

CONCEIÇÃO, A.M. da; FORTES, G. R. de L.; SILVA, J.B. da. Influência do ácido acetilsalicílico, da sacarose e da temperatura na conservação *in vitro* de segmentos caulinares de batata. *Horticultura Brasileira*, Brasília, v. 17, n. 3, p.182-185, novembro 1999.

Influência do ácido acetilsalicílico, da sacarose e da temperatura na conservação *in vitro* de segmentos caulinares de batata.

Adriane M. da Conceição¹; Gerson Renan de L. Fortes²; João Baptista da Silva.³

^{1/} UFPel - Colegiado de Pós-Graduação em Agronomia, C. Postal 354, 96.010-900 Pelotas-RS; ^{2/} Embrapa Clima Temperado, C. Postal 403, 96001-970 Pelotas-RS; ^{3/} UFPel/IFM, C. Postal 354, 96.010-900 Pelotas-RS.

RESUMO

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Clima Temperado (Pelotas-RS), com o objetivo de estudar o efeito do ácido acetil salicílico (AAS), associado à sacarose e à temperatura na conservação *in vitro* de segmentos caulinares das cultivares de batata Baronesa e Santo Amor. Os segmentos foram inoculados em meio de cultura com sais e vitaminas de MS, acrescido de 100 mg.L⁻¹ de mio-inositol, 6 g.L⁻¹ ágar e com sacarose nas concentrações de 10, 30 e 50 g.L⁻¹ combinadas com ácido acetil salicílico a 0, 3, 6, 9 e 12 mg.L⁻¹. Após a inoculação o material foi mantido às temperaturas de 10 e 25°C. O experimento constituiu-se de um fatorial AxBxCxD [temperatura (2) x sacarose (3) x AAS (5) x cultivar (2)], em blocos casualizados, com quatro repetições, sendo cada explante uma parcela. O comprimento do segmento caulinar foi analisado pelo teste de Duncan e pela regressão polinomial dos fatores. As avaliações foram iniciadas 15 dias após a instalação do experimento e continuadas a cada 15 dias, sucessivamente ao longo de 180 dias. Da variável percentagem de sobrevivência do material em conservação *in vitro* foi calculado apenas o valor médio. A concentração de sacarose de 30 g.L⁻¹ no meio de cultura, e a temperatura de 10°C, foram os melhores tratamentos para a melhor conservação *in vitro* e maior percentagem de sobrevivência dos segmentos caulinares de batata.

Palavras chaves: *Solanum tuberosum L.*, cultura de tecidos.

ABSTRACT

Effect of acetyl salicylic acid, sucrose and temperature on *in vitro* storage of potato shoots.

This work was carried out at the Tissue Culture Laboratory at Embrapa Clima Temperado Pelotas-RS, Brazil, to evaluate the influence of acetyl salicylic acid (ASA), sucrose and temperature in the *in vitro* storage of potato shoot cvs. Baronesa and Santo Amor. The shoot segments were inoculated on a medium containing MS salts, vitamins, myo-inositol (100 mg.L⁻¹), agar (6.0 g.L⁻¹) and sucrose at 10, 30 and 50 g.L⁻¹ combined with acetyl salicylic acid at 0, 3, 6, 9 and 12 mg.L⁻¹. After inoculation the material was kept at 10 or 25°C. The experiment was designed in a factorial A x B x C x D [temperature (2) x sucrose (3) x ASA (5) x cultivars (2)] and displayed in a randomized block with four replicates being each explant one plot. The shoot growth was studied and the data were compared by the Duncan test and by polynomial regression. Evaluation took place every 15 days and the last one was done 180 days after inoculation. The best results were obtained using *in vitro* storage with the shoots kept at 10°C, on a medium containing to 30 g.L⁻¹ sucrose.

Keywords: *Solanum tuberosum L.*, tissue culture.

