUMMARY

Minitubers of potato (S. tuberosum L. cv Bintje) were obtained from micropropagated plantlets in the Tissue Culture Laboratory at the Escola Superior de Agricultura de Lavras.

On an ionically balanced liquid medium the effect of different levels of Nitrogen (5, 15, 30 and 60 meq), sucrose (3, 6, and 12%), and BAP (0, 10 $mg.l^{-1}$) was verified in the tuberization. After the proliferation stage, the effect of plantlet age (2, 3, 4, and 5 weeks) was also evaluated. Plantlets were maintained in dark room at 26°C.

Although the lowest level of N (5 meq) did not affect the size and fresh weight of tubers, it considerably favoured the tuberization. In conditions of low availability of sucrose (3%), BAP seemed to enhance the sink activity of tubers.

No effect of BAP was observed since high sucrose levels were enough to supply the carbohydrate required for development.

Higher size, fresh weight and number of tubers were

obtained from platlets with four week of age. Such result can be inferred to the high capability of absortion and translocation of nutrients. Plant development and production was not affected by the size and the cutting of tubers.

It was inferred from this work that the best tuber production was achieved from plantlets with four weeks of age on an ionically balaced medium supplied with 5 meq N and 6% of sucrose.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABOTT, A.J. & BELCHER, A.R. Potato tuber formation *in vitro*. In: WITHERS, L.A. & ALDERSON, P.G. *Plant tissue culture and its agricultural applications*. London, Butterworths, 1986. p.113-22.

2. CHAPMAN, H.W. Tuberization in the potato plant. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, *11*:215-25, 1958.

3. CUTTER, E.G. Structure and development of the potato plant. In: HARRIS, P.M. *The potato crop*: the scientific basis for improvement. London, Chapman, 1978. p.70-152.

4. DIAS, J.A.C. de. & COSTA, A.S. *Método "cova/pré-plantio" na seleção da batata-semente*. Campinas, Fundação Cargill, 1984. 68p.

5. DWELLE, R.B. Photosynthesis and photoassimilate partitioning. In: LI, P.H. *Potato physiology*. London, Academic Press, 1985. p.35-58.

6. EWING, E.E. Cuttings as simplified models of the potato plant. In: LI, P.H. Potato physiology. London, Academic Press, 1985. p.153-207.

7. _____. The role of hormones in potato (Solanum tuberosum L.) tuberization. In: DAVIES, P.J. Plant hormones and this role in plant growth and development. Dordrecht, Kluwer, 1988. p.515-38.

8. EWING, L.L.; McMURRY, S.E. & EWING, E.E. Cuttings as a method of breaking dormancy in microtubers produced in vitro. American Potato Journal, Orono, 64(6):329-32, June 1987.

9. FORSLINE, P.F. & LANGILLE, A.R. Endogenous cytokinins in Solanum tuberosum as influenced by photoperiod and temperature. Physiologia Plantarum, Copenhagen, 34:75-7, 1975.

10. GEORGE, E.F. & SHERRINGTON, P.D. Plant propagation by tissue culture: handbook and directory of commercial laboratories. Eversley, Exegetics, 1984. 709p.

11. GIFFORD, R.M. & EVANS, L.T. Photosynthesis, carbon partitioning, and yield. Annual Review of Plant Physiology, Palo Alto, 32:485-509, 1981.

12. GOODWIN, P.B. & BROWN, G. Field performance of potato shoot-tip proliferated in culture. Potato Research, 23:449-52, 1980.

13. _____; KIM, Y.C. & SARWANTO, T. Propagation of potato by shoot-tip culture. Potato Research, 23:9-18, 1980.

14. GREGORY, L.E. Some factors for tuberization in the potato plant. Annals of Botany, London, 43:381-8, 1956.

15. HAMMES, P.S. & NEL, P.C. Control mechanisms in the tuberization process. Potato Research, 18:262-72, 1975.

16. HARRIS, P.M. Mineral nutrition. In: HARRIS, P.M. The potato crop: the scientific basis for improvement. London, Chapman, 1978. p.195-244.

