

Organogênese de ápices meristemáticos de batata em meios de isolamento e multiplicação *in vitro*

Jonny Everson Scherwinski Pereira¹; Gerson Renan de Luces Fortes²

¹Embrapa Acre, C. Postal 321, 69908-970 Rio Branco-AC; Email: jonny@cpafac.embrapa.br; ²Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, C. Postal 02372, 70770-900 Brasília-DF

RESUMO

Estudou-se a influência da consistência do meio de cultura sobre a organogênese de ápices meristemáticos de batata nas etapas de isolamento e multiplicação *in vitro*, das cultivares Baronesa, Eliza e Pérola. Para o cultivo utilizaram-se tubos de ensaio (20 x 150 mm) contendo 5 ml de meio de cultura de isolamento (sais de MS, 30g.L⁻¹ sacarose, 1,0 mg.L⁻¹ BAP, 0,01mg.L⁻¹ ANA, 0,1 mg.L⁻¹ AG₃) de consistência semi-sólida (6g.L⁻¹ de ágar) ou líquida. Ao meio de cultura semi-sólido acrescentou-se ainda 300 mg.L⁻¹ de carvão ativado. Como suporte dos meristemas em meio líquido, foram introduzidas fitas de papel filtro em forma de “U” invertido. Após 30 dias em meio de isolamento, os meristemas diferenciados foram transferidos para meio de multiplicação (sais de MS, 1,0 mg.L⁻¹ de tiamina, 5,0 mg.L⁻¹ de ácido pantotênico, 0,25 mg.L⁻¹ de AG₃ e 20 g.L⁻¹ de sacarose) semi-sólido e líquido, onde permaneceram por mais 21 dias. O desenvolvimento dos meristemas em meio de multiplicação de consistência líquida proporcionou brotações com altura, pelo menos, quatro vezes superior àquelas desenvolvidas em meio semi-sólido. A taxa de multiplicação obtida em meio líquido foi 1,6 e 3,6 vezes superior ao meio semi-sólido quando os meristemas diferenciaram-se em meio de isolamento líquido e semi-sólido, respectivamente. Houve formação indesejável de calo na base dos meristemas desenvolvidos em meio de isolamento líquido, o que proporcionou maior número de brotações regeneradas nestes meristemas. A diferenciação de meristemas de batata em meio de isolamento semi-sólido por 30 dias, seguida do cultivo em meio líquido sob agitação por mais 21 dias, promove melhoria nas taxas de crescimento e multiplicação dos meristemas.

Palavras-chave: *Solanum tuberosum*, micropropagação, meio líquido.

ABSTRACT

Organogenesis of potato meristem tips on the *in vitro* isolation and multiplication media

The effect of the culture media consistency on the organogenesis of potato meristem tips was evaluated on the *in vitro* isolation and multiplication stages from cultivars Baronesa, Eliza and Perola. The meristems were inoculated in liquid and semi-solid consistency isolation culture media. Meristems were cultivated in test tubes (20 x 150 mm) containing 5 ml semi-solid (6g L⁻¹ agar) and liquid culture media (MS salts, 30g L⁻¹ sucrose, 1.0 mg L⁻¹ BA, 0.01mg L⁻¹ NAA, 0.1 mg L⁻¹ GA₃). To the semi-solid media we added 300 mg L⁻¹ of activated charcoal. As support for the meristems in liquid medium inverted “U” ribbon papers were used. After 30 days in the isolation medium, the differentiated meristems were transferred to liquid and semi-solid multiplication medium (MS salts, thiamine 1.0 mg L⁻¹, panthotenic acid 5.0 mg L⁻¹, GA₃ 0.25 mg L⁻¹ and sucrose 20 g L⁻¹) where they remained for a further 21 days. Meristem inoculation in the liquid multiplication medium presented at least four times higher shoots than those formed in semi-solid medium. The multiplication rate obtained in liquid culture medium was 1.6 and 3.6 times higher than in semi-solid medium when the meristems were differentiated in liquid and semi-solid media, respectively. Undesirable callus formation was observed on the basis of meristems developed in liquid medium, providing larger number of regenerated shoots from these meristems. The differentiation of potato meristems in semi-solid culture medium for 30 days followed by the cultivation in liquid media under agitation for 21 days, improved the growth and multiplication rates of potato meristems.