(Aceito para publicação em 01 de setembro de 1999)

A batata (*Solanum tuberosum L.*) é a olerácea mais importante cultivada no Brasil, pelo seu alto potencial de rendimento e pelas suas propriedades nutricionais, com produtividade média de 15 t/ha, com uma área plantada, em 1995 de 178.174 ha e uma produção de 2.692334 t (IBGE, 1997). As áreas de produção estão concentradas, principalmente no Centro-Sul do país; o Rio Grande do Sul encontra-se em primeiro lugar em área plantada e em quinto em produtividade, com 9,9 t/ha (IBGE, 1997).

O processo de conservação *in vitro*, que é baseado no crescimento lento das espécies, tem sido considerado uma al-

ternativa à conservação de germoplasma feita a campo em espécies propagadas vegetativamente (Roca *et al.*, 1991).

O crescimento rápido das espécies *in vitro* exige mais mão-de-obra e aumenta a possibilidade de perdas devido à contaminação do material durante repetições contínuas de subcultivo. Por outro lado, o processo de conservação *in vitro* diminui o número de subcultivos, como também reduz os custos financeiros, as contaminações por microorganismos e a variação somaclonal. O método de conservação *in vitro* objetiva desacelerar ou até suprimir totalmente o crescimento das células e tecidos *in vitro*, aumentando o

período entre cada subcultivo (Dorion *et al.*, 1991).

O crescimento lento tem sido um sucesso na manutenção das gemas de algumas espécies e tem manifestado aplicabilidade podendo ser utilizado rotineiramente para espécies como: batata, batata-doce, maçã, pêra, kiwi, banana, forrageiras e ornamentais (Withers & Williams, 1990). Entre os fatores mais estudados para retardamento do crescimento, encontram-se a redução de temperatura, bem como adição de inibidores de crescimento e osmóticos ao meio de cultura.

Os retardantes de crescimento são um grupo de componentes sintéticos que

reduzem o alongamento da haste; e, geralmente aumentam a coloração verde das folhas. Esses componentes inibem a divisão celular no meristema subapical das gemas, mas tem pouco efeito na produção de folhas e no crescimento de raízes (Gianfagna, 1987).

Segundo Salisbury (1992), o ácido acetil salicílico é um hormônio vegetal importante para algumas respostas fisiológicas conhecidas. Tais como, formação floral (Kaihara *et al.*, 1981; Khurama & Maheshwari, 1978); fechamento dos estômatos (Larque-Saavendra, 1979); inibição da síntese de etileno (Leslie & Romani, 1988); resistência a patógenos (Mills & Wood, 1984); produção de proteínas relacionadas a patogenicidade (Ohashi & Matsuoka, 1987) e promotor na formação de colônias de protoplastos (Carswell *et al.*, 1989).

Leite *et al.* (1995), conservaram meristemas de alho *in vitro* utilizando o ácido acetil salicílico em concentrações de até 4,0 mg.L⁻¹ combinado com manitol 30 g.L⁻¹, em substituição a sacarose; a maior percentagem de plantas sobreviventes (34,55%) foi obtida na concentração de 0,5 mg.L⁻¹, de ácido acetilsalicílico.

Esse trabalho teve como objetivo estudar a modificação do meio de cultura, utilizando o ácido acetilsalicílico como retardante de crescimento associado a um agente osmótico, a sacarose, e à temperatura, na conservação *in vitro* de segmentos caulinares das cultivares de batata, Baronesa e Santo Amor.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS.

Foram utilizadas plantas de batata (*Solanum tuberosum* L.) das cultivares Baronesa e Santo Amor. Os tubérculos dessas cultivares foram plantados em vasos contendo solo esterilizado com brometo de metila. Após o crescimento e desenvolvimento das ramas até a altura aproximada de 20-25 cm, estas foram cortadas e utilizadas para retirada dos meristemas.

O meio de cultura utilizado para isolamento de meristemas foi constituído

por sais e vitaminas de MS (Murashige & Skoog, 1962), acrescido de sacarose (30 g.L⁻¹), mio-inositol (100 mg.L⁻¹), 6-benzilaminopurina (BAP) 1 mg.L⁻¹, ácido-naftalenoacético (ANA) 0,01 mg.L⁻¹, ácido giberélico (AG₃) 1 mg.L⁻¹ e ágar (6 g.L⁻¹), sendo o pH ajustado a 5,9 com NaOH (1N) antes da adição do agente solidificante. Após a inoculação dos explantes no meio de cultura os frascos foram mantidos em sala de crescimento, por 45 dias, sob 16 horas de fotoperíodo, 2000 lux de intensidade luminosa e temperatura de 25°C ± 2°C.