17. HU, C.Y. & WANG, P.J. Meristem, shoot-tip and bud culture. In: EVANS, D.A.; SHARP, W.R.; AMMIRATO, P.V. & YAMADA, Y. Handbook of plant cell culture, New York, Macmillan, 1983. v.1, p.970.

18. HUSSEY, G. & STACEY, N.J. Factors affecting the formation of in vitro tubers of potato (Solanum tuberosum L.). Annals of Botany, London, 53(4):565-78, Apr. 1984.

19. _____ & _____. In vitro propagation of potato (Solanum tuberosum L.). Annals of Botany, London, 48:787-96, 1981.

20. JAMESON, P.E.; McWHA, J.M. & HASLEMORE, R.M. Changes in cytokinins during initiation and development of potato tubers. Physiologia Plantarum, Copenhagen, 63(1):53-7, Jan. 1985.

21. KRAUSS, A. Interaction of nutrients and tuberization. In: LI, P.H. Potato physiology, London Academic Press, 1985. p. 209-30.

22. LEOPOLD, A.C. & KRIEDEMANN, P.E. Plant growth and development. Bombay, McGraw Hill, 1975. 545p.

23. MARES, D.J.; MARSCHNER, H. & KRUSS, A. Effect of gibberellic acid on growth and carbohydrate metabolism of developing tubers of potato (Solanum tuberosum L.). Physiologia Plantarum, Copenhagen, 52:267-74, 1981.

24. _____; SOWOKINOS, J.R. & HAWKER, J.S. Carbohydrate metabolism in developing potato tubers. In: LI, P.H. Potato physiology. London, Academic Press, 1985. p.279-327.

25. MAUK, S.C. & LANGILLE, A.R. Physiology of tuberization in Solanum tuberosum L. cis-zeatin riboside in potato plants: its identification and changes in endogenous levels as influenced by temperature and photoperiod. Plant Physiology, Baltimore, 62(3):438-42, 1978.

26. MELLOR, F.C. & STACE-SMITH, R. Virus-free potatoes by tissue culture. In: REINERT, J. & BAJAJ, Y.P.S. Applied and fundamental aspects of plant cell tissue and organ culture. Berlin, Springer-Verlag, 1977. p.616-46.

27. MILLER, S.A. & LIPSCHUTS, L. Potato. In: AMMIRATO, P.V.; EVANS, D.A.; SHARP, W.R. & YAMADA, Y. Handbook of plant cell culture. New York, Macmillan, 1983. v.3, p.291-326.

28. MINGO-CASTEL, A.M.; SMITH, O.E. & KUMAMOTO, J. Studies on the carbon dioxide promotion and ethylene inhibition of tuberization in potato explants cultured in vitro. Plant Physiology, Baltimore, 57(4):480-85, Apr. 1976.

29. _____; YOUNG, R.E. & SMITH, O.E. Kinetin induced of potato in vitro: on the mode of action of kinetin. Plant and Cell Physiology, Kyoto, 17:557-70, 1976.

30. MOORBY, J. The physiology of growth and tuber yield. In: HARRIS, P.M. The potato crop: the scientific basis for improvement. London, Chapman, 1978. p.153-94.

31. MORENO, U. Environmental effects on growth and development of potato plants. In: LI, P.H. Potato physiology, London, Academic Press, 1985. p.481-501.

32. MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. Physiologia Plantarum, Copenhagen, 15:473-97, 1962.

33. OKAZAWA, Y. Physiological studies on tuberization of potato plants. Journal of the Faculty of Agriculture, Hokkaido Univ., Sapporo, 55:267-336, 1967.

34. OPARKA, K.J.; DAVIES, H.V. & PRIOR, D.A.M. The influence of applied nitrogen on export and partitioning of current assimilate by field-grown potato plants. Annals of Botany, London, 59(3):311-23, Mar. 1987.

35. ORTIZ-MONTIEL, G. & LOZOYA-SALDANA, H. Potato minitubers: technology validation in Mexico. American Potato Journal, Orono, 64(10):535-44, Oct. 1987.

36. PALMER, C.E. & SMITH, O.E. Cytokinins and tuber initiation in potato Solanum tuberosum L. Nature, London, 221:279-80, 1969.