Keywords: *Solanum tuberosum*, micropropagation, liquid medium.

(Recebido para publicação em 16 de abril de 2003 e aceito em 28 de novembro de 2003)

A batata (*Solanum tuberosum* L.) ocupa a quarta posição entre as principais culturas produzidas mundialmente, superada apenas pelo trigo, arroz e milho. No Brasil, é uma das oleráceas de maior importância com área plantada em torno de 182.000 hectares e produção de aproximadamente 2,7 milhões de toneladas. A cultura apresenta maior destaque nas regiões Sul (PR, SC e RS) e Sudeste (SP e MG) em virtude, principalmente, das condições edafoclimáticas mais propícias para seu desenvolvimento (Hirano, 1998; Camargo Filho, 2001; Choer, 2003). Atualmente, estima-se que a cultura gera cerca de 250 mil empregos diretos.

Comercialmente a propagação da batata é feita a partir de tubérculos-semente. Se por um lado este tipo de multiplicação apresenta vantagens por permitir a obtenção de material idêntico àquele que lhe deu origem, por outro lado, a utilização de material propagativo por repetidos ciclos pode causar acúmulo de doenças, especialmente as viróticas, provocando uma degenerescência na cultura com prejuízos diretos sobre a produtividade. Portanto, a utilização de material de alta qualidade genética e fitossanitária constitui-se como requisito indispensável para a melhoria no desenvolvimento da cadeia produtiva da batata (Assis, 1999;

Lopes e Reifschneider, 1999; Pereira *et al.*, 2001; Fortes e Pereira, 2003).

A técnica de cultivar tecidos de plantas *in vitro* tem servido como ferramenta em diversas áreas da agricultura. Particularmente para a cultura da batata, esta técnica é utilizada na obtenção e multiplicação de clones isentos de patógenos, com atenção especial às viroses. A cultura de meristema é a primeira etapa na produção de material propagativo de alta qualidade. Os principais inconvenientes desta fase são a possibilidade de ocorrer contaminação e a demora na diferenciação do tecido meristemático em meio de cultura (Fortes e Pereira, 2003; Pereira *et al.*, 2003).

Isto se deve ao fato de que os explantes utilizados são de tamanho pequeno (0,1 mm) e, por isso, apresentam dificuldades de sobreviver e se desenvolver *in vitro*. No processo normal de isolamento, a etapa de diferenciação dos meristemas varia de 45 a 60 dias, dependendo da cultivar. Após este período, o material diferenciado é transferido para meio de multiplicação onde permanece por, geralmente, mais 30 dias (Conceição *et al.*, 1999). Portanto, a otimização desta fase representa fator fundamental no processo de produção de material pré-básico (Fortes e Pereira, 2003).

Embora existam trabalhos relacionados à melhoria do desenvolvimento e crescimento de meristemas, poucos são os estudos que relacionam a influência de aspectos físicos do meio de cultura sobre a diferenciação, crescimento e desenvolvimento do material vegetal (Pereira e Fortes, 2003). Neste contexto, o trabalho objetivou estudar a influência da consistência do meio de cultura de isolamento e multiplicação, sobre o crescimento e desenvolvimento de meristemas de batata, cultivares Baronesa, Eliza e Pérola.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido na Embrapa Clima Temperado, Pelotas (RS). Tubérculos pré-básicos de batata das cultivares Baronesa, Eliza e Pérola, mantidos por seis meses à temperatura de $4\pm 1^\circ\text{C}$, foram plantados em sacos de polietileno, contendo substrato formado por terra de mato esterilizada e mantidos em casa-de-vegetação para estimular a brotação. Após, aproximadamente, 20 dias do plantio dos tubérculos, brotações apicais de 8 a 10 cm de comprimento foram coletadas, desfolhadas e levadas para o laboratório, onde foram separadas em gemas individuais e submetidas à desinfestação por imersão em álcool 70% (v/v) durante 10 segundos, seguido de 15 minutos em solução de hipoclorito de sódio 1% (v/v), na qual se adicionou o surfactante Tween-20 0,1% (v/v). Em câmara de fluxo laminar, foram realizados três enxágües consecutivos do material vegetal em água destilada esterilizada. Em seguida, com

o auxílio de microscópio estereoscópio, extraíram-se os meristemas sendo estes colocados individualmente em tubos de ensaio (20 x 150 mm) contendo 5 ml de meio de cultura de isolamento.