A partir do desenvolvimento dos meristemas, em meio de cultura obtive-se brotações com 2 a 3 cm que foram divididas em segmentos caulinares contendo uma gema axilar e inoculadas em tubos de ensaio contendo 10 ml de meio básico MS sem reguladores de crescimento e com todos os demais componentes da fase anterior. Os frascos foram mantidos em sala de incubação à temperatura e fotoperíodo idênticos aos utilizados no desenvolvimento de meristemas. Após quatro semanas originaram-se novas brotações de 10 a 12 cm

Ao atingir o comprimento médio de 12 cm, as brotações sadias (conforme teste de indexação realizados previamente) das duas cultivares foram divididas em segmentos caulinares de 2 cm de comprimento, contendo duas gemas axilares e inoculadas em meio MS acrescido de sacarose (10, 30 e 50 g.L⁻¹); ácido acetilsalicílico (0, 3, 6, 9 e 12 mg.L⁻¹) e mantidas às temperaturas de 10 e 25°C.

O experimento constituiu-se de um fatorial AxBxCxD [temperatura (2) x sacarose (3) x AAS (5) x cultivar (2)], em blocos casualizados, com quatro repetições, sendo que cada explante representou uma parcela. Os dados referentes ao comprimento do segmento caulinar foram analisados utilizando-se o teste de Duncan e a regressão polinomial dos fatores. As avaliações foram iniciadas quinze dias após a instalação do experimento e continuadas a cada quinze dias, sucessivamente, ao longo de 180 dias. Da variável percentagem de sobrevivência do material em conservação *in vitro* foi apenas calculado o seu valor médio.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da análise da variação apresentaram significância estatística para a grande maioria dos fatores e interações. Somente não foram significativas ($\alpha=0,05$) as interações AAS x cultivar e temperatura x AAS x cultivar. Tendo em vista este fato e visando uma simplificação do trabalho, selecionamos apenas interações de primeira ordem que se apresentaram como altamente significativas ($\alpha=0,01$). Da variável percentagem de sobrevivência do material em conservação *in vitro* foi apenas calculado o seu valor médio.

A redução de temperatura proporcionou um menor crescimento dos segmentos caulinares para a cultivar Baronesa à temperatura de 10°C (Figura 1). Para 25°C ocorreu uma inversão de cresci-

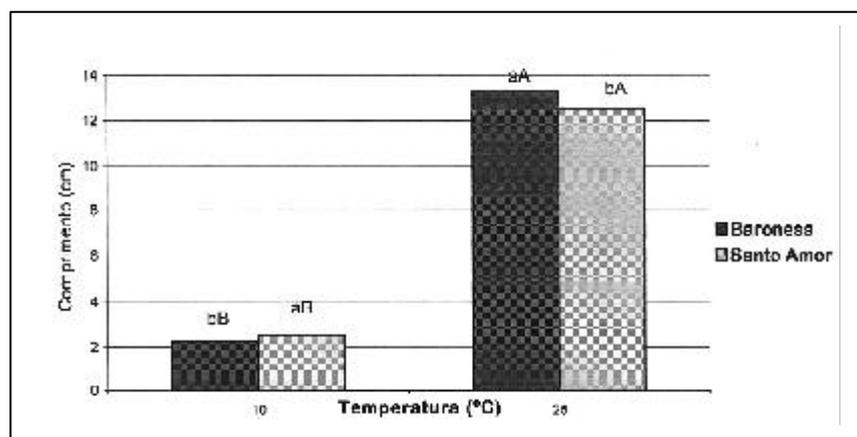


Figura 1. Comprimento de segmentos caulinares de batata cvs. Baronesa e Santo Amor à temperatura de 10 e 25°C, após seis meses de conservação *in vitro*, Pelotas-RS, Embrapa Clima Temperado, 1997 (as letras minúsculas correspondem as comparações entre as cultivares, dentro de uma mesma temperatura e as letras maiúsculas indicam as comparações entre as temperaturas, para uma mesma cultivar, pelo teste de Duncan ($\alpha=0.05$)).