37. _____ & _____. Effect of kinetin on tuber formation on isolated stolons of Solanum tuberosum L. cultured in vitro. Plant and Cell Physiology, Kyoto, 11:303-14, 1970.

38. PETERSON, R.L.; BARKER, W.G. & HOWARTH, M.J. Development and structure of tubers. In: LI, P.H. Potato Physiology. London, Academic Press, 1985. p.123-52.

39. PRODUÇÃO de batata (Solanum tuberosum L.). Brasília, EMBRAPA-CNPH, 1985. 4p. (Comunicado Técnico, 8).

40. QUAK, F. Meristem culture and virus-free plants. In: REINERT, J. & BAJAJ, Y.P.S. Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture. Berlin, Springer-Verlag, 1977. p.598-615.

41. ROCA, W.M.; ESPINOZA, N.O.; ROCA, M.R. & BRYAN, J.E. A tissue culture method for the rapid propagation of potatoes. American Potato Journal, Orono, 55(12):691-701, Dec. 1978.

42. SALE, P.J.M. Productivity of vegetable crops in a region of high solar input. III. Carbon balance of potato crops. Australian Journal of Plant Physiology, Melbourne, 1:283-96, 1974.

43. SANTELITH, G. & EWING, E.E. Effects of nitrogen fertilization on growth and development of potatoes. American Potato Journal, Orono, 58(10):517-8, Oct. 1981.

44. SATTELMACHER, B. & MARSCHNER, H. Relation between nitrogen nutrition, cytokinin activity and tuberization in Solanum tuberosum. Physiologia Plantarum, Copenhagen, 44:65-8, 1978.

45. SCHILDE-RENTSCHLER, L. & SCHMIEDICHE, P.E. El cultivo de tejidos: su passado, presente y futuro. Circular del CIP, Lima, 12(1):1-6, 1984.

46. STALLKNECHT, G.F. Tuber initiation in Solanum tuberosum: effect of phytohormones and induced changes in nucleic acid and protein metabolism. In: LI, P.H. Potato physiology. London, Academic Press, 1985. p.231-60.

47. _____ & FARNSWORTH, S. The effect of nitrogen on the coumarin-induced tuberization of potato axillary shoot cultured in vitro. American Potato Journal, Orono, 56(11):523-30, Nov. 1979.

48. THORNTON, M.K. & KNUTSON, K.W. Effect of transplant container volume and growing season lenght on field performance of micropropagated potatoes. American Potato Journal, Orono, 63 (8):399-410, Aug. 1986.

49. TIZIO, R. & BIAIN, M.M. Are cytokinins the specific factors for tuber formation in the potato plants? Phyton, Buenos Aires, 31:3-13, 1973.

50. TOVAR, P.; ESTRADA, R.; SCHILDE-REENTSCHLER, L. & DODDS, J.H. Induccion y utilization de tuberculos in vitro de papa. Circular del CIP, Lima, 13(4):1-5, 1985.

51. VAN UYEN, N. Nueva aplicaccion de cultivo de tejidos y de multiplicacion rapida; produccion de papa por agricultore vietnamitas. Circular del CIP, Lima, 12(1):7-10, 1984.

52. VERHOYEN, M. & GIVRON, D. Un schema de multiplication rapide des pommes de terre sans virus par la production de tubercules in vitro. Mededelingen Facukteit van de Landbouwwetenschappen Rijksuniversiteit Gent, Louvain, 46(3):1031-42, 1981.

53. WANG, P.J. & HU, C.Y. In vitro mass tuberization and virus-free seed potato in Taiwan. American Potato Journal, Orono, 59(1):33-9, Jan. 1982.

54. _____ & _____. Potato tissue culture and its applications. In: LI, P.H. Potato physiology, London, Academic Press, 1985. p.503-77.

55. WATTIMENA, G.; McCOWN, B. & WEIS, G. Comparative field performance of potatoes from microculture. American Potato Journal, Orono, 60(1):27-33, Jan. 1983.

56. WERNER, H.O. Anomalous tuberization of Solanum tuberosum. American Potato Journal, Orono, 31:375, 1954.