Os meristemas das cultivares Baronesa, Eliza e Pérola foram colocados para diferenciação em meios de isolamento de consistência líquida e semi-sólida. O experimento seguiu um arranjo fatorial 2 x 3, sendo testados dois tipos de meio de isolamento, quanto à natureza física (líquido e semi-sólido) e três cultivares de batata (Baronesa, Eliza e Pérola), totalizando seis tratamentos. Os tratamentos foram dispostos em delineamento de blocos casualizados com sete repetições. Cada parcela foi formada por seis tubos de ensaio, contendo um meristema/tubo.

O meio de cultura de isolamento foi constituído pelos sais e vitaminas de MS (Murashige e Skoog, 1962), acrescido de sacarose (30 g L^{-1}), mio-inositol (100 mg L^{-1}) e os reguladores de crescimento: benzilaminopurina (BAP) ($1,0\text{ mg L}^{-1}$), ácido naftalenoacético (ANA) ($0,01\text{ mg L}^{-1}$) e ácido giberélico (AG_3) ($0,1\text{ mg L}^{-1}$) (Resende e Paiva, 1985). Ao meio de cultura semi-sólido acrescentou-se 6 g L^{-1} de ágar, além de carvão ativado (300 mg L^{-1}). No meio de consistência líquida os meristemas desenvolveram-se sobre pontes de papel-filtro ($10\text{ x }100\text{ mm}$) em forma de "U" invertido, introduzidas em cada tubo de ensaio previamente à autoclavagem dos meios.

Nos primeiros dois dias de cultivo, os tratamentos foram mantidos no escuro para minimizar possíveis problemas de oxidação dos meristemas. Posteriormente, foram incubados à temperatura de $25\pm 2^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 16 horas e radiação de $35\text{ mmol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$, onde permaneceram por 30 dias. Ao final deste período, avaliou-se a influência da consistência do meio de isolamento sobre a diferenciação (modificações visuais ocorridas durante o desenvolvimento dos ápices meristemáticos no período de cultivo), crescimento (altura) e formação de calo (presença ou ausência) nos meristemas.

Os meristemas diferenciados foram então transferidos para meio de multiplicação (sais de MS, $1,0\text{ mg L}^{-1}$ de tiamina, $5,0\text{ mg L}^{-1}$ de ácido pantotênico,

$0,25\text{ mg L}^{-1}$ de AG_3 e 20 g L^{-1} de sacarose) (Pereira e Fortes, 2003) de consistência semi-sólida e líquida onde permaneceram por mais 21 dias.

Este ensaio, seguiu um esquema fatorial 2 x 2 x 3, sendo testados dois tipos de meio de multiplicação, quanto à natureza física (líquido e semi-sólido), meristemas de duas origens (diferenciados em meio de isolamento líquido ou semi-sólido) e três cultivares de batata (Baronesa, Eliza e Pérola), num total de 12 tratamentos. O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso com cinco repetições por tratamento. Cada parcela foi composta por um erlenmeyer contendo quatro meristemas.

Para os ensaios de multiplicação, utilizaram-se frascos erlenmeyer de 250 ml com 40 ml de meio de cultura para os experimentos onde os explantes se desenvolveram em meio sólido e 15 ml de meio quando os explantes se desenvolveram em meio líquido sob agitação ($80\text{--}90\text{ rpm}$), em mesa agitadora do tipo orbital.

Para ambos experimentos (diferenciação e multiplicação) o pH dos meios de cultura foi ajustado para $5,8\pm 0,1$ antes da autoclavagem, realizada por 15 minutos a 121°C e sob $1,5\text{ atm}$ de pressão.

As variáveis avaliadas foram: formação de calo, altura de brotações (avaliada medindo-se a porção compreendida entre a região do colo e a inserção da última folha) e taxa de multiplicação do material vegetal (obtida através da contagem do número de gemas formadas ao final do período de cultivo, excluindo-se a apical).