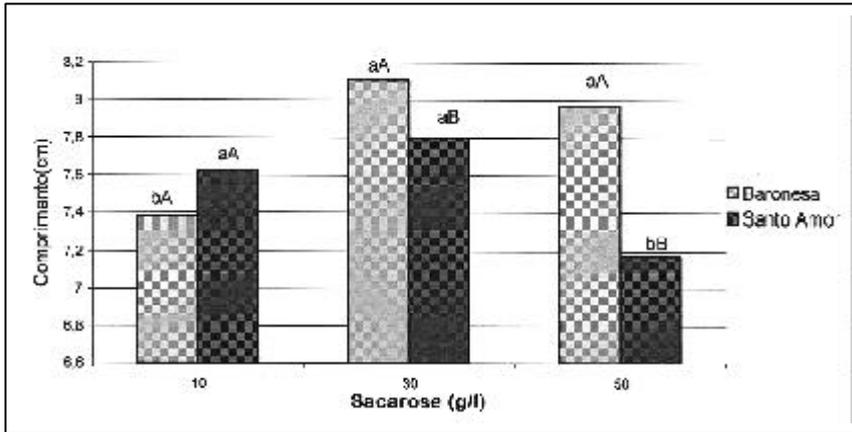


Figura 2. Comprimento dos segmentos caulinares de batata cvs. Baronesa e Santo Amor nas concentrações de 10, 30 e 50 g/l de sacarose, após seis meses de conservação *in vitro*, Pelotas-RS, Embrapa Clima Temperado, 1997 (as letras minúsculas correspondem às comparações entre as concentrações de sacarose para uma mesma cultivar e as letras maiúsculas indicam as comparações entre as cultivares, para uma mesma concentração, pelo teste Duncan ($\alpha=0.05$)).

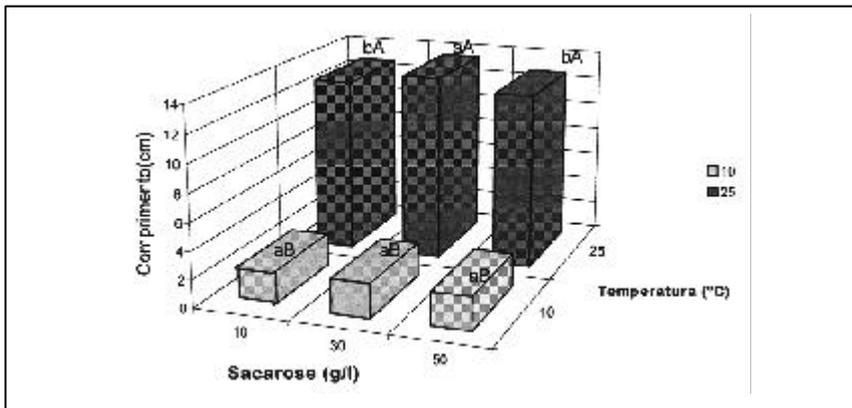


Figura 3. Comprimento de segmentos caulinares de batata para a média das cultivares às concentrações de 10, 30 e 50 g/l de sacarose, e sob temperatura de 10 e 25°C, após seis meses de conservação *in vitro*, Pelotas-RS, Embrapa Clima Temperado, 1997 (as letras minúsculas correspondem às comparações entre as concentrações de sacarose dentro de uma mesma temperatura e as letras maiúsculas indicam as comparações entre as temperaturas, para uma mesma concentração de sacarose, pelo teste Duncan ($\alpha=0.05$)).