Nos experimentos de multiplicação, os cultivos foram mantidos em sala de crescimento à temperatura de $25\pm 2^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 16 horas e radiação luminosa de $35\text{ mmol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$, fornecida por lâmpadas fluorescentes brancas frias (Sylvania, 40w).

Os dados foram submetidos à análise de variância fazendo-se a comparação das médias pelo Teste de Duncan ($p \leq 5\%$). Os dados expressos em percentagem (x) foram transformados segundo arco seno $\sqrt{x/100}$. Os dados referentes à taxa de multiplicação (x) foram transformados segundo $\sqrt{x+0,5}$. Os dados sobre altura de brotações não foram

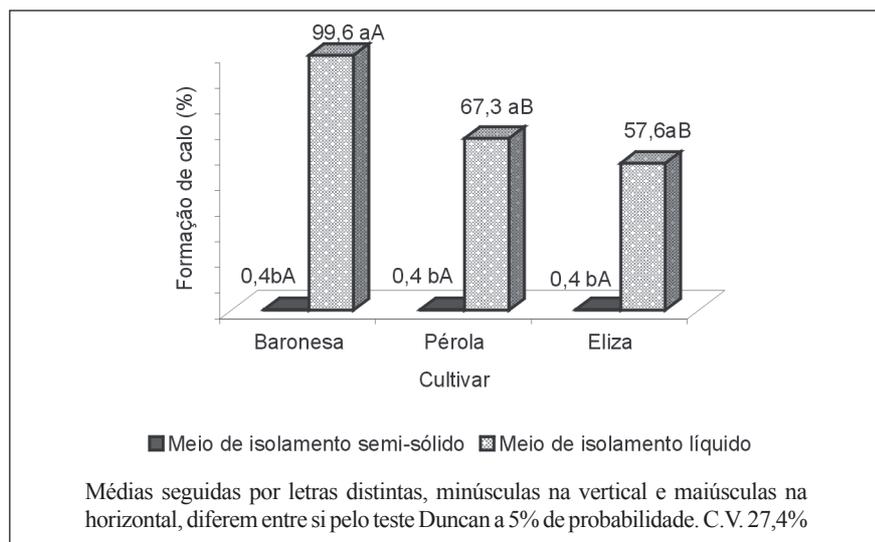


Figura 1. Formação de calo em meristemas de batata em função da consistência do meio de isolamento, após 30 dias de cultivo. Pelotas, Embrapa Clima Temperado, 2001.

transformados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após 30 dias de permanência em meio de isolamento, não foi possível detectar diferença na diferenciação e crescimento dos meristemas, embora todos tivessem diferenciado, independente da cultivar e consistência do meio de cultura de isolamento utilizado. Entretanto, o principal aspecto verificado ao final do período de diferenciação dos meristemas foi a forte calosidade observada quando os explantes foram cultivados em meio de isolamento de consistência líquida (Figura 1). Em meio líquido, 99,6% dos meristemas da cultivar Baronesa apresentaram formação de calo. Esta porcentagem foi significativamente superior àquela observada para as cultivares Pérola e Eliza, que tiveram, respectivamente, 67,3% e 57,6% dos meristemas apresentando calo. Em meio de isolamento de consistência semi-sólida somente cerca de 0,4% dos meristemas apresentaram a formação de calo, independentemente da cultivar testada, ao final dos 30 dias em que permaneceram sob diferenciação.

Na cultura de tecidos, a formação de calo em explantes, quando de forma não proposital, é indesejável pois a regeneração de brotações a partir de calos pode resultar em plantas com variações genéticas (Skirvin *et al.*, 1993).