mento em relação às cultivares, sendo os segmentos caulinares da cultivar Baronesa os que mais cresceram. Isto pode ser atribuído a uma característica genotípica (Jabuonski & Furumoto, 1987); a cv. Baronesa possui porte médio, e a cv. Santo Amor porte baixo, embora a Santo Amor seja proveniente do cruzamento entre as cultivares Baronesa e Konsuragis (Hawkes, 1978). À temperatura de 10°C, ocorreu um crescimento lento dos segmentos caulinares de batata, provocado por uma desaceleração na velocidade do metabolismo celular, devido à baixa temperatura os processos metabólicos são mais lentos (Desbrunais

et al., 1992). Resultados similares foram obtidos por Bhat & Chandel (1993), na conservação *in vitro* de gemas de banana, às temperaturas de 15 e 25°C. Estes autores concluíram que o crescimento lento dos segmentos ocasionado pela redução de temperatura é um fator importante e determinante para a longevidade do material em conservação.

Sharma & Chandel (1992) utilizando temperaturas de 5, 10, 15 e 25°C na conservação *in vitro* de segmentos caulinares de *Raulvofia serpentina*, observaram que os segmentos apresentaram redução no crescimento durante os quinze meses de armazenamento. Henshaw

et al. (1980), trabalhando com segmentos caulinares de genótipos de batata à temperatura de 6°C e 8 h de fotoperíodo à noite e de 12°C e 16 h de fotoperíodo durante o dia, obtiveram um índice de 80% de sobrevivência do material em seis meses de conservação *in vitro*.

As cultivares Baronesa e Santo Amor produziram 24 e 27 microtubérculos respectivamente, após 6 meses da conservação *in vitro*. Verificou-se que ocorreu um maior crescimento dos segmentos caulinares com o aumento do nível de sacarose, sendo que para o nível de 30 g.L⁻¹ obteve-se o maior comprimento dos segmentos caulinares, principalmente para a cultivar Baronesa (Figura 2). A redução verificada quando se passa de 30 g.L⁻¹ para 50 g.L⁻¹ para a cultivar Santo Amor pode ser atribuída à formação de microtubérculos quando utilizada a concentração maior de sacarose no meio de cultura. Karssem *et al.* (1991), relatam que a formação de microtubérculos é conseguida pela alta concentração de açúcar no meio de cultura. Aumentando a concentração de sacarose de 2 a 8%, houve um aumento de até 100% na formação de microtubérculos em estacas nodais com concomitante redução no alongamento do estolão.

Segmentos caulinares à temperatura de 25°C apresentaram um maior comprimento, do que aqueles a 10°C em todas as concentrações de sacarose, sendo que a concentração de 30 g.L⁻¹ foi superior às demais. A temperatura de 25°C proporciona um aumento na velocidade do metabolismo celular e, conseqüentemente, um maior crescimento dos segmentos caulinares (Figura 3). Resultados similares foram obtidos por Desbrunais *et al.* (1992) conservando segmentos caulinares de café *in vitro* à temperatura de 27°C com 20g.L⁻¹ de sacarose.

Com o aumento da concentração de AAS em meios de cultura submetidos à temperatura de 25°C, ocorreu redução no crescimento médio dos segmentos caulinares das distintas cultivares (Figura 4). Os retardantes de crescimento reduziram o alongamento das hastes (Gianfagna, 1987). A temperatura de 10°C, quando comparada com a de 25°C, foi mais eficiente na redução do crescimento dos segmentos caulinares, mesmo na ausência de AAS. Entretanto, segundo Grout (1991), retardantes de

crescimento devem ser adicionados ao meio de cultura e a temperatura deve ser reduzida entre 1 e 10°C, para promover uma redução na velocidade de crescimento do material em conservação.

Com respeito à percentagem de sobrevivência dos segmentos caulinares em conservação *in vitro*, obteve-se maior percentual de sobrevivência a 10°C, atingindo cerca de 87%, para a média das cultivares. À temperatura de 25°C, ocorreu um maior percentual de perda de material atingindo aos seis meses de conservação, com aproximadamente 57% de sobrevivência. Estas perdas foram atribuídas à contaminação por microorganismos, pois com o aumento da temperatura há uma maior condensação de água no frasco, favorecendo o desenvolvimento de fungos. Resultados semelhantes foram obtidos em estudos sobre a conservação *in vitro* de gemas de macieira, onde ocorreu perda do material à temperatura de 26°C, devido à contaminação por microorganismos e à diminuição do meio de cultura. (Lundergan & Janick, 1979). Estes resultados com as cultivares Baronesa e Santo Amor superaram os obtidos por Fortes *et al.* (1995), que obtiveram quatro meses e meio de conservação *in vitro* para segmentos caulinares das cultivares Baronesa e Monte Bonito.