Conceitualmente, calo é um tecido formado pela intensa e desordenada divisão das células do explante, geralmente em consequência de seu cultivo em meio com altas concentrações de auxina (Mantell *et al.*, 1994). Portanto, entre as razões que poderiam explicar a calogênese nos meristemas de batata, quando cultivados em meio de isolamento líquido, estariam a consistência e a presença de auxina (ANA) como constituinte do meio de cultura. Meios líquidos proporcionam menor resistência à difusão dos nutrientes quando comparados aos meios semi-sólidos e, portanto, melhoram o contato do explante com os constituintes do meio. Neste caso, supõe-se que a consistência tenha facilitado a ação da auxina sobre o material vegetal (Pereira e Fortes, 2003). Além disso, pela capacidade de reter concentrações excessivas de fitorreguladores e compostos tóxicos (Grattapaglia e Machado, 1998), o carvão ativado também poderia ser considerado como um dos fatores responsáveis pela baixa calogênese observada nos meristemas desenvolvidos em meio de isolamento semi-sólido. Contudo, por não terem sido realizados ajustes no meio de isolamento, não se pode afirmar que a simples remoção do ANA do meio de diferenciação eliminaria os problemas de calogênese dos explantes. Isso deve-se ao fato de que a sensibilidade das células de um tecido à forma-

ção de calo pode envolver outros fatores, tais como a atuação de um regulador de crescimento sobre o outro, inibindo ou aumentando a resposta, além do estágio de desenvolvimento e condições fisiológicas do explante (Skirvin *et al.*, 1993). Ressalta-se que o uso de ANA, juntamente com os demais constituintes do meio, apresenta importante papel na diferenciação por promover o crescimento do tecido meristemático.

Embora a consistência do meio de isolamento tenha influenciado a formação de calo nos meristemas, fato este indesejável pela possibilidade de ocorrer variação genética no material em questão, era de se esperar posteriormente, em meio de multiplicação, um maior número de brotações regeneradas a partir dos calos formados, baseado na teoria da totipotência celular. Entretanto, somente a cultivar Baronesa apresentou um número significativamente maior de brotações formadas, após 30 dias de cultivo em meio de multiplicação. Para esta cultivar, cada meristema diferenciado em meio líquido formou em média 1,4 brotação. Nos demais tratamentos, não foram observadas diferenças significativas quanto ao número de brotações regeneradas, mesmo para os meristemas diferenciados em meio de cultura líquido (Tabela 1).

Se a diferenciação em meio de cultura líquido foi prejudicial ao desenvolvimento dos meristemas, de maneira geral, a etapa posterior de multiplicação dos explantes neste meio foi o tratamento que proporcionou os melhores resultados para as variáveis estudadas, independente da consistência do meio de isolamento em que os meristemas foram diferenciados. Nas três cultivares testadas verificou-se que as brotações apresentaram altura significativamente superior em meio de multiplicação de consistência líquida quando comparadas àquelas desenvolvidas em meio semi-sólido (Figura 2). Mesmo apresentando brotações significativamente menores do que as outras cultivares em meio líquido, a cultivar Pérola apresentou brotações com altura pelo menos quatro vezes superior àquelas desenvolvidas em meio semi-sólido. As cultivares Baronesa e Eliza apresentaram respostas ainda melhores às ob-

Tabela 1. Número de brotações regeneradas e taxa de multiplicação obtida de meristemas de batata em meio de multiplicação, cvs. Baronesa, Eliza e Pérola, em função da consistência do meio de isolamento (MI), após 21 dias de cultivo. Pelotas, Embrapa Clima Temperado, 2001.

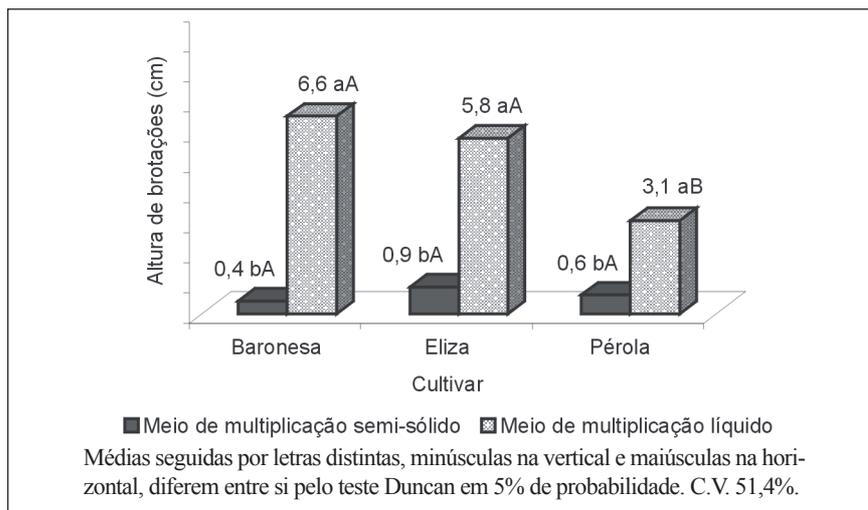
Consistência do meio de isolamento	Número de brotações			Taxa de multiplicação		
	Baronesa	Eliza	Pérola	Baronesa	Eliza	Pérola
MI líquido	1,4aA	1,0aB	1,1aB	6,9aA	6,9aA	4,0aB
MI semi-sólido	1,0bA	1,0aA	1,1aA	4,6bB	6,0aA	4,2aB
C.V. (%)	5,5			12,0		