Os resultados obtidos neste trabalho, sugerem que a melhor conservação *in vitro* e a maior percentagem de sobrevivência dos segmentos caulinares de batata foram obtidos com a concentração de 30 g.L⁻¹ de sacarose no meio de cultura e à temperatura de 10°C.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Embrapa Clima Temperado, pelo uso das instalações para execução do ensaio e também ao CNPq pelos recursos fornecidos.

LITERATURA CITADA

BHAT, S.R., CHANDEL, K.P.S. *In Vitro* Conservation of Musa Germplasm: Effects of Mannitol and Temperature on Growth and Storage. *Journal of Horticultural Science*, v. 6, p. 841-846, 1993.
 CARSWELL, G.C.; JOHNSON, R.D.; HARMA, C.T. O-acetyl-salicylic acid promotes colony formation from protoplasts of an elite maize inbred. *Plant Cell Reports*, v. 8, p. 282-284, 1989.

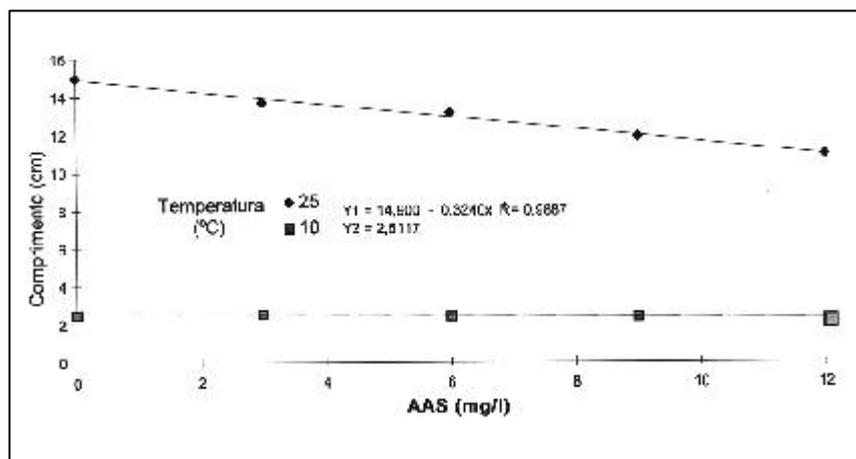


Figura 4. Comprimento de segmentos caulinares de batata para a média das cultivares às concentrações de 0, 3, 6, 9, e 12 mg/l de AAS, e temperatura de 10 e 25°C, após seis meses de conservação *in vitro*, Pelotas-RS, Embrapa Clima Temperado, 1997.