Médias seguidas por letras distintas, minúsculas na vertical e maiúsculas na horizontal, diferem entre si pelo teste Duncan em 5% de probabilidade.

servadas pela cultivar Pérola. Assim, em meio de multiplicação líquido, a altura média das brotações das cultivares Baronesa e Eliza atingiu 6,6 e 5,8 cm, significativamente superiores às brotações crescidas sob meio semi-sólido que apresentaram altura de 0,4 e 0,9 cm, respectivamente, após 30 dias de cultivo (Figura 2).

Para taxa de multiplicação, somente foi observada interação significativa entre cultivar x consistência do meio de diferenciação e consistência do meio de multiplicação. No primeiro caso, verificou-se que, independentemente da consistência do meio de multiplicação utilizado, a taxa de multiplicação não apresentou diferenças significativas entre os meristemas diferenciados em meio de isolamento de consistência líquida ou semi-sólida, com exceção da cultivar Baronesa, onde os meristemas diferenciados em meio de isolamento líquido proporcionaram taxa de multiplicação superior àqueles meristemas diferenciados em meio semi-sólido (Tabela 1). Este fato pode ser explicado pelo número de brotações crescidas destes meristemas, visto que, na coleta dos dados, cada meristema foi avaliado como uma unidade de observação, não sendo levado em consideração o número de brotações diferenciadas em cada explante.

Entre as cultivares, também se observou diferenças significativas para a taxa de multiplicação. Meristemas das cultivares Baronesa e Eliza diferenciados em meio de isolamento líquido não diferiram entre si, mas apresentaram taxas de multiplicação significativamente superiores quando comparadas à da cultivar Pérola. Nos meristemas diferenciados em meio semi-sólido, a maior taxa de multiplicação verificada entre as

**Figura 2.** Altura de brotações regeneradas a partir de meristema em meio de multiplicação de consistência semi-sólida ou líquida, após 21 dias de cultivo. Pelotas, Embrapa Clima Temperado, 2001.**Tabela 2.** Taxa de multiplicação obtida de meristemas de batata em função da consistência dos meios de cultura de isolamento (MI) e multiplicação (MM), após 21 dias de cultivo. Pelotas, Embrapa Clima Temperado, 2001.

Consistência do meio de isolamento	Taxa de multiplicação	
	MM semi-sólido	MM líquido
MI líquido	4,6aB	7,4aA
MI semi-sólido	2,3bB	8,4aA
C.V. (%)	12,0	

Médias seguidas por letras distintas, minúsculas na vertical e maiúsculas na horizontal, diferem entre si pelo teste Duncan a 5% de probabilidade.

cultivares foi para a Eliza (Tabela 1).

No segundo caso, quando foi avaliada a taxa de multiplicação em função da interação consistência do meio de isolamento x consistência do meio de multiplicação, verifica-se que qualquer que tenha sido a consistência do meio de isolamento utilizado para a diferenciação dos meristemas, os melhores resultados para taxa de multiplicação do material vegetal foram observados

quando os meristemas foram cultivados em meio de multiplicação de consistência líquida (Tabela 2). Assim, independentemente do genótipo testado, meristemas diferenciados em meio de isolamento semi-sólido apresentaram em meio de multiplicação semi-sólido e líquido taxas médias de multiplicação de 2,3 e 8,4, respectivamente. Quando os meristemas diferenciaram-se em meio de isolamento de consistência lí-

quida, as taxas de multiplicação observadas em meio de multiplicação de consistência semi-sólida e líquida foram de 4,6 e 7,4, respectivamente. Estes resultados sugerem que os meristemas poderiam ser inicialmente diferenciados em meio semi-sólido com posterior cultivo em meio de multiplicação de consistência líquida, evitando-se, assim, os problemas de formação de calo inicialmente observados.