DEBRUNAIS, B.A.; NOIROT, M.; CHARRIER, A. Slow growth *in vitro* conservation of coffee (*Coffea* spp.). *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, v. 31, p. 105-110, 1992.
 DORION, N.; KADRI, M.; BIGOT, C. *In vitro* preservation at low temperature of rose plantlets usable for direct acclimatization. *Acta Horticulturae*, v. 298, p. 335-343, 1991.
 FORTES, G.R. de L.; LEITE, D.L.; MAGALHÃES, Junior., A.M. Conservação *in vitro* de alho (*Allium sativum*); aspargo (*Asparagus officinalis*) e batata (*Solanum tuberosum* L.). In: REUNIÃO ESTADUAL DE BIOTECNOLOGIA VEGETAL, 8, Pelotas, 1995, p. 30.
 GIANFAGNA, T. J. Natural and Synthetic Growth Regulators and Their use in Horticultural and Agronomic Crops. In: *Plant Hormones and Their Role in Plant Growth and Development*. DAVIES, P.J. (Ed.), London, 1987 p. 626-632.
 GROUT, B.W.W. Conservation *in vitro*. *Acta Horticulturae*, v. 289, p. 171-178, 1991.
 HAWKES, J.G. History of the potato. In: HARRIS, P.M. *The Potato Crop: The scientific basis of improvement*. London, Chapman and Hall, p. 1-14, 1978.
 HENSHAW, G.G.; HARA, J.F.O.; WESTCOTT, R.J. Tissue culture methods for the storage and utilization of potato germplasm. In: INGRAM, D.S.; HELGESON, J.P. *Tissue culture methods for plant pathologists*. Boston: Blackwell, 1980, p. 71-76.
 IBGE, Anuário Estatístico Brasileiro, v. 57, p. 3-41, 1997.
 JABUONSKI, R.E.; FURUMOTO, O. Características das cultivares. In: *Produção de Batata*. REIFSCHEIDER, F.J.B. (Coord). Brasília, 1987, p. 6-11.
 KAIHARA, S.; WATANABE, K.; TAKIMOTO, A. Flower-inducing effect of benzoic and salicylic acids on various strains of *Lenna paucicostata* and L. Minor. *Plant Cell Physiology*, v. 22, p. 819-825, 1981.
 KARSEM, C M.; VFANLON, L.C.; VREUGDENHIL, D. Hormonal and metabolic control of tuber formation: *Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture*. Kluwer Academic Publishers, p. 393-400, 1991.
 KHUARAMA, J.; MAHESWARI, S. Induction of loweing in *Lenna paucicostata* by salicylic acid. *Plant Science Letters*, v. 12, p. 127-131, 1978.
 LARQUE-SAAVENDRA, A. Stomatal closure in response to acetylsalicylic acid treatment. *Zeitschrift der Pflanzenphysiologie*, v. 93, p. 371-375, 1979.
 LEITE, D.L.; FORTES, G.R. de L.; GARCIA, A.; WINKLER, L.M. Conservação *in vitro* de alho (*Allium sativum* L.) cv. Quitéria. In: ENCUENTRO LATINO AMERICANO DE BIOTECNOLOGIA VEGETAL 2, Puerto Iguazu, Argentina, 1995, A-67p.
 LESLIE, C.A.; ROMANI, R.J. Inhibition of ethylene biosynthesis by salicylic acid. *Plant Physiology*, v. 88, p. 833-837, 1988.
 LUNDERGAN, C.; JANICK, J. Low temperature storage of *in vitro* apple shoots. *HortScience*, v. 88, 1979, p. 833-837.
 MILLS, P.R.; WOOD, R.K.S. The effects of polyacrylic acid, acetylsalicylic acid and salicylic acid on resistance of cucumber to *Colletotrichum lagenarium*. *Phytopathology Zeitschrift*, v. 111, p. 209-216, 1984.
 MURASHIGE, T.; SKOOG, F.A. revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, v. 15, p. 473-497, 1962.
 OHASHI, Y.; MATSUOKA, M. Induction and secretion of pathogenesis-related proteins by salicylate or plant hormones in tobacco suspension cultures. *Plant Cell Physiology*, v. 28, p. 573-580, 1987.
 ROCA, W.M.; ARIAS, D.I.; CHAVES, R. Metodos de Conservacion *in vitro* del Germplasma. In: ROCA, W.M.; MIOGINSKI, L.A. *Cultivos de Tejidos en la Agricultura*, Cali, 1991, p. 697-714.
 SALISBURY, F.B.; ROSS, C.W. *Plant Physiology*, Wadsworth Publishing Company, California, 1992, 400p.
 SHARMA, N.; CHANDEL, K.P.S. Low Temperature Storage of *Raulfovia serpentina* Benth. Ex Kurg and Endangered Endemic Medicinal Plant. *Plant Cell Reports*, New York, v. 11, p. 200-203, 1992.
 WITHERS, L.A.; WILLIAMS, J.T. Germplasm Conservation *in vitro* and Cryopreservation. In: TORRES, A.C., CALDAS, L.S. *Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas*. Brasília: ABCTP/EMBRAPA-CNPq, 1990, p. 267-286.