O uso de meio líquido na cultura da batata levou a uma diminuição no tempo de crescimento e desenvolvimento dos meristemas quando comparado ao processo normal, demonstrando ser uma importante metodologia a ser empregada para a multiplicação desta espécie *in vitro*. As etapas de isolamento e multiplicação foram realizadas em 51 dias, observando-se elevada taxa de multiplicação do material quando cultivados em meio líquido.

A diferenciação de meristemas de batata em meio de isolamento semi-sólido por 30 dias, seguido do cultivo em meio líquido sob agitação por mais 21 dias, promove melhoria nas taxas de crescimento e multiplicação dos

meristemas.

LITERATURA CITADA

- ASSIS, M. Novas tecnologias na propagação de batata. *Informe Agropecuário*, Belo Horizonte, v.20, n.197, p.30-33, 1999.
- CAMARGO FILHO, W.P. Produto Interno Bruto (PIB) da cadeia produtiva da batata. *Batata Show*, Itapetininga, ano 1, n.2, p.22, 2001.
- CHOER, E. Origem e Evolução. In: PEREIRA, A.S.; DANIELS, J. (Eds.). *O cultivo da batata na região sul do Brasil*. Embrapa Clima Temperado. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2003. p.57-67.
- CONCEIÇÃO, A.M.; FORTES, G.R.L.; SILVA, J.B. 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, 1999.
- FORTES, G.R.L.; PEREIRA, J.E.S. Batata-semente pré-básica: Cultura de Tecidos. In: PEREIRA, A.S.; DANIELS, J. (Eds.). *O cultivo da batata na região sul do Brasil*. Embrapa Clima Temperado. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2003. p.421-433.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Eds.). *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: Embrapa: SPI, 1998. p.183-260.
- HIRANO, H. Situação atual e perspectivas da produção de batata-semente no Brasil. In: REUNIÃO TÉCNICA ANUAL DE PESQUISA E EXTENSÃO DA CULTURA DA BATATA DA REGIÃO SUL DO BRASIL, 5., 1998. Pelotas. *Anais...* Embrapa CACT, 1998. p.11-12. (Embrapa

CPACT. Documento, 46).

- LOPES, C.A.; REIFSCHEIDER, F.J.B. Manejo integrado das doenças da batata. *Informe Agropecuário*, Belo Horizonte, v.20, n.197, p.56-60, 1999.
- MANTELL, S.H.; MATHEWS, J.A.; MCKEE, R.A. *Princípios de biotecnologia em plantas: uma introdução à engenharia genética em plantas*. Ribeirão Preto: SBG, 1994. p.101-158.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, v.15, p.473-497, 1962.
- PEREIRA, J.E.S.; FORTES, G.R.L. Protocolo para produção de material propagativo de batata em meio líquido. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.38, n.9, p.1035-1043, 2003.
- PEREIRA, J.E.S.; MATTOS, M.L.T.; FORTES, G.R.L. Bactérias endofíticas contaminantes em explantes de batata micropropagados e antibióticos para o controle *in vitro*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.38, n.7, p.827-834, 2003.
- PEREIRA, J.E.S.; MEDEIROS, C.A.B.; FORTES, G.R.L.; PEREIRA, A.S.; DANIELS, J. Avaliação de dois sistemas hidropônicos na produção de material pré-básico de batata. *Horticultura Brasileira*, v.19, suplemento CD-Rom, 2001. 3 p.
- RESENDE, R.O.; PAIVA, M. Eradication of potato virus X and S by meristem-tip culture. *HortScience*, v.20, p.525, 1985.
- SKIRVIN, R.M.; MCPHEETER, K.D.; NORTON, M. Sources and frequency of somaclonal variation. *HortScience*, Alexandria, v.29, n.11, p.1232-1237, 1